

**Pyrimidin 5'-Nukleotidase in embryonalen Hühnererythrozyten:
Sequenzanalyse und cAMP-abhängige Regulation der
Expression des Enzyms während der Ontogenese**

Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
- Biologie und Vorklinische Medizin -
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Markus Maß

aus Regensburg

2003

Promotionsgesuch eingereicht am: 8. Juli 2003

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. med. Rosemarie Baumann

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. med. Armin Kurtz (Vorsitzender)

Prof. Dr. med. Rosemarie Baumann (1. Gutachter)

Prof. Dr. rer. nat. Rainer Deutzmann (2. Gutachter)

Prof. Dr. rer. nat. Claudia Steinem

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung	1
1 Die Rolle der Pyrimidin 5'-Nukleotidase im Pyrimidinstoffwechsel von Erythrozyten	1
2 Eigenschaften der Pyrimidin 5'-Nukleotidase	2
3 Entwicklung der Erythrozyten im Hühnerembryo	3
4 Gasaustausch im Vogelembryo	4
5 Anpassung der Erythrozytenfunktion des Hühnerembryos an veränderte Gasaustauschbedingungen	5
6 Zielsetzung der Arbeit	8
II Abkürzungen	10
III Material und Methoden	13
1 Material	13
1.1 Geräte	13
1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	14
1.3 Puffer, Medien und Lösungen	16
1.4 Molekulargewichtsstandards	20
1.5 Oligonukleotide	21
1.6 Bakterien und Vektoren	22
2 Methoden	22
2.1 Gewinnung embryonaler Erythrozyten	22
2.2 Inkubationsversuche mit Erythrozyten	24
2.3 Bestimmung der Pyrimidin 5'-Nukleotidaseaktivität	24
2.3.1 Durchführung des Aktivitätstests	25
2.3.2 HPLC-Analyse	25
2.3.3 Aktivitätstest mit anderen Substraten	26
2.3.4 Aktivitätstest mit Metallionen	26
2.4 Bestimmung der Hämoglobinkonzentration	27
2.5 Proteinbestimmung nach Bradford	27
2.6 Säulenchromatographie	28

2.6.1 Ionenaustauschchromatographie	28
2.6.2 Gelfiltration	29
2.6.3 Chromatographie an Blue Sepharose	29
2.6.4 Weitere Chromatographien	30
2.7 SDS-Gelelektrophorese	33
2.8 Native Gelelektrophorese	34
2.9 Western-Blot	35
2.10 Konzentrierung von Proteinproben	36
2.11 Isolierung von Gesamt-RNA	36
2.12 Northern Blot	37
2.13 Reverse Transkriptase Reaktion	38
2.14 PCR	39
2.14.1 PCR mit degenerierten Primern	39
2.14.2 PCR mit Primerpaar „sonde1(s)/sonde1(as)“	40
2.14.3 Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde	40
2.14.4 Phagen-PCR	41
2.14.5 Untersuchung der Expression der Pyrimidin 5'-Nukleotidase in embryonalen Erythrozyten	41
2.15 Agarose-Gelelektrophorese	42
2.16 Gewinnung von DNA aus Agarosegelen	42
2.17 Konzentrationsbestimmung von DNA	43
2.18 Screening der cDNA-Bank	43
2.18.1 Kultivierung von Wirtsbakterien	44
2.18.2 Kultivierung von Phagen	44
2.18.3 Transfer auf Nylonmembranen	44
2.18.4 Hybridisierung mit einer cDNA-Sonde	45
2.18.5 Nachweis der Dig-markierten DNA	45
2.18.6 Isolierung einzelner Phagenplaques	46
2.19 Proteinsequenzierung	46
2.20 Sequenzierung von DNA	46

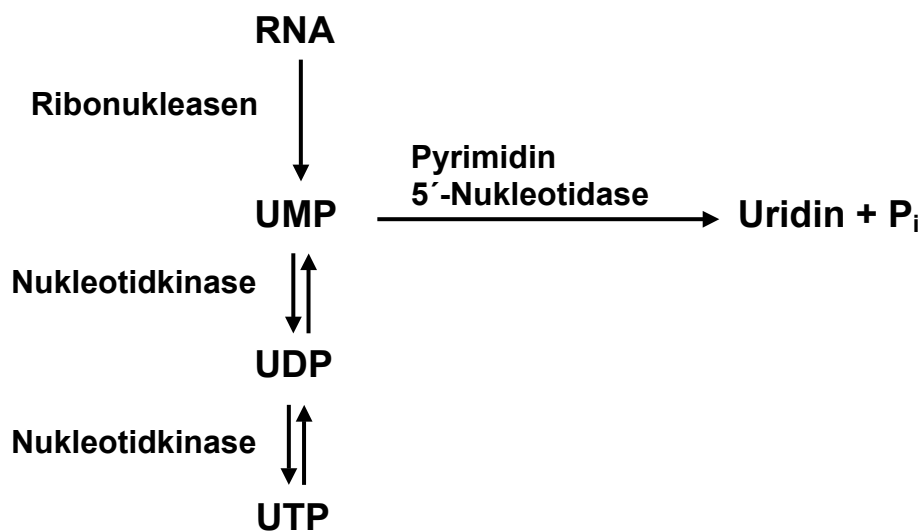
IV Ergebnisse	47
1 Eigenschaften der Pyrimidin 5'-Nukleotidase	47
1.1 Substratspezifität des Enzyms.....	47
1.2 Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert.....	49
1.3 Hemmung der Enzymaktivität durch Metallionen.....	49
1.4 Einfluss von Noradrenalin und Actinomycin D auf die Pyrimidin 5'-Nukleotidaseaktivität definitiver Hühnererythrozyten.....	50
1.5 Aktivität der Pyrimidin 5'-Nukleotidase nach Stimulierung von embryonalen Hühnererythrozyten mit CPCA oder Forskolin	52
2 Reinigung des Enzyms	53
2.1 Chromatographie.....	53
2.1.1 Ionenaustauscher.....	54
2.1.2 Gelfiltration	55
2.1.3 Blue Sepharose.....	57
2.2 Vergleich mit der Reinigung des Humanenzyms	58
2.2.1 Hydrophobe Chromatographie	59
2.2.2 Hydroxyapatit	59
2.2.3 Affinitätschromatographie	59
2.2.4 Weitere Säulenmaterialien	60
2.2.5 Reinigung mit Hämolysat von adulten Hühnern	60
2.3 Elektrophoretische Trennung und Sequenzierung des Enzyms	61
3 Bestimmung der mRNA-Sequenz der Pyrimidin 5'-Nukleotidase	63
3.1 Amplifikation von Teilsequenzen mit der PCR.....	63
3.2 Herstellung einer Dig-markierten DNA-Sonde	65
3.3 Screening der cDNA-Bank.....	65
3.4 Sequenzierung der cDNA	67
4 Analyse der Expression der Pyrimidin 5'-Nukleotidase	70
4.1 Nachweis der Pyrimidin 5'-Nukleotidase mRNA mittels Northern Blot	70
4.2 Untersuchung der P5N-I Expression mittels RT-PCR	70
4.2.1 Expression der P5N-I in definitiven Erythrozyten nach Inkubation mit CPCA.....	71

4.2.2	Expression der P5N-I in definitiven Erythrozyten nach Stimulierung mit Noradrenalin	72
4.2.3	Verlauf von Expression und Aktivität des Enzyms während der Embryogenese	74
4.2.4	Expression der Pyrimidin 5'-Nukleotidase nach Kurzzeithypoxie.....	75
4.2.5	Einfluss von Noradrenalin auf die Expression der P5N-I in primitiven Erythrozyten.....	76
V	Diskussion.....	78
VI	Zusammenfassung	88
VII	Literaturverzeichnis.....	90

I Einleitung

1 Die Rolle der Pyrimidin 5'-Nukleotidase im Pyrimidinstoffwechsel von Erythrozyten

Während der Differenzierung von Erythrozyten kommt es zu einem Abbau von über 90 % der zellulären RNA [Rapoport 1986]. Dabei entstehen durch Ribonukleasen die entsprechenden Nukleosidmonophosphate. Diese können durch Nukleotidkinasen weiter zu Nukleosiddiphosphaten und Nukleosidtriphosphaten phosphoryliert werden. Für Pyrimidinnukleosidmonophosphate existiert außerdem die Möglichkeit des Abbaus durch die Pyrimidin 5'-Nukleotidase (P5N): Dieses Enzym hydrolysiert 5'-Pyrimidinnukleosidmonophosphate (5'-UMP bzw. 5'-CMP) zu den entsprechenden Nukleosiden (Uridin bzw. Cytidin) und Phosphat. Das nachfolgende Schema zeigt am Beispiel von UMP einen Überblick über die möglichen Wege des Pyrimidinnukleotidstoffwechsels in den Erythrozyten:



Die entstehenden Nukleoside können die Zellen über Nukleosidtransporter verlassen [Jarvis et al. 1982, Liang und Johnstone 1992]. Die Hydrolyse von UMP oder CMP durch die Pyrimidin 5'-Nukleotidase ist somit der entscheidende Schritt für die Verringerung des Pyrimidinnukleotidpools der Erythrozyten. Die Pyrimidin 5'-Nukleotidase ist überwiegend in Humanerythrozyten untersucht worden [Valentine et al. 1974, Amici et al. 2000, Marinaki et al. 2001], allerdings fehlte bisher ein geeignetes System, um die Steuerung der Genexpression während der erythroiden Differenzierung zu verfolgen.

2 Eigenschaften der Pyrimidin 5'-Nukleotidase

Die Pyrimidin 5'-Nukleotidase gehört zur Enzymklasse der 5'-Nukleotidasen (EC 3.1.3.5), die Nukleosidmonophosphate durch Hydrolyse zu Nukleosiden und Phosphat umsetzen. Je nach ihrer Substratspezifität können die einzelnen Vertreter dieser Enzymklasse in weitere Gruppen unterteilt werden: *high* K_M Nukleotidasen, die Purinnukleotide als Substrate bevorzugen [Itoh et al. 1986, Spychala et al. 1988], *low* K_M Nukleotidasen, mit niedrigen K_M -Werten gegenüber Purin- und Pyrimidinnukleotiden [Madrid-Marina und Fox 1986], und die 5'(3')-Nukleotidasen [Fritzson und Smith 1971, Höglund und Reichard 1990, Rampazzo et al. 2000]. Letztere Gruppe setzt vor allem 5'-Desoxypyrimidinnukleotide sowie 3'-Pyrimidinnukleotide um.

Valentine et al. [1974] berichteten erstmals von einer 5'-Nukleotidase in Humanerythrozyten mit einer Spezifität für Pyrimidinnukleotide. Ein erblicher Mangel der Enzymaktivität führt zu einer hämolytischen Anämie. Bei fehlender Aktivität der Pyrimidin 5'-Nukleotidase unterbleibt der Abbau der Pyrimidinnukleotide zu diffusionsfähigen Pyrimidinnukleosiden, die aus der Zelle ausgeschleust werden können. Als Folge kommt es zu drastisch erhöhten Konzentrationen von Pyrimidinnukleotiden [Torrance und Whittaker 1979], die aus dem RNA-Abbau der Zellen stammen. Die Erythrozyten zeigen außerdem eine deutliche basophile Tüpfelung aufgrund eines gehemmten Abbaus der ribosomalen RNA, sowie einen erhöhten Gehalt an reduziertem Glutathion, eine erniedrigte Aktivität der Ribosephosphat-Pyrophosphokinase und eine gesteigerte Aktivität der Pyrimidinnukleosidmonophosphat-Kinase [Lachant et al. 1987]. Durch die erhöhten Nukleotidkonzentrationen werden die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der Pentosephosphatweg gehemmt [Tomoda et al. 1982].

Spätere Untersuchungen mit Hämolysaten von Patienten mit erblichem Defekt an Pyrimidin 5'-Nukleotidase zeigten, dass diese zwar eine deutlich verminderte Aktivität gegenüber CMP, UMP und dCMP aufwiesen, jedoch dUMP und dTMP mit normaler Aktivität umgesetzt wurden [Paglia et al. 1983, Swallow et al. 1983a]. Diese Ergebnisse deuteten auf die Existenz von zwei unabhängigen Enzymen hin [Paglia et al. 1984, 1987], die auch durch chromatographische Verfahren teilweise voneinander getrennt werden konnten [Hirono et al. 1985]. Amici et al. [1991, 1994] isolierten und charakterisierten die beiden Isoenzyme P5N-I und P5N-II aus Humanerythrozyten. P5N-I besitzt eine hohe Spezifität für die Substrate UMP, CMP und dCMP. P5N-II dagegen weist ein breiteres Substratspektrum mit der größten Aktivität gegenüber Desoxyribonukleotiden und 3'-Nukleotiden auf. P5N-II zeigt somit große Ähnlichkeit mit den oben erwähnten 5'(3')-Nukleotidasen [Rampazzo et al. 2000]. Beide Isoenzyme besitzen außerdem die Eigenschaften einer

Phosphotransferase [Amici et al. 1997]. P5N-I wird durch Schwermetallionen wie Blei, Cadmium, Kupfer und Quecksilber stark gehemmt, während die Aktivität von P5N-II wesentlich unempfindlicher auf die Gegenwart von Blei reagiert [Paglia et al. 1999]. Die Symptome einer Bleivergiftung entsprechen dabei der hämolytischen Anämie infolge mangelnder Aktivität von P5N-I.

Swallow et al. [1983b] konnten in den Erythrozyten von Ratten und Mäusen jeweils Aktivitäten der P5N-I und P5N-II feststellen. Die beiden Isoenzyme aus den Erythrozyten von Ratten wurden ebenfalls gereinigt und charakterisiert [Hokari et al. 1998]. Die Eigenschaften dieser Enzyme sind vergleichbar mit den Isoenzymen aus Humanerythrozyten. Hokari et al. [2001b] konnten bei Ratten in anderen Geweben kein der P5N-I entsprechendes Enzym finden, während Swallow et al. [1983b] in verschiedenen Gewebeproben von Ratten, Mäusen und Hamstern jeweils Aktivitäten feststellten, die den beiden Isoenzymen entsprachen. Weitere Enzymaktivitäten mit einer Spezifität gegenüber UMP und CMP konnten z. B. bei Hühnern in der Leber [Calvaruso und Taibi 1985] sowie im Gehirn und Herz [Wegelin et al. 1990] gefunden werden. Allerdings fehlt in diesen Fällen eine genaue Charakterisierung, die eine Identifizierung als P5N-I erlaubt.

Wenngleich die Funktion der Pyrimidin 5'-Nukleotidase in den kernlosen Erythrozyten bereits gut verstanden ist, existieren kaum Daten über die Regulation der Enzymaktivität während der erythroiden Differenzierung. Es ist lediglich bekannt, dass in Retikulozyten, die noch aktiv RNA abbauen, die Aktivität der P5N-I höher ist als in den reifen Erythrozyten [Valentine et al. 1974, Hokari et al. 2001b].

Embryonale Erythrozyten stellen ein geeignetes System dar, um die Regulation während der Differenzierung zu verfolgen, da sie den größten Teil ihrer terminalen Differenzierung in der Blutbahn vollziehen. Insbesondere der Vogelembryo bietet hervorragende experimentelle Möglichkeiten.

Im folgenden soll zunächst auf den Ablauf der Erythropoese beim Hühnerembryo eingegangen werden und sodann auf bislang vorliegende Befunde zur Regulation der Pyrimidin 5'-Nukleotidase in diesem System.

3 Entwicklung der Erythrozyten im Hühnerembryo

Die ersten hämoglobinhaltigen Zellen bilden sich im bebrüteten Hühnerei nach 26 bis 38 Stunden in den Blutinseln des Dottersacks [Bruns und Ingram 1973]. Diese erste Population von primitiven Erythrozyten bildet embryonale Hämoglobinarten (P, P', E und M) [Brown und Ingram 1974] und ist die vorherrschende Population bis zum sechsten Entwicklungstag. Diese Zellen werden als unreife Erythroblasten in die Blutbahn entlassen, wo sie die restlichen Zellteilungen und ihre terminale

Differenzierung vollziehen. Ab Tag sechs erscheint die erste Population immaturer definitiver Erythrozyten im embryonalen Kreislauf. Diese definitiven Erythrozyten stammen wie die primitiven aus dem Dottersack und produzieren neben der vorübergehend auftretenden Hämoglobinart H die adulten Hämoglobinarten A und D [Bruns und Ingram 1973]. Während in Blutzellen adulter Hühner ein Verhältnis von Hb A zu Hb D von etwa 3:1 gefunden wird, enthalten die ersten definitiven Erythrozyten allerdings mehr Hb D als Hb A. Der Übergang von embryonalen zu adulten Hämoglobintypen erfolgt bei Vogelerthrozyten durch das Auftreten verschiedener Zelllinien [Beaupain 1985] anstelle veränderter Expression innerhalb einer Zelllinie.

Der Dottersack besitzt nur ein begrenztes Reservoir von Stammzellen ohne Fähigkeit zur Selbsterneuerung [Dieterlen-Lievre 1987], wodurch die Anzahl der primitiven und ersten definitiven Erythrozyten begrenzt wird. Die erste Population definitiver Erythrozyten ist aufgrund ihrer kurzen Lebensdauer am 14. Entwicklungstag fast vollständig aus dem Kreislauf verschwunden [Lemez 1977]. Die Stammzellen für die permanente Produktion definitiver Erythrozyten sind intraembryonalen Ursprungs (aus der Aortenwand) [Cormier und Dieterlen-Lievre 1988]. Diese Zellen besiedeln den Dottersack, um dort ihre erythropoetische Entwicklung aufzunehmen [Lassila et al. 1982]. Auch bei Säugetieren tritt eine intraembryonale Population von hämatopoetischen Stammzellen auf, die aus der sogenannten AGM-Region (Aorta, Gonaden, Mesonephros) stammt [Medvinsky et al. 1993, Zon 1995].

Embryonale Erythrozyten sind während der ersten zwei Drittel der Entwicklung noch zu Transkription und Translation befähigt. Erst in der letzten Woche erfolgt die Reifung zum muren Erythrozyten, der zwar noch kernhaltig ist, aber seine Transkription und Translation eingestellt hat [Bruns und Ingram 1973, Tobin et al. 1983].

4 Gasaustausch im Vogelembryo

Der Gasaustausch des Embryos mit seiner Umgebung erfolgt durch Diffusion über die Poren der Eischale und die darunter liegenden Schalenmembranen [Paganelli et al. 1975, Rahn et al. 1979]. Während der Atemgastransport innerhalb des Eis unmittelbar nach der Bebrütung noch durch reine Diffusion erfolgt, bildet der vaskularisierte Teil des Dottersacks (*area vasculosa*) am Ende des ersten Tages mit dem Embryo einen geschlossenen Kreislauf. Dieses Gefäßsystem breitet sich zunehmend weiter aus und übernimmt den Transport von Nährstoffen sowie der Atemgase [Ciotto und Arangi 1989]. Etwa ab dem achten Tag übernimmt die Chorioallantoismembran die Rolle des primären Atemorgans. Dieses extraembryonale Kapillarnetzwerk entwickelt sich entlang der inneren Schalenmembran

und kleidet diese etwa ab dem zwölften Entwicklungstag vollständig aus [Freeman und Vince 1974, Ackerman und Rahn 1981].

Die luftgefüllte Blase am stumpfen Ende des Eis vergrößert sich aufgrund der stetigen Abgabe von Wasserdampf während der Embryogenese. Am 19. Entwicklungstag durchstößt der Vogelfötus mit seinem Schnabel die innere Membran zur Luftblase hin (*internal pipping*) und beginnt mit der Lungenatmung. In der verbleibenden Zeit bis zum Schlüpfen des Vogels am 21. Tag vermindert sich die Beteiligung der Chorioallantoismembran am Gasaustausch kontinuierlich und die Umstellung auf Lungenatmung wird vollständig abgeschlossen [Rahn et al. 1979].

5 Anpassung der Erythrozytenfunktion des Hühnerembryos an veränderte Gasaustauschbedingungen

Während des Wachstums des Vogelembryos nimmt sein Sauerstoffbedarf etwa ab dem 9. Entwicklungstag beträchtlich zu. Bis Tag 16 steigt der O_2 -Verbrauch von 2 ml/h auf 22 ml/h [Høiby et al. 1983]. Ab dem 12. Entwicklungstag hat die Chorioallantoismembran ihre maximale Ausdehnung erreicht und eine Steigerung der Fläche für den Gasaustausch ist nicht mehr möglich, das heißt die maximale Diffusionskapazität ist erreicht. Durch die Diffusionslimitierung des Transports von O_2 und CO_2 ergeben sich für den Embryo etwa ab dem 10. Tag eine zunehmende Hypoxie und Hyperkapnie, die vor allem ab dem 13./14. Tag deutlich anwachsen [Wangensteen und Rahn 1970/71]. Zwischen Tag 10 und Tag 19 sinkt der pO_2 in der Chorioallantoisvene von 80-90 mm Hg auf 40-50 mm Hg, während der pCO_2 von 10 mm Hg auf 35-40 mm Hg steigt [Freeman und Misson 1970, Burton und Tullett 1985]. In der Chorioallantoisarterie, die sauerstoffarmes Blut vom Embryo zur Chorioallantoismembran transportiert, fällt der pO_2 im gleichen Zeitraum von 40 Torr auf 20 Torr, während der pCO_2 von 15 Torr auf 45 Torr steigt [Tazawa 1980].

Zur Kompensation dieser Entwicklung beobachtet man verschiedene Veränderungen im Blut: Während die korpuskulären Parameter der Erythrozyten (Einzelzellvolumen, Hämoglobingehalt, Hämoglobinkonzentration) in der zweiten Hälfte der Embryonalentwicklung weitgehend unverändert bleiben [Romanoff 1960], steigt die Erythrozytenzahl und damit der Hämoglobingehalt deutlich an. Zusätzlich wird in der Chorioallantois die Flussrate sowie das Gefäßvolumen gesteigert [Tazawa und Mochizuki 1977]. Die Sauerstoffbindungskurve des Hämoglobins verschiebt sich permanent nach links [Bartels et al. 1966]. Durch diese Anpassungen kann im Blut der Chorioallantoisvene eine Sauerstoffsättigung zwischen 85 und 90 % aufrecht erhalten werden [Tazawa 1971].

Zwischen Tag 8 und Tag 18 fällt der Halbsättigungsdruck des Hämoglobins von 70 mm Hg auf 30 mm Hg [Misson und Freeman 1972, Baumann und Baumann 1978]. Diese erhöhte Sauerstoffaffinität kommt hauptsächlich durch veränderte Konzentrationen der organischen Phosphatkomponenten im Blut zustande. Während IP_5 in adulten Vogelerthrozyten die regulierende Phosphatkomponente darstellt [Isaacks und Harkness 1980], wird die Sauerstoffaffinität in embryonalen Erythrozyten vor allem durch ATP, UTP und CTP geregelt [Baumann et al. 2003]. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass es während der embryonalen Entwicklung zu erheblichen Änderungen der Konzentrationen dieser Nukleotide sowie der Pyrimidin 5'-Nukleotidaseaktivität [Dragon et al. 1998] kommt. Abbildung 1 zeigt die Konzentrationen der Pyrimidinnukleotide UTP und CTP zusammen mit der Aktivität der Pyrimidin 5'-Nukleotidase während der Ontogenese:

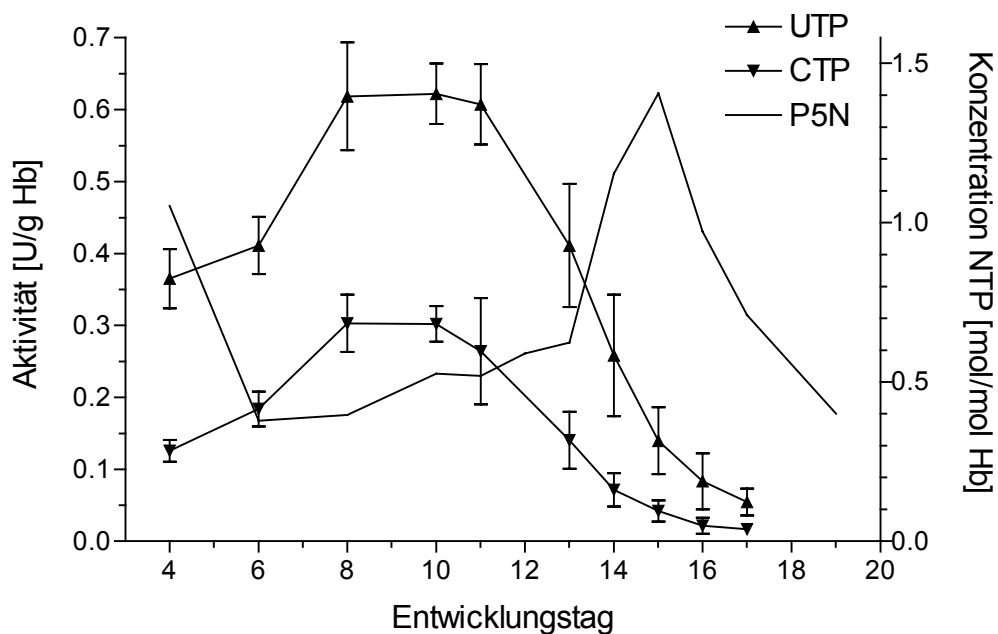


Abbildung 1: Verlauf der Konzentrationen von UTP und CTP [Baumann et al. 2003] sowie der Aktivität der Pyrimidin 5'-Nukleotidase (P5N) mit 5'-UMP als Substrat [Dragon et al. 1998] an verschiedenen Entwicklungstagen, jeweils bezogen auf den Hämoglobingehalt der Zellen.

Insbesondere zwischen Tag 8 und Tag 10 erreichen die Nukleotidkonzentrationen sehr hohe Werte. Diese Konzentrationen sind die höchsten, die für einen Zelltyp bekannt sind [Traut 1994]. Der Verlauf der Enzymaktivität korreliert sehr gut mit dem Verlauf der Konzentrationen von UTP und CTP, was die Bedeutung der Pyrimidin 5'-Nukleotidase für die Anpassung des Pyrimidinnukleotidgehalts in den Zellen unterstreicht.

Die Quelle für den Anstieg von UTP und CTP besteht im RNA-Abbau der Erythrozyten [Baumann et al. 2003]. Vor allem in primitiven Erythrozyten, die bis Tag 5 die erste Erythrozytenpopulation darstellen, kommt es innerhalb der ersten

Entwicklungstage zu deutlichen Änderungen des RNA-Gehalts, wie Abbildung 2 zeigt:

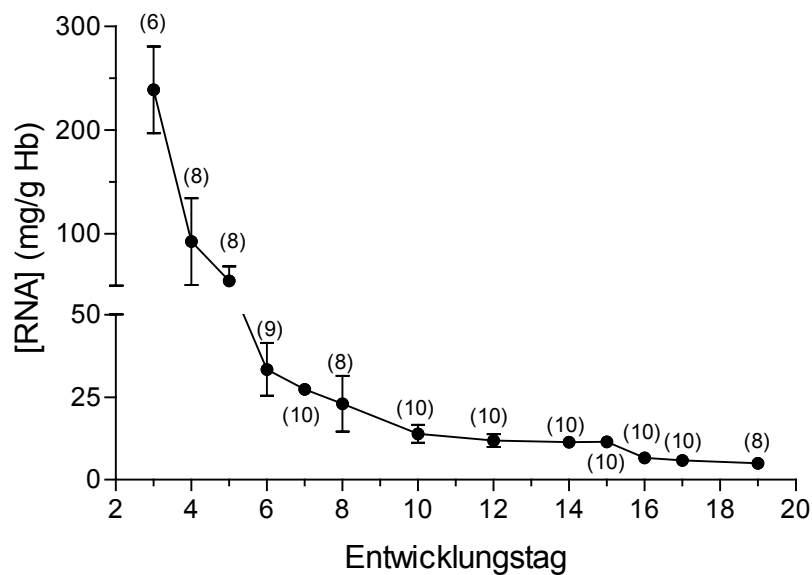


Abbildung 2: Mittelwert und SD des RNA-Gehalts von Hühnererythrozyten während der Ontogenese, bezogen auf den Hämoglobingehalt der Zellen [aus Baumann et al. 2003]. In Klammern Anzahl der einzelnen Messwerte.

Aus dem Abbau der RNA fallen daher an den frühen Entwicklungstagen große Mengen von Nukleosidmonophosphaten an. Im Falle eines geringen Abbaus von UMP und CMP infolge niedriger Pyrimidin 5'-Nukleotidaseaktivität können die Nukleotide durch entsprechende Nukleotidkinasen zu UTP und CTP phosphoryliert werden. Die Pyrimidin 5'-Nukleotidase übernimmt somit eine wichtige Rolle bei der Regulation der Sauerstoffaffinität des embryonalen Hämoglobins durch die Effektoren UTP und CTP.

Untersuchungen an definitiven Erythrozyten von Tag 11 zeigten, dass die Aktivität der Pyrimidin 5'-Nukleotidase *in vitro* durch Stimulierung der Adenylylcyclase über β_1 -adrenerge Rezeptoren und Adenosinrezeptoren vom Typ A_{2A} gesteigert wird [Dragon et al. 1998]. Dies legt nahe, dass die Enzymaktivität auch *in vivo* durch Katecholamine und Adenosin reguliert werden kann.

Seit langem ist bekannt, dass durch die zunehmende Hypoxie während der Ontogenese verschiedene Anpassungsvorgänge in den RBZ ausgelöst werden. So fällt ab der zweiten Woche die Konzentration des allosterischen Effektors ATP kontinuierlich ab [Misson und Freeman 1972], während ab Tag 14 die Konzentration des schwächeren Effektors 2,3-BPG zunimmt [Isaacks und Harkness 1975]. Dadurch erhöht sich die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins. Ab Tag 14 nimmt die bis dahin niedrige Aktivität der Carboanhydrase stark zu [Clark 1951], um den negativen Folgen der Hyperkapnie (Senkung des pH-Werts, verminderte Sauerstoffaffinität des Hämoglobins) entgegenzuwirken. Durch künstliche hypoxische Bebrü-

tung können diese Vorgänge in den Erythrozyten bereits zu früheren Zeitpunkten *in vivo* induziert werden [Baumann et al. 1983, 1986, Baumann 1984].

Ausgehend von diesem Befund wurden in unserer Arbeitsgruppe weitere Untersuchungen zur Regulation dieser Vorgänge unternommen. Dabei zeigte sich, dass embryonale Hühnererythrozyten auf ihrer Membranoberfläche β_1 -adrenerge Rezeptoren [Dragon et al. 1996] sowie Adenosinrezeptoren vom Typ A_{2A} [Glombitza et al. 1996] tragen, die über G-Proteine die Adenylylcyclase aktivieren. Die Stimulierung mit Effektoren bewirkt *in vitro* einen Anstieg der cAMP-Konzentration in den Zellen [Baumann et al. 1999]. Im embryonalen Plasma wurde ab Tag 13 ein Anstieg der bis dahin niedrigen Konzentration von Noradrenalin [Dragon et al. 1996] gemessen, während die Konzentrationen von Adrenalin und Dopamin über den ganzen Zeitraum niedrig blieben. Nach hypoxischer Bebrütung (1 h mit 13,5 % O_2) konnte im Plasma von 11 Tage alten Embryonen ebenfalls eine erhöhte Konzentration von Noradrenalin festgestellt werden. Dragon et al. [1999] führten *in vivo* Experimente mit den Rezeptorantagonisten Propranolol und DMPX von Tag 13 auf Tag 14 durch. Dabei wurde festgestellt, dass beide Rezeptortypen und damit auch Adenosin als Effektor an der *in vivo* Regulation der erythrozytären Konzentrationen von ATP und 2,3-BPG beteiligt sind.

6 Zielsetzung der Arbeit

Embryonale Hühnererythrozyten stellen ein ausgezeichnetes Modell dar, um die Zusammenhänge zwischen ihrer Entwicklung und ihrer Funktion zu untersuchen. Der Abbau von Zellorganellen und die Einstellung der Transkription erfolgen im Unterschied zu adulten Erythrozyten höherer Vertebraten in der Blutbahn. Das System bietet experimentellen Zugang zu Erythrozyten in verschiedenen Entwicklungsstadien.

Mehrere Prozesse in embryonalen Erythrozyten des Huhns sind cAMP-abhängig, darunter die Regulation der Pyrimidin 5'-Nukleotidase. Das Enzym ist mitentscheidend für die Anpassung der Konzentrationen der intrazellulären Pyrimidinnukleotide während der Entwicklung der Blutzellen. Aufbauend auf den bereits bekannten Ergebnissen für die Pyrimidin 5'-Nukleotidase wurden in der vorliegenden Arbeit drei vorrangige Ziele verfolgt, um weitere Einblicke in die Regulation des Enzyms in roten Blutzellen während ihrer Differenzierung zu gewinnen:

1. Charakterisierung und Isolierung der Pyrimidin 5'-Nukleotidase aus embryonalen Hühnererythrozyten, um die Proteinsequenz und Basensequenz des gereinigten Enzyms zu bestimmen.

2. Die Genexpression während des gesamten zugänglichen Entwicklungszeitraums wurde mit Hilfe der Sequenzinformation analysiert.
3. Der Einfluss von hormonellen Effektoren und von Umweltbedingungen (Hypoxie) auf die Expression der Pyrimidin 5'-Nukleotidase wurde untersucht.

II Abkürzungen

2,3-BPG	2,3-Bisphosphoglycerat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATF-1	Aktivierender Transkriptionsfaktor 1
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BS	Blockierungslösung
BSA	Rinderserumalbumin
CA II	Carboanhydrase Isoenzym II
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[N-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CMP	Cytidin-5'-monophosphat
CPCA	5'-(N-cyclopropyl)-carboxamidoadenosin
CREB	cAMP Response Element Bindungsprotein
CREM	cAMP Response Element Modulator
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCMP	Desoxycytidin-5'-monophosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
Dig	Digoxigenin
DMPX	3,7-Dimethyl-1-propargylxanthin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dTMP	Desoxythymidin-5'-monophosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUMP	Desoxyuridin-5'-monophosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
GT	Guanidiniumthiocyanat

Hb	Hämoglobin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIC	hydrophobe Chromatographie
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
I.E.	Internationale Einheiten
IEC	Ionenaustauschchromatographie
IMP	Inosin-5'-monophosphat
IP ₅	Inositolpentaphosphat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K _M	Michaelis-Konstante
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MCHC	Mittlere Hämoglobinkonzentration im Erythrozyten
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
NE	Noradrenalin (Norepinephrin)
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
P5N-I	Pyrimidin 5'-Nukleotidase Isoenzym I
P5N-II	Pyrimidin 5'-Nukleotidase Isoenzym II
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
pCO ₂	Kohlendioxid-Partialdruck
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pfu	plaquebildende Einheiten
P _i	anorganisches Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
Prop	Propranolol
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RBZ	Rote Blutzellen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender PCR
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer

TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMP	Thymin-5'-monophosphat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UDPG	Uridin-5'-diphosphoglucuronat
UMP	Uridin-5'-monophosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat
VEGF	Vascular endothelial growth factor

III Material und Methoden

1 Material

1.1 Geräte

Autoklav Typ Tuttnauer 2540 EK	Systec, Wettenberg
Brutschrank mit Wendeautomatik	Grumbach, Wetzlar
Elektrophoresekammern:	
Protean II, Mini-Protean II	Bio-Rad, München
Geltrockner Typ GelAir	Bio-Rad, München
Halbmikroküvetten aus OS/QS	Hellma, Müllheim/Baden
Heizblöcke:	
Thermomixer 5437	Eppendorf, Hamburg
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld, Gehrden
HPLC:	
Gradientenpumpe 2249	Pharmacia, Freiburg
UV-Monitor VWM 2141	Pharmacia, Freiburg
Gradientenmischer	Pharmacia, Freiburg
Probeninjektor 9725i	Rheodyne, Bensheim
Säule Hibar 250-4 LiChrosorb RP-18 (10 µm)	Merck, Darmstadt
Hybridisierungssofen Typ OV4	Biometra, Göttingen
Kühlzentrifugen:	
Typ GS-15R	Beckman, München
Typ RC 5C Plus	Sorvall (Du Pont), Bad Homburg
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach
Mikrotiterplattenphotometer Typ 550	Bio-Rad, München
Mikrowellengerät	Sharp
Millipore-Wasserfilter Milli-Q® UF Plus	Millipore, Eschborn
Multi-Imager Fluor-S	Bio-Rad, München
Netzanschlussgeräte:	
PowerPac 200	Bio-Rad, München
Power Supply 2103	LKB, München
pH-Elektrode Typ 102-M6-S7	Ingold Messtechnik, Steinbach
pH-Meter Typ 763 multicalimatic	Knick, Berlin
Photometer Typ DU-64	Beckman, München
Rührzellen für Ultrafiltration:	
Modell 12, Modell 52, Modell 202	Amicon, Witten

Säulenchromatographie:

Pumpe P3	Pharmacia, Freiburg
Fraktionssammler Frac-200	Pharmacia, Freiburg
UV-Monitor UA-5	ISCO, Lincoln, USA
Maxi Coldlab 2021	LKB, München
Schüttelinkubator Innova 4000	New Brunswick Scientific, Nürtingen
SpeedVac-Konzentrator SVC 100H	Savant, Hicksville
Thermocycler Genius	Thermo-Dux, Wertheim/Main
Tischvortex Modell Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Tischzentrifugen:	
EBA III	Hettich, Tuttlingen
Typ 5412	Eppendorf, Hamburg
Biofuge Pico	Heraeus, Hanau
Transferzelle für Western-Blot:	
Trans-Blot SD Semi-Dry	Bio-Rad, München
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
Ultraschallbad Sonorex RK 100	Bandelin
UV-Schirm Faust N 90	Konrad Benda, Wiesloch
UV-Crosslinker Fluo Link	Vilber Lourmat, Marne la Vallee, Frankreich
Vakuumölpumpe	Pfeiffer Vakuumtechnik, Wetzlar
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbadlängsschüttler Typ 1083	GFL, Burgwedel
Wasserbad mit Thermostat Typ PC/4	Julabo, Seelbach
Wipptisch	Biometra, München

1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Thermo Tubes 0,5 ml für PCR	Advanced Biotechnologies, Hamburg
Plasmid pUC18, Sephacryl S100 HR, Sephadex G25 SF, Sephadex G75 SF	Amersham Pharmacia, Freiburg
Ethanol absolut	Baker, Deventer, Niederlande
Reagenzröhrchen Falcon (15 ml und 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Ham's Medium F-10 (Seromed)	Biochrom, Berlin

DTT	Biomol, Hamburg
APS, Bio-Beads SM-4, EconoPac Methyl HIC Fertigsäule, Hydroxyapatit Macro-Prep Ceramic Type I, Mercaptoethanol	Bio-Rad, München
SeaKem LE Agarose, PCR-Tubes 0,2 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf
Agar, Bacto tryptone, Bacto yeast extract, Gelatine, Maltose, NZYM Broth	Difco, Augsburg
Reaktionsgefäße 2 ml Safe-Lock	Eppendorf, Hamburg
N-Lauroylsarcosin	Fluka, Neu-Ulm
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Eggenstein
Mikrotiterplatten (96-well), Petrischalen (94 mm)	Greiner, Kremsmünster, Österreich
NucleoSpin Extract Kit, Nylonmembranen Porablot NY amp 82 mm, Proteinase K	Macherey-Nagel, Düren
Diaflo Ultrafiltrationsmembranen YM-10 (Amicon), Mikrokonzentratoren Microcon YM-10	Millipore, Eschborn
Biotrace PVDF Blotmembranen	Pall Gelman, Dreieich
PanScript taq-Polymerase, NH ₄ -Puffer, MgCl ₂ - Lösung (alle für PCR)	PAN Biotech, Aidenbach
Chromatographiesäulen aus Polypropylen	Pierce, Rockford, USA
Forskolin	RBI Biotrend, Köln
Chromatographiesäulen aus Glas	Reichert Chemietechnik, Heidelberg
Anti-Digoxigenin-AP, Blockierungsreagenz, CDP- Star, Dig Easy Hyb, Digoxigenin-11-dUTP, Liquemin (Heparin-Natrium)	Roche, Mannheim
Borsäure, dNTPs für PCR, Fertiglösung 30 % Acrylamid (37,5:1), Guanidiniumthiocyanat, KCl, KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , Natriumacetat, Phenol (Aqua Roti-Phenol), Roti-Quant (Bradford-Reagenz),	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Dialyseschläuche Visking MWCO 12000-14000, TEMED	Serva, Heidelberg
Tris	USB, Cleveland, USA
DE 52, Chromatographiepapier 3MM	Whatman, Maidstone, UK

1.3 Puffer, Medien und Lösungen

Für alle Lösungen wurde Wasser aus einer Millipore Anlage verwendet. Lösungen für molekularbiologische Methoden wurden in der Regel autoklaviert und/oder sterilfiltriert.

Stammlösungen:

EDTA	0,5 M; mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt
PMSF	0,25 M in Ethanol abs.
Tetracyclin	5 mg/ml in 70 % Ethanol

Waschpuffer für Erythrozyten:	120 mM NaCl
	4 mM KCl
	1,5 mM CaCl_2
	5 mM Glucose
	50 mM Tris-HCl; pH 7,4 bei RT

ACD-Puffer	4,7 g/l Citronensäure-Monohydrat
für Blut adulter Hühner:	16 g/l Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
	126 mM Glucose

Hämoglobinbestimmung

Transformationslösung:	1 g/l NaHCO_3
	200 mg/l $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$
	50 mg/l KCN

in vitro Inkubationen

Ham's Medium F-10	mit Zusatz von 20 mM HEPES pH 7,2 bei 37 °C mit NaOH
Actinomycin D	10 mM in DMSO
CPCA	10 mM in DMSO
Forskolin	100 mM in DMSO
Noradrenalin	10 mM in H_2O , frisch angesetzt

Puffer für Säulenchromatographie

HPLC-Puffer	100 mM KH_2PO_4 ; pH 6,0 mit NaOH 8 % Methanol
-------------	---

Tris-Puffer	50 mM Tris·HCl; pH 7,5 bei RT 1 mM DTT 0,5 mM EDTA 0,5 mM PMSF, frisch zugeben aus Stammlösung
-------------	---

SDS-Gelelektrophorese

SDS-Probenpuffer:	62,5 mM Tris·HCl; pH 6,8 bei RT 10 % Glycerin (v/v) 0,025 % Bromphenolblau (w/v) 2 % SDS 5 % 2-Mercaptoethanol, frisch zugeben
-------------------	--

Elektrodenpuffer	25 mM Trisbase 192 mM Glycin 0,1 % SDS
------------------	--

Sammelgel	125 mM Tris·HCl; pH 6,8 bei RT 0,1 % SDS 0,1 % TEMED (v/v) 1,35 g/l APS
-----------	--

Trenngel	375 mM Tris·HCl; pH 8,8 bei RT 0,1 % SDS 0,08 % TEMED (v/v) 0,9 g/l APS
----------	--

Fixierlösung für Gelfärbung	50 % Methanol 10 % Essigsäure
-----------------------------	----------------------------------

Färbelösung	0,1 % Coomassie Brilliantblau R 250 50 % Methanol 10 % Essigsäure
-------------	---

Entfärbelösung	5 % Methanol 7 % Essigsäure
----------------	--------------------------------

Western-Blot

Transferpuffer	25 mM Trisbase 192 mM Glycin 0,1 % SDS 20 % Methanol
----------------	---

Färbelösung	0,025 % Coomassie Brilliantblau R 250 7 % Essigsäure (v/v) 40 % Methanol (v/v)
-------------	--

Entfärbelösung	50 % Methanol (v/v)
----------------	---------------------

RNA-Isolierung

PBS (Phosphate buffered saline)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 mit HCl
------------------------------------	--

GT-Lösung:	4 M Guanidiniumthiocyanat 25 mM Natriumcitrat; pH 7,0 mit HCl 0,5 % N-Lauroylsarcosin zu 50 ml Lösung werden 360 µl 2-Mercaptoethanol frisch zugegeben, die Lösung ist dann einen Monat bei RT haltbar.
------------	---

2 M Natriumacetat	mit Essigsäure auf pH 4,0 einstellen
-------------------	--------------------------------------

Phenol	Aqua Roti-Phenol (Roth, Karlsruhe)
--------	------------------------------------

Northern-Blot

Agarose-Formaldehydgel	1 % Agarose 2 % Formaldehyd 1 x MOPS-Puffer
------------------------	---

10 x MOPS-Puffer	200 mM MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA pH 7,0 mit NaOH einstellen, sterilfiltrieren
------------------	--

Auftragspuffer	180 µl Formamid 40 µl 10 x MOPS 65 µl Formaldehyd (37 %) 50 µl H ₂ O, steril 20 µl Glycerin 20 µl gesättigtes Bromphenolblau
----------------	--

Agarose-Gelelektrophorese

TBE-Puffer 10 x	108 g/l Trisbase
	55 g/l Borsäure
	20 mM EDTA

Für die Elektrophorese wurde der Puffer 1:20 verdünnt.

TAE-Puffer 50 x	242 g/l Trisbase
	5,71 % Essigsäure (v/v)
	50 mM EDTA

Für die Elektrophorese wurde der Puffer 1:50 verdünnt.

Auftragslösung für DNA	50 % Glycerin (v/v)
	0,25 % Bromphenolblau (w/v)
	1 mM EDTA

Kulturbedien für Bakterien und Phagen

LB Medium	10 g/l NaCl
	10 g/l Bacto tryptone
	5 g/l Bacto yeast extract

LB-Tetracyclin Agar	10 g/l NaCl
	10 g/l Bacto tryptone
	5 g/l Bacto yeast extract
	20 g/l Agar

Nach dem Autoklavieren 12,5 mg/l Tetracyclin aus Stammlösung zugeben.

NZY Medium	21 g/l NZYM Broth
------------	-------------------

NZY Agar	21 g/l NZYM Broth
	15 g/l Agar

NZY Topagar	21 g/l NZYM Broth
	0,7 % Agarose (w/v)

SM-Puffer	5,8 g/l NaCl
	2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	50 mM Tris-HCl; pH 7,5
	0,01 % Gelatine (w/v)

1 M MgSO_4	Stammlösung, steril
---------------------	---------------------

10 mM MgSO_4	steril
-----------------------	--------

20 % Maltose	steril
--------------	--------

2 % Gelatine (w/v)	Stammlösung, steril
--------------------	---------------------

Screening der cDNA-Bank

Denaturierungslösung	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung	1 M Tris·HCl 1,5 M NaCl pH 7,4 bei RT
20 x SSC	3 M NaCl 300 mM Natriumcitrat pH 7,0
Proteinase K	2 mg/ml in 2 x SSC
Waschlösung 2 x	0,1 % SDS in 2 x SSC
Waschlösung 0,5 x	0,1 % SDS in 0,5 x SSC
Waschpuffer (Fertigpuffer, Roche, Mannheim)	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl pH 7,5 bei 20 °C 0,3 % Tween 20
Maleinsäurepuffer (Fertigpuffer, Roche, Mannheim)	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl pH 7,5 bei 20 °C
Blockierungsreagenz (10 x)	10 % (w/v) in Maleinsäurepuffer
Blockierungslösung	Blockierungsreagenz (10 x) 1:10 mit Maleinsäurepuffer verdünnen
Detektionspuffer	100 mM Tris·HCl 100 mM NaCl pH 9,5 bei RT
Anti-Digoxigenin-AP	750 U/ml Anti-Digoxigenin, Fab Fragmente konjugiert mit Alkalischer Phosphatase

1.4 Molekulargewichtsstandards**Proteinstandards**

SDS-PAGE Standard, low range (Bio-Rad, München)

Molekulargewichte (kDa): 97,4; 66,2; 45,0; 31,0; 21,5; 14,4

Vor dem Auftragen auf das Gel 1:20 mit SDS-Probenpuffer verdünnt.

PeqGOLD Protein-Marker (Peqlab, Erlangen)

Molekulargewichte (kDa): 116,0; 66,2; 45,0; 35,0; 25,0; 18,4; 14,4

PeqGOLD Prestained Protein-Marker (Peqlab, Erlangen)

Molekulargewichte (kDa): 121,6; 81,4; 46,8; 32,0; 24,5; 20,4

DNA- und RNA-Standards

Alle DNA-Standardlösungen wurden mit autoklaviertem und sterilfiltriertem Millipore Wasser angesetzt.

50 base-pair ladder (Amersham, Freiburg)

Fragmentlänge in Schritten von 50 bp

10 µl Standard

5 µl Auftragslösung für Agarosegele

35 µl H₂O

1 kb Leiter (Peqlab, Erlangen)

Fragmentlänge (bp): 250-10000

10 µl Standard

10 µl Auftragslösung für Agarosegele

80 µl H₂O

Lambda DNA/Bst EII Marker (Biomol, Hamburg)

Fragmentlänge (bp): 117-8453

20 µl Standard

10 µl Auftragslösung für Agarosegele

70 µl H₂O

RNA-Längenstandard I, Digoxigenin-markiert (Roche, Mannheim)

Fragmentlänge (nt): 310-6948

1.5 Oligonukleotide

Alle verwendeten Primer für die PCR und DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

Geeignete Primersequenzen wurden mit Hilfe des Programms *Primer 3* ausgewählt. Die Zusätze (s) oder (as) in den Bezeichnungen der Primer beziehen sich auf die Orientierung *sense* oder *antisense* zum codierenden Strang der DNA. Die Zahlen hinter den Sequenzen bezeichnen die Position in der cDNA-Sequenz der Pyrimidin 5'-Nukleotidase (siehe Ergebnisse). Die Primer V1(s) und V1(as) stammen aus der Sequenz des ZAP Express Vektors und liegen jeweils wenige Basen von dessen Klonierungsstelle entfernt.

terminus(s)	5'-ATHACNGAYTTYGAYATG-3'	316-333
peptid2(as)	5'-YTCNCCYTTRAANCC-3'	781-795
sonde1(s)	5'-TGTCCAACCTTGCCATAACATCATTG-3'	367-391
sonde1(as)	5'-CAAGAATGTCTCCAATCCCAGC-3'	670-691
V1(s)	5'-CGCCTGCAGGTCGACACTAG-3'	
V1(as)	5'-CGCGGCCGCTCTAGAAGTAC-3'	
seq1(s)	5'-CTGGGATTGGAGACATTCTTG-3'	671-691
seq2(as)	5'-CAATAGTGAGGGCTGGGTC-3'	469-487
seq3(s)	5'-TGTGATAAACTGCTTCTGATGG-3'	1316-1337

R=A oder G; Y=C oder T; H=A, C oder T; N=A, C, G oder T.

Für die Untersuchung der Expression des ribosomalen Proteins S17 (Acc# X07257) bzw. von β -Globin (Acc# V00409) wurden folgende Primer eingesetzt:

β -Globin(s)	5'-CAGAGGTTCTTTGCGTCC-3'
β -Globin(as)	5'-TAGGTGCTCCGTGATCTT-3'
s17(s)	5'-ACACCCGTCTGGGCAACGAC-3'
s17(as)	5'-CCCGCTGGATGCGCTTCATC-3'

Für die reverse Transkription von RNA wurden Random Hexamer Primer pd(N)₆ der Firma Pharmacia (Freiburg) verwendet.

1.6 Bakterien und Vektoren

XL1-Blue MRF' (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)

ZAP Express Vektor (Stratagene)

2 Methoden

2.1 Gewinnung embryonaler Erythrozyten

Befruchtete Hühnereier der Rasse *White Leghorn* wurden von der *Brütereier Süd* in Regensburg bezogen und maximal eine Woche bei 10 °C gelagert. Die Eier wurden in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37,5 °C und 60 % relativer Luftfeuchtigkeit bebrütet. Mit Hilfe einer Wendautomatik wurden die Eier sechsmal pro Tag gewendet, um eine natürliche Entwicklung zu gewährleisten.

Am entsprechenden Entwicklungstag wurden die Eier aus dem Brutschrank entnommen, ohne ihre Lage und damit die Position des Embryos an der Oberseite zu verändern. Jedes Hühnerei wurde vom stumpfen Ende ausgehend über der Luftblase vorsichtig mit einer Pinzette geöffnet und die Schale sowie die darunter

liegenden Häute entfernt, ohne dabei den Dottersack zu verletzen. Anschließend wurde die im Ei angesammelte freie Flüssigkeit abgegossen und ein großes extraembryonales Blutgefäß durchschnitten. Das austretende Blut wurde mit einer Pasteurpipette aufgesaugt und in ein eisgekühltes Gefäß mit Waschpuffer gegeben. Pro Ei wurde etwa 1 ml Waschpuffer vorgelegt, der ungefähr 2 I.E./ml Heparin enthielt.

Das gesammelte Gemisch wurde in Zentrifugengläser überführt und bei 4 °C mit einer Tischzentrifuge der Firma Hettich drei Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die gesammelten Erythrozyten wieder mit Waschpuffer aufgeschwemmt. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Mit dieser Methode wurden am 15. Bebrütungstag im Durchschnitt etwa 200 µl gepackte Erythrozyten pro Ei erhalten.

Für die Bestimmung der Pyrimidin 5'-Nukleotidaseaktivität (siehe Kapitel III.2.3) wurden 50 µl gepackte Erythrozyten mit 50 µl Waschpuffer versetzt, in flüssigem N₂ eingefroren und bis zum Aktivitätstest bei -80 °C aufbewahrt. Zur Gewinnung von Hämolysat für die Isolierung der Pyrimidin 5'-Nukleotidase wurden die gepackten Zellen mit dem gleichen Volumen NaCl-Lösung (3 g/l NaCl, 5 mM EDTA und 1 mM DTT) verdünnt, in flüssigem N₂ eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Als Ausgangsmaterial für die Enzymreinigung wurde auch Blut adulter Hühner getestet. Als Vorprobe wurde das Blut zwei Monate alter freilaufender Hühner auf seine Pyrimidin 5'-Nukleotidaseaktivität untersucht. Beim Schlachtvorgang wurden mit einem verschraubbaren Polypropylengefäß, in dem 50 ml eiskalter Waschpuffer mit einigen Tropfen Heparinlösung vorgelegt waren, etwa 25 ml Blut aufgefangen. Das Gefäß wurde während des Transports mit Eis gekühlt. Die Erythrozyten wurden wie embryonale Blutzellen weiterverarbeitet.

Das Blut adulter Hühner für die Reinigung des Enzyms stammte von etwa 35 Tage alten Hühnern der Rasse *White Leghorn*, die bei der Firma Wiesenhof in Bogen geschlachtet wurden. In einem Plastikeimer wurde 1 Liter vorgekühlter ACD-Puffer (Citrat-Dextrose-Puffer) vorgelegt und etwa 4 Liter Blut von unmittelbar zuvor geschlachteten Hühnern aufgefangen. Das Gemisch wurde in verschließbare Plastikgefäße umgefüllt, die während des Transports mit Eis gekühlt wurden. Die Erythrozyten wurden in einer Zentrifuge (UJ III, Heraeus-Christ, Osterode) 10 min mit 3000 g abgetrennt und dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Nach jedem Waschvorgang wurden die Zellen für 10 min mit 3000 g zentrifugiert. Die gepackten Zellen wurden wie embryonale Erythrozyten mit NaCl-Lösung versetzt und eingefroren.

2.2 Inkubationsversuche mit Erythrozyten

Für *in vitro* Inkubationsversuche zur Stimulierung der Aktivität der Pyrimidin 5'-Nukleotidase wurden gepackte Erythrozyten des elften Entwicklungstages eingesetzt. Zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung liegt die Enzymaktivität noch bei niedrigen Werten [Dragon et al. 1998], so dass eine eventuelle Aktivitätssteigerung nach experimenteller Stimulierung gut erkannt werden kann. Außerdem ist das Blutvolumen an Tag 11 ausreichend, um eine entsprechende Menge Erythrozyten zu erhalten (im Durchschnitt 50 µl pro Ei). Die Zellen wurden wie in Kapitel III.2.1 beschrieben gewonnen und nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer zu einem Pool vereinigt. Für die Bestimmung des Ausgangswerts der Enzymaktivität vor der Inkubation wurden 50 µl Erythrozyten mit 50 µl Waschpuffer vermischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Messung der Aktivität bei -80 °C gelagert. Die restlichen Zellen wurden bei 37 °C in einem Wasserbadlängsschüttler inkubiert. Die Versuche wurden in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt, deren Deckel mit Hilfe einer Kanüle mit zwei kleinen Öffnungen versehen wurden, um einen Gasaustausch mit der Umgebung zu ermöglichen. Die einzelnen Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 1 ml enthielten folgende Komponenten:

40 µl gepackte Erythrozyten

100 µl FCS

verschiedene Effektoren, aus Stammlösung zugegeben

Das restliche Volumen bestand aus Ham's Medium F-10, mit 20 mM HEPES-Puffer versetzt und bei 37 °C mit NaOH auf pH 7,2 titriert. Damit ergab sich für die Reaktionsansätze ein pH-Wert von 7,4.

Nach entsprechenden Inkubationszeiten wurden jeweils zwei Ansätze aus dem Wasserbad entnommen und wenige Sekunden abzentrifugiert. Die gepackten RBZ beider Ansätze wurden zusammen in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dreimal mit eiskaltem Waschpuffer gewaschen. Für die spätere Bestimmung der Pyrimidin 5'-Nukleotidaseaktivität wurden 50 µl gepackte Erythrozyten mit 50 µl Waschpuffer versetzt und wie die Probe für den Ausgangswert eingefroren.

2.3 Bestimmung der Pyrimidin 5'-Nukleotidaseaktivität

Der Aktivitätstest für die Pyrimidin 5'-Nukleotidase wurde nach der Methode von Amici et al. [1989] durchgeführt. Bei der enzymkatalysierten Reaktion von UMP und H₂O entstehen Uridin und anorganisches Phosphat. UMP und Uridin können mit Hilfe einer HPLC-Analyse voneinander getrennt und quantitativ bestimmt werden. Aus der entstandenen Menge an Uridin in einem bestimmten Zeitintervall kann die Enzymaktivität berechnet werden.

2.3.1 Durchführung des Aktivitätstests

Für alle Arbeitsschritte wurden 1,5 ml Reaktionsgefäße verwendet. Standardmäßig wurden folgende Lösungen und Volumina eingesetzt:

10 µl	0,5 M DTT
10 µl	1 M MgCl ₂
50 µl	1 M Tris-HCl, pH 7,5 bei RT
100 µl	Probe
820 µl	Millipore H ₂ O

Bei Abweichungen in der Probenmenge wurde die zugegebene Wassermenge entsprechend abgeändert. Für die Bestimmung der Enzymaktivität im Hämolysat wurden die entsprechend Kapitel III.2.1 gewonnenen Proben aufgetaut und 10 min bei 4 °C mit 14000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand für den Aktivitätstest eingesetzt.

Nach zehn Minuten Vorinkubation bei 37 °C in einem Blockthermostat wurde die Reaktion durch die Zugabe von 10 µl 0,1 M UMP gestartet. Unmittelbar nach dem Start wurden in zehnminütigen Abständen acht Proben von jeweils 100 µl entnommen und zu 50 µl eisgekühlter HClO₄-Lösung (1,2 M) gegeben, um die Proteine zu denaturieren und die Enzymreaktion zu stoppen. Zur vollständigen Fällung wurden die Proben 5 min auf Eis stehen gelassen, danach 5 min bei 4 °C mit 14000 g zentrifugiert und der Niederschlag verworfen. 130 µl Überstand wurden mit 35 µl eisgekühlter K₂CO₃-Lösung (1 M) neutralisiert und die Proben bis zur HPLC-Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

Die Aktivität von Hämolysaten wurde immer auf den Hämoglobingehalt bezogen, da Hämoglobin in Erythrozyten den größten Teil der Proteinmenge ausmacht. Dazu wurde in der Regel mit zwei Aliquots des Reaktionsansatzes eine Hämoglobinbestimmung (Kapitel III.2.4) durchgeführt und der Mittelwert der Hb-Konzentration berechnet.

2.3.2 HPLC-Analyse

Bei den Bestimmungen der Nukleotidkonzentrationen kam eine HPLC-Anlage der Firma Pharmacia zum Einsatz, bestehend aus folgenden Komponenten:

- Niederdruckmischkammer, in der verschiedene Laufmittel gemischt werden,
- Hochdruckpumpe, mit der verschiedene Flussraten eingestellt werden können,
- Probenschleife, mit deren Hilfe ein genau definiertes Volumen von 20 µl auf die Säule aufgetragen wird,
- UV-Monitor, der im Eluat kontinuierlich die Absorption bei 254 nm bestimmt.

Die Trennung von UMP und Uridin erfolgte mit Hilfe der Umkehrphasen- oder *Reversed-Phase*-Chromatographie. Es wurde eine Säule der Firma Merck vom Typ RP-18 mit 250 mm Länge, 4 mm Durchmesser und einer Partikelgröße von 10 µm verwendet. Die Substanzen wurden durch isokratische Elution mit HPLC-Puffer (0,1 M KH_2PO_4 , 8 % Methanol; pH 6,0 mit NaOH) voneinander getrennt.

Vor dem Auftragen auf die HPLC-Säule wurden die Proben 10 min bei 4 °C mit 14000 g zentrifugiert, um den entstandenen KClO_4 -Niederschlag abzutrennen. Bei Bedarf wurden die Proben mit HPLC-Puffer verdünnt, um die Uridin-Konzentration optimal auf den Messbereich einzustellen. Ein Lauf dauerte fünf Minuten bei einer Flussgeschwindigkeit von 1,3 ml/min.

Die Chromatogramme wurden mit Hilfe des Softwarepakets *EZChrom* auf einem Rechner aufgezeichnet. Nach einer Eichung des Systems mit Proben bekannter Konzentration konnten die entsprechenden Peaks direkt ausgewertet werden.

2.3.3 Aktivitätstest mit anderen Substraten

Als Substrate für die Pyrimidin 5'-Nukleotidase wurden neben UMP folgende Nukleotide getestet: AMP, CMP, GMP, IMP, TMP, dCMP, dUMP, 3'-UMP, 3'-dUMP.

Der Aktivitätstest wurde entsprechend der Methode für UMP durchgeführt. Alle Substrate wurden mit einer Konzentration von 1 mM eingesetzt. Bis auf dCMP und 3'-dUMP wurden alle Substanzen als 100 mM Stammlösungen in H_2O angesetzt und 10 µl zum Reaktionsansatz gegeben. Aufgrund der geringeren Löslichkeit wurden 3'-dUMP und dCMP jeweils als 10 mM Stammlösung angesetzt und 100 µl zugegeben, die Menge H_2O im Reaktionsansatz wurde entsprechend verringert. Die entstandenen Produkte wurden wie in Kapitel III.2.3.2 mittels HPLC quantitativ bestimmt. Dazu wurde das System zuvor für jedes Substrat mit Lösungen der entsprechenden Produkte geeicht.

2.3.4 Aktivitätstest mit Metallionen

Um die Auswirkung von verschiedenen Metallionen auf die Enzymaktivität zu untersuchen, wurde der Aktivitätstest etwas abgeändert. Statt 0,5 M DTT wurde eine 0,5 M Lösung von Mercaptoethanol in H_2O verwendet. Die Metallionen wurden in einer Konzentration von 1 mM in Form ihrer Chloride (Ausnahme: Kupfersulfat) aus einer 20 mM Stammlösung zugegeben. In einigen Fällen wurden die Metallsalze auch in einer Endkonzentration von 10 mM aus einer 1 M Stammlösung verwendet. Für die Messungen wurde Hämolsat aus einem Pool Erythrozyten des 15. Entwicklungstags eingesetzt.

2.4 Bestimmung der Hämoglobinkonzentration

Hämoglobin stellt den überwiegenden Anteil am Proteingehalt von Erythrozyten dar. Aus diesem Grund wurden die Werte für die Pyrimidin 5'-Nukleotidaseaktivität in Erythrozyten auf den Hämoglobingehalt der Zellen bezogen. Die Hämoglobinkonzentration wurde photometrisch nach der Cyanhämglobin-Methode bestimmt. Dabei werden die Erythrozyten durch die hypotone Transformationslösung lysiert, das Hämoglobin durch Hexacyanoferrat oxidiert und das dabei entstehende Methämoglobin durch Cyanidionen stabilisiert.

Je nachdem, ob die Hämoglobinkonzentration von gepackten Erythrozyten oder von verdünntem Hämolysat bestimmt werden sollte, wurde als Probe ein Volumen von 5 µl bis 50 µl eingesetzt. Das entsprechende Volumen wurde mit 1 ml Transformationslösung versetzt und nach gründlichem Mischen mindestens 20 Minuten stehen gelassen. Um störende Zellbestandteile zu entfernen wurden die Ansätze fünf Minuten mit 14000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 546 nm im Überstand bestimmt.

Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ergibt sich für die Hämoglobinkonzentration:

$$c_{\text{Hb}} = \frac{E_{546} \cdot M \cdot F}{\epsilon \cdot d}$$

c_{Hb} Ausgangskonzentration [g/l] von Hämoglobin in der Probe

E_{546} Gemessene Extinktion bei 546 nm

M Molekulargewicht des Hämoglobins (64500 g/mol)

F Verdünnungsfaktor (z. B. bei 50 µl Probe: 1050:50 = 21)

ϵ Extinktionskoeffizient von Cyanhämglobin bei 546 nm (44000 l·mol⁻¹·cm⁻¹)

d Schichtdicke der Küvette (1 cm)

2.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt von einzelnen Fraktionen aus der Enzymreinigung wurde mit der Methode von Bradford [1976] anhand einer Eichgeraden bestimmt.

Als Eichprotein wurde BSA verwendet. Aus einer Stammlösung mit einem Gehalt von 10 mg/ml in H₂O wurden einzelne Verdünnungen im Bereich von 0-300 µg/ml angesetzt. Dafür wurde der entsprechende Puffer verwendet, mit dem die Fraktionen bei der Chromatographie eluiert worden waren. In einer 96-well Mikrotiterplatte wurden 10 µl der Standards oder der unbekannten Proben mit 200 µl des Bradford-Reagenz (Roti-Quant, Firma Roth) versetzt. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Nach fünf Minuten wurden die Platten in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm vermessen.

2.6 Säulenchromatographie

Mit einer peristaltischen Pumpe (P-3, Pharmacia) wurde der verwendete Puffer aus einem Vorratsgefäß mit einer genau definierten konstanten Flussgeschwindigkeit über die Säule gepumpt. Als Probenreservoir zum Auftragen kleinerer Proben volumina auf die Säule diente eine leere Spritzenhülse geeigneter Größe, die über einen Dreiwegehahn mit der Säule verbunden werden konnte. Um das Totvolumen vor der Säule gering zu halten, wurde als Verbindung ein Adapter verwendet, der direkt auf das Säulenbett aufgesetzt wurde. Zur Erzeugung linearer Gradienten wurde ein Gradientenmischer an die Pumpe angeschlossen.

Nach dem Durchlaufen der Säule wurde das Eluat über einen UV-Monitor geleitet, mit dem die Absorption bei 254 nm aufgezeichnet wurde. Die entsprechenden Proben wurden mit einem Fraktionssammler aufgefangen. Die gesamte Anlage war in einem Cold-Lab der Firma LKB mit einer Temperatur von 4 °C aufgebaut. Nach der chromatographischen Trennung wurden die einzelnen Fraktionen auf ihre Enzymaktivität und ihren Proteingehalt nach Bradford untersucht. Die aktiven Fraktionen wurden in flüssigem N₂ eingefroren und bei –80 °C gelagert.

Zum Schutz vor Proteasen wurde allen Puffern vor der Chromatographie 0,5 mM PMSF aus einer Stammlösung (0,25 M) in abs. Ethanol zugesetzt.

2.6.1 Ionenaustauschchromatographie

DEAE-Cellulose

Als erster Schritt für die Reinigung der Pyrimidin 5'-Nukleotidase wurde eine Chromatographie an Whatman Cellulose DE 52 durchgeführt. Aus embryonalen Erythrozyten gewonnenes Hämolysat wurde aufgetaut und 15 min in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C mit 14000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in Dialyseschläuche gefüllt und über Nacht dreimal gegen etwa das zehnfache Volumen Tris-Puffer (50 mM, pH 7,5, mit 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA und 0,5 mM PMSF) dialysiert. Nach der Dialyse wurde das Hämolysat nochmals 10 min wie oben zentrifugiert.

Das Hämolysat wurde aus einem Vorratsgefäß mit einer Flussrate von 1 ml/min auf eine DE 52 Säule (100 ml Säulenvolumen, Durchmesser 2,6 cm) aufgetragen. Die Säule wurde vorher mit Tris-Puffer äquilibriert. Nach dem Auftragen wurde die Säule mit 360 ml Tris-Puffer bei einer konstanten Flussrate von 1,2 ml/min gespült. Die Elution erfolgte mit einem linearen Salzgradienten von 0-0,5 M NaCl bei einer Flussrate von 0,8 ml/min. Dazu wurden 450 ml Tris-Puffer in die vordere Kammer eines Gradientenmischers und 450 ml Tris-Puffer mit einem NaCl-Gehalt von 0,5 M

in die hintere Kammer gefüllt. Während der Elution wurden alle 15 min Fraktionen aufgefangen. Die aktiven Fraktionen wurden gepoolt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.6.2 Gelfiltration

Sephacryl S 100

Nach der Reinigung durch IEC wurde die Proteinlösung durch Ultrafiltration konzentriert (aufzutragendes Volumen maximal 2 % des Säulenvolumens) und über ein Probenreservoir auf die mit Elutionspuffer äquilibrierte Säule ($V=100\text{ ml}$, $d=1,5\text{ cm}$) geladen. Als Elutionspuffer wurde Tris-Puffer (50 mM, pH 7,5, mit 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA und 0,5 mM PMSF) mit 150 mM NaCl verwendet. Bei einer Flussrate von 0,16 ml/min wurden alle 20 min Fraktionen aufgefangen.

Sephadex G 25

Falls Proben zwischen zwei Chromatographien entsalzt werden mussten, wurden diese auf eine Säule mit Sephadex G 25 gebracht. Je nach Probenvolumen wurde entweder eine Säule mit einem Volumen von 80 ml ($15 \times 2,6\text{ cm}$) oder mit einem Volumen von 10 ml ($1,5 \times 5,6\text{ cm}$) verwendet. Dabei wurde der entsprechende Puffer verwendet, der auch bei der nachfolgenden Chromatographie zum Einsatz kam.

Sephadex G 75

Als Alternative zu Sephacryl S 100 wurde in einigen Experimenten eine Säule mit Sephadex G 75 (100 ml, $56 \times 1,5\text{ cm}$), äquilibriert mit 50 mM Tris-Puffer (mit 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA; pH 7,5), zur Gelfiltration verwendet. Die Läufe wurden mit einer Flussrate von 0,1 ml/min durchgeführt.

Sephadex G 50

Mit Sephadex G 50 (100 ml Säule, $56 \times 1,5\text{ cm}$) wurden Läufe mit einer Flussrate von 0,15 ml/min durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 50 mM Tris-Puffer (mit 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM PMSF; pH 7,5) verwendet.

2.6.3 Chromatographie an Blue Sepharose

Für die Chromatographie wurden kleine Polypropylensäulen (Pierce) verwendet, die mit etwa 5 ml ($d=1,5\text{ cm}$) bzw. 1,5 ml ($d=1,0\text{ cm}$) Blue Sepharose gefüllt wurden. Die Säulen wurden mit Tris-Puffer äquilibriert und die Proteinproben mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,1 bis 0,5 ml/min auf die Säule gebracht und mit Tris-Puffer eluiert.

2.6.4 Weitere Chromatographien

Phenyl-Sepharose

Alle verwendeten Puffer enthielten 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA und 0,5 mM PMSF. Eine 4 ml Glassäule (15 x 0,6 cm) wurde mit Phenyl-Sepharose CL-4B (Sigma) gepackt und mit folgendem Puffer äquilibriert:

50 mM Tris-HCl mit 3 M KCl und 1 mM MgCl_2 , pH 6,8.

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit festem KCl auf eine Konzentration von 3 M gebracht. Die Säule wurde mit 8 ml Tris-Puffer (50 mM, pH 7,5) bei einer Flussrate von 0,4 ml/min gespült.

Für die Elution wurden verschiedene Puffer verwendet:

- A) 10 mM Tris-Puffer, pH 7,5.
- B) 25 % bzw. 50 % Ethylenglykol in 20 mM Tris-Puffer, pH 7,5.
- C) 30 % Ethylenglykol und 1,5 % Triton X-100 in 20 mM Tris-Puffer, pH 7,5.
- D) 25 % Ethylenglykol und 0,8 mM CHAPS in 20 mM Tris-Puffer, pH 7,5.

Die Säule wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,1 ml/min eluiert. Um das störende, nicht dialysierbare Triton X-100 aus den Proben zu entfernen, wurde das unpolare Material Bio-Beads SM-4 (Bio-Rad) getestet. Bio-Beads SM-2 (gleiches Material mit anderer Teilchengröße) wird unter anderem zu diesem Zweck verwendet [Holloway 1973]. Die Probe wurde auf eine 3 ml Säule mit Bio-Beads, äquilibriert mit 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5), gebracht und mit 10 mM Tris-Puffer (pH 7,5) eluiert.

Methyl-Säule

Eine Probe wurde nach vorhergehender Reinigung an DE 52 und Sephacryl S 100 mit 1 mM MgCl_2 und 3 M KCl versetzt und auf eine 5 ml EconoPac Methyl HIC Fertigsäule (Bio-Rad) aufgetragen. Für die Chromatographie wurde folgender Puffer verwendet: 50 mM Tris, 3 M KCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM PMSF; pH 6,8.

Hydroxyapatit

Eine 35 ml Säule (1,5 x 20 cm) wurde mit Macro-Prep Ceramic Hydroxyapatit Typ I (Firma Bio-Rad) beladen. Die Säule wurde nach dem Aufbringen der Probe mit 100 ml Äquilibrierungspuffer bei einer Flussrate von 1 ml/min gewaschen. Eluiert wurde mit einer Flussrate von 0,4 ml/min. In einem ersten Versuch wurde die Säule mit 10 mM KH_2PO_4 -Puffer (mit 1 mM DTT, pH 6,8) äquilibriert. In Anlehnung an die Reinigung von Amici et al. [1994] wurde eine Elution mit 0,5 M KCl im Äquilibrierungspuffer versucht. Allerdings konnte keine Aktivität von der Säule

eluiert werden. Daher wurden für die Elution Puffer mit KF oder KH_2PO_4 verwendet. Die Bedingungen der einzelnen Chromatographien sind im folgenden zusammengefasst:

- A) Äquilibrationpuffer 10 mM KH_2PO_4 mit 1 mM DTT, pH 6,8.
Elution mit 120 ml linearer Gradient 0-1 M KF in Äquilibrationpuffer.
- B) Äquilibrationpuffer 10 mM KH_2PO_4 mit 1 mM DTT, pH 6,8.
Elution mit 120 ml linearer Gradient 0-0,4 M KH_2PO_4 in Äquilibrationpuffer.
- C) Äquilibration mit 1 mM MgCl_2 mit 1 mM DTT, pH 6,5.
Elution mit 100 ml Gradient:
50 ml Startpuffer: 1 mM MgCl_2 , pH 6,5.
50 ml Endpuffer: 0,4 M KH_2PO_4 , pH 6,8.
Beide Puffer für Gradient mit 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA und 0,5 mM PMSF.

Ein Problem bei der Bestimmung der Aktivität nach den Läufen war die Anwesenheit von Phosphat oder Fluorid in den erhaltenen Proben. Beide hemmen die Enzymaktivität. Bei einer Phosphatkonzentration von 40 mM im Ansatz für den Aktivitätstest wurde eine Hemmung von 51 % festgestellt. 5 mM KF erniedrigen die Aktivität auf 59 % im Vergleich zu einem Kontrollansatz (30 mM KF auf 14 %). Um genaue Werte zu erhalten, mussten die Proben erst dialysiert werden.

UDP-Agarose

Die Proben wurden auf eine Säule mit 1 ml UDP-Agarose (Uridin 5'-Diphosphohexanolamin-Agarose, Sigma) geladen. Verschiedene Puffer wurden getestet, um das Enzym an die Säule zu binden:

- 50 mM Tris-HCl, pH 7,5.
- 50 mM Tris-HCl mit 2 mM MgCl_2 , pH 7,5.
- 20 mM HEPES; pH 7,5 mit NaOH.

Alle Puffer enthielten 1 mM DTT und 0,5 mM EDTA.

UDPG-agarose

Bei diesem Material ist Uridin 5'-Diphosphoglucuronat über die Carboxylgruppe mit der Matrix verbunden. Die Säule (1 ml) wurde mit Tris-Puffer (50 mM Tris, pH 7,5 mit HCl, 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA) äquilibriert. Verschiedene Puffer wurden zur Elution verwendet:

- 10 mM UMP in Tris-Puffer.
- Tris-Puffer mit 50 mM bzw. 100 mM NaCl.

CMP-Agarose

Eine Probe wurde nach Reinigung an Sephacryl S 100 auf eine 1,5 ml Säule mit CMP-Agarose (Sigma) aufgetragen.

Äquilibrierungspuffer:

20 mM Tris mit 2 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA und 0,5 mM PMSF.

Mit HCl auf pH 7,0 eingestellt.

Die Proben wurden zuvor auf einer Säule mit Sephadex G 25 (1,5 x 5,6 cm), äquilibriert mit Äquilibrierungspuffer, entsalzt.

Red Sepharose

Eine 1 ml Säule mit Red Sepharose (Reaktivrot 120 Typ 3000-CL, Sigma) wurde mit folgenden Puffern äquilibriert und eluiert:

A) Äquilibriert mit 20 mM Tris und 2 mM MgCl_2 ; pH 8,0 mit HCl.

Eluiert mit 10 mM UMP und 5 mM MgCl_2 in 20 mM Tris; pH 8,0 mit HCl.

B) Äquilibriert mit 20 mM Tris und 2 mM MgCl_2 ; pH 7,0 mit HCl.

Eluiert mit 5 mM UMP in Äquilibrierungspuffer (pH 7,0), anschließend mit 1 M KCl in 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5).

Alle Puffer enthielten 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA und 0,5 mM PMSF. Die Proben wurden in Äquilibrierungspuffer auf die Säule gebracht und diese vor der Elution mit 4 ml Puffer gespült.

Cellulosephosphat

Das Enzym Pyrimidinnukleosidmonophosphat-Kinase aus dem Knochenmark von Ratten konnte durch Chromatographie an Cellulosephosphat gereinigt werden [Seagrave und Reyes 1985]. Es wurde getestet, ob dieses Material mit seinen Phosphatgruppen als Affinitätsmatrix für die Pyrimidin 5'-Nukleotidase dienen könnte.

0,5 ml Hämolysat wurden mit 9,5 ml Äquilibrierungspuffer verdünnt und auf eine 1 ml Säule mit Cellulosephosphat (Sigma) gebracht. Für die Chromatographie wurde folgender Puffer verwendet:

20 mM Maleinsäure, pH 6,5 mit NaOH; 2 mM MgCl_2 ; 1 mM DTT; 0,5 mM EDTA.

Sephadex A 50

Als Ionenaustauschermatrix wurde eine 1,5 x 15 cm Säule mit DEAE-Sephadex A 50 getestet. Diese wurde mit Tris-Puffer (mit 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA; pH 7,5) äquilibriert und bis zu 11 ml Hämolysat (0,33 U Aktivität, 2 mg Gesamtprotein) unverdünnt auf die Säule geladen. Die Säule wurde mit 140 ml Tris-Puffer bei einer

Flussrate von 0,5 ml/min gespült und mit einem NaCl-Gradienten (0-0,5 M NaCl in 260 ml) bei 0,3 ml/min eluiert.

Reinigung mit Hämolysat von adulten Hühnern

Eine Reinigung der Pyrimidin 5'-Nukleotidase wurde auch mit Hämolysat von adulten Hühnern versucht. Zur Gewinnung siehe III.2.1. Das Hämolysat wurde nach dem Auftauen 15 Minuten bei 4 °C mit 14000 g zentrifugiert. Vor dem Auftragen auf die DE 52 Säule wurden 40 ml Hämolysat mit 60 ml Tris-Puffer verdünnt. Die Chromatographie wurde wie für embryonales Hämolysat beschrieben durchgeführt.

2.7 SDS-Gelelektrophorese

Für die endgültige Isolierung und zur Reinheitskontrolle von Fraktionen während der chromatographischen Reinigung der Pyrimidin 5'-Nukleotidase wurden SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli [1970] eingesetzt.

Für die elektrophoretischen Trennungen wurden eine Protean II Zelle (1 mm dicke Gele, 16 x 20 cm) oder eine Mini-Protean II Zelle (0,75 mm dicke Gele, 7 x 8 cm) verwendet. Beide Apparaturen stammten von der Firma Bio-Rad. Die Konzentration an Acrylamid im Sammelgel betrug jeweils 5 %, im Trenngel 10 % oder 12 %.

Die Proteinproben mussten vor der Elektrophorese meistens mit Microcon YM-10 Filtern eingeeengt werden, um eine ausreichende Proteinkonzentration für die Elektrophorese zu erreichen. Anschließend wurden die Proben mindestens 1:5 mit SDS-Probenpuffer verdünnt. Zur vollständigen Denaturierung der Proteine wurden die Proben und die Proteinstandards fünf Minuten auf 95 °C erhitzt. Der vorgefärbte Proteinstandard wurde ohne vorhergehende Denaturierung verwendet.

Mit der kleinen Apparatur wurde die Elektrophorese bei Raumtemperatur durchgeführt. Zu Beginn wurde mit einem Netzgerät eine konstante Stromstärke von 10 mA eingestellt. Sobald der Farbstoff Bromphenolblau das Trenngel erreicht hatte, wurde eine konstante Spannung von 200 V gewählt. Ein Lauf dauerte etwa 90 Minuten.

Die große Zelle wurde während des Betriebs mit einem Thermostat auf 10 °C gekühlt und es wurde vorgekühlter Laufpuffer verwendet. Bis die Proben vollständig ins Sammelgel eingedrungen waren wurde für wenige Minuten eine Stromstärke von 30 mA angelegt. Im Sammelgel wurden 16 mA eingestellt (ca. 50-60 min) und im Trenngel 25 mA (ca. 4-5 h).

Färbung mit Coomassie Brilliantblau R 250

Die Polyacrylamidgele wurden vor der Färbung mindestens 1 h mit 50 % Methanol und 10 % Essigsäure fixiert. Anschließend wurde das Gel mehrere Stunden oder

besser über Nacht mit 0,1 % Coomassie in 50 % Methanol und 10 % Essigsäure gefärbt. Der Hintergrund wurde mit 5 % Methanol und 7 % Essigsäure entfärbt (je nach Gel eine bis mehrere Stunden).

2.8 Native Gelelektrophorese

Für die Elektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen wurden 10 % Polyacrylamidgele (7 x 8 cm) ohne SDS verwendet. Trenngel und Sammelgel wurden entsprechend den SDS-Polyacrylamidgelen hergestellt, allerdings wurde das SDS weggelassen und 1 mM DTT zugegeben. Die Zusammensetzung von Probenpuffer und Laufpuffer sind im folgenden aufgelistet:

Nativer Probenpuffer:	62,5 mM Tris·HCl; pH 6,8 bei RT
	10 % Glycerin (v/v)
	0,001 % Bromphenolblau (w/v)
	1 mM DTT
	0,5 mM EDTA
	0,5 mM PMSF frisch zugeben
Elektrodenpuffer	25 mM Trisbase
	192 mM Glycin
	1 mM DTT
	0,5 mM PMSF frisch zugeben

Die Proben wurden vor der Elektrophorese mit einer Microcon Filtereinheit vollständig konzentriert, im Filter mit 40 µl nativem Probenpuffer verdünnt und nochmals auf etwa 30 µl konzentriert. Die gesamte Probe wurde in eine Tasche des Gels geladen. Die Elektrophorese wurde in einem Coldlab bei 4 °C durchgeführt. An das Gel wurde für 30 min ein konstanter Strom von 10 mA angelegt, danach wurde für 50 min eine konstante Spannung von 200 V eingestellt.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel zum Nachweis des Enzyms in Testpuffer bei 37 °C inkubiert.

Testpuffer:	50 mM Tris·HCl; pH 8,0 bei RT
	50 mM MgCl ₂
	20 mM CaCl ₂
	5 mM DTT
	5 mM UMP
	0,5 mM PMSF frisch zugeben

Durch die Pyrimidin 5'-Nukleotidase im Gel entsteht aus dem UMP des Testpuffers anorganisches Phosphat, das mit den Calciumionen unlösliches Calciumphosphat

bildet. Dieses erscheint im Gel als farblose Bande. Verschiedene Enzyme, die Phosphat produzieren, können mit dieser Methode direkt im Gel nachgewiesen werden [Nimmo und Nimmo 1982].

Zum Nachweis des Enzyms wurde das Gel zweimal für drei Minuten in 100 ml Testpuffer ohne UMP bei 4 °C vorinkubiert, danach bei 37 °C in 100 ml Testpuffer mit 5 mM UMP. Nachdem eine farblose Bande zu sehen war, wurde diese möglichst exakt ausgeschnitten, in ein Eppendorf Gefäß gegeben und zweimal fünf Minuten mit jeweils 1 ml H₂O gewaschen. Zur Elution des Enzyms wurde das Gelstück mit 300 µl SDS-Laufpuffer (mit 0,5 mM PMSF und 0,5 mM EDTA) versetzt, mit einer Pinzette zerkleinert und zweimal in flüssigem N₂ eingefroren und wieder aufgetaut. Die Probe wurde über Nacht bei 4 °C stehen gelassen, damit das Protein aus den Gelresten diffundieren konnte.

Am nächsten Tag wurde die Probe kurz zentrifugiert, der SDS-Puffer mit einer Pipette aufgenommen und mit einer Microcon-Einheit vollständig konzentriert. Zur Filtereinheit wurden 40 µl SDS-Probenpuffer gegeben und nochmals 5 min mit 14000 g zentrifugiert. Die gesamte Probe wurde anschließend auf einem SDS-Gel getrennt.

2.9 Western-Blot

Im Anschluss an eine Elektrophorese können Proteine durch elektrischen Transfer von Acrylamidgelen auf Membranen aus Nitrocellulose [Towbin et al. 1979], Polyvinylidenfluorid (PVDF) [Gültekin und Heermann 1988] oder Nylon übertragen werden. Die geblotteten Proteine können auf der Membran mit Farbstoffen wie Coomassie Brilliantblau oder Ponceaurot angefärbt oder auch mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Auf PVDF-Membranen immobilisierte Proteine können direkt einer N-terminalen Sequenzierung nach Edman unterzogen werden [Matsudaira 1987].

Für die Western-Blots wurden Biotrace™ PVDF-Membranen (Pall Gelman) mit einem Format von 7 x 8,5 cm und 0,45 µm Porengröße verwendet. Die Membran wurde vor der Verwendung 15 Minuten in Methanol gelegt. Unmittelbar danach wurde die Membran zusammen mit sechs Stück Whatman 3MM Filterpapier (auf Membrangröße zugeschnitten) mindestens 15 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Das Acrylamidgel wurde unmittelbar nach der Elektrophorese für eine Minute in Transferpuffer äquilibriert. In einer Semi-Dry Transferzelle (Bio-Rad) wurden drei der Filter, die Membran, das Gel und wieder drei Filter stapelförmig übereinander gelegt. Durch eingeschlossene Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen kann schlechter Kontakt und unzureichender Transfer auftreten. Aus diesem Grund

wurde nach dem Auflegen des Gels vorsichtig mit einem Glasstab über den Stapel gerollt, um den Puffer gleichmäßig zwischen Gel und Membran zu verteilen. Der Transfer wurde 30 Minuten mit einer konstanten Spannung von 15 V durchgeführt.

Anschließend wurde die Membran aus der Zelle entnommen und fünf Minuten mit einer Lösung von 0,025 % Coomassie Brilliantblau R 250 in 40 % Methanol und 7 % Essigsäure angefärbt. Zum Entfärben des Hintergrunds wurde eine Lösung von 50 % Methanol verwendet. Dabei wurde die Lösung mehrmals gewechselt. Die Membran wurde gründlich mit Wasser gespült und an der Luft getrocknet. Die entsprechenden Proteinbanden wurden nach Edman sequenziert.

2.10 Konzentrierung von Proteinproben

Zum Konzentrieren proteinhaltiger Lösungen wurden Rührzellen der Firma Amicon eingesetzt. Bei einer Temperatur von 4 °C wurden die Lösungen mit einem Druck von 3,8 bar über Diaflo Ultrafiltrationsmembranen vom Typ YM-10 filtriert.

Für kleinere Volumina wurden Mikrokonzentratoren der Firma Millipore vom Typ Microcon YM-10 verwendet. Diese fassen ein maximales Probenvolumen von 500 µl. In einer Kühlzentrifuge wurden die Lösungen bei 4 °C und 14000 g konzentriert. Um ein Ausgangsvolumen von 500 µl auf ein Endvolumen von 10 µl zu bringen wurde eine Zeit von etwa 1 h benötigt. Zur Entnahme des verbliebenen Volumens wurden die Filter im Auffanggefäß umgedreht und drei Minuten mit 1000 g zentrifugiert.

2.11 Isolierung von Gesamt-RNA

Die RNA aus den Erythrozyten wurde nach der Methode von Chomczynski und Sacchi [1987] isoliert. Zur Gewinnung der RNA aus gepackten Erythrozyten wurden diese dreimal mit PBS gewaschen und eine ca. 20 % Suspension der Zellen in PBS hergestellt.

50 µl dieser Zellsuspension wurden in einem 2 ml Cup nacheinander mit 800 µl GT-Lösung, 80 µl 2 M Natriumacetat und 800 µl Phenol versetzt, dabei wurde der Ansatz nach Zugabe jeder einzelnen Komponente gut durchmischt.

Nach Zugabe von 160 µl Chloroform-Isoamylalkohol (49:1) wurde der Ansatz mindestens 10 s gevortext, 15 min auf Eis gestellt und 20 min bei 4 °C mit 10000 g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase (800-900 µl) wurde ohne Interphase in ein neues Cup überführt und mit 900 µl Isopropanol versetzt. Die RNA wurde mindestens 1 h (besser über Nacht) bei -20 °C ausgefällt.

Der Ansatz wurde 30 min bei 4 °C mit 13000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml 75 % Ethanol suspendiert und 5 min bei 4 °C mit 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 300 µl GT-Lösung aufgenommen und in ein neues Cup überführt. Die RNA wurde mit 1 ml Isopropanol ausgefällt (mindestens 1 h bei –20 °C).

Nach 30 min mit 13000 g bei 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Pellet zweimal wie oben mit 75 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde unter Vakuum in einer SpeedVac Zentrifuge 10 min getrocknet und anschließend in 25 µl sterilem Millipore-Wasser aufgenommen und gevortext. Die RNA-Lösung wurde dreimal nacheinander jeweils für 1,5 min abwechselnd in einen Heizblock bei 65 °C bzw. auf Eis gestellt, um die RNA vollständig in Lösung zu bringen.

Für die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde 1 µl der RNA-Lösung mit 79 µl sterilem Millipore-Wasser verdünnt und photometrisch die Absorption bei 260 nm gemessen. Eine OD₂₆₀ von 1,0 entspricht dabei einem RNA-Gehalt von 40 µg/ml. Die Reinheit der RNA-Lösung wurde über das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ abgeschätzt. Der Sollwert einer reinen RNA-Lösung liegt zwischen 1,8 und 2,1.

2.12 Northern Blot

Vor dem Transfer auf eine Nylonmembran wurde die RNA in einem 1 % Agarosegel mit 2 % Formaldehyd aufgetrennt. Zur Herstellung des Gels wurden 0,6 g Agarose, 6 ml 10 x MOPS-Puffer und 51 ml steriles Millipore-Wasser in einem Mikrowellengerät aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf etwa 55 °C wurden 3,24 ml Formaldehydlösung (37 %) zugegeben und das Gel in die Gelkammer gegossen.

Ein entsprechendes Aliquot (10 µg RNA) der nach Kapitel III.2.11 gewonnenen RNA wurde in einer SpeedVac Zentrifuge im Vakuum getrocknet und mit 6 µl Auftragspuffer versetzt. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Formaldehydgel zehn Minuten auf 65 °C erhitzt. Als Standard wurde 1 µl Digoxigenin-markierte RNA (Roche) mit 6 µl Auftragspuffer verdünnt und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde 150 min mit einer Spannung von 50 V in 1 x MOPS-Puffer durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel 30 min mit Ethidiumbromid gefärbt. Für die Färbelösung wurden 10 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10 µg/ml) mit 200 ml 0,5 x TBE-Puffer versetzt. Nach der Färbung wurde 30 min mit 200 ml 0,5 x TBE entfärbt. Das Gel wurde unter UV-Licht fotografiert.

Die RNA wurde durch Kapillarblot auf eine Nylonmembran (Porablot NY amp, Macherey-Nagel, Düren) übertragen. Dazu wird in einer mit 10 x SSC-Lösung gefüllten Wanne ein Podest aufgebaut, das mit Whatman Chromatographiepapier bedeckt wird. Das Filterpapier taucht dabei auf beiden Seiten des Podests in die

Flüssigkeit. Auf das Filterpapier wird ein Schwammtuch gelegt, auf dem ein weiteres Filterpapier (etwas größer als Gel und Membran) platziert wird. Filterpapier und Schwammtuch werden zuvor mit 10 x SSC getränkt. Das Gel und die Membran werden nach vorhergehender Äquilibration (10 min) in 10 x SSC nacheinander aufgelegt. Der Bereich um die Membran wird mit Frischhaltefolie abgedichtet, um zu verhindern, dass Flüssigkeit an der Membran vorbei nach oben gesaugt wird. Auf die Membran wird ein weiteres Filterpapier gebracht. Den Abschluss bilden mehrere Zentimeter dicke Lagen aus Zellstoff, die mit einem geeigneten Gegenstand beschwert werden. Der Transfer vom Gel zur Membran erfolgt durch Diffusion in Richtung des Flüssigkeitsstroms zu den darüber liegenden Schichten aus Zellstoff. Nach 16-20 h Transfer wurde die Membran an der Luft getrocknet, auf beiden Seiten 30 Sekunden im UV-Crosslinker bestrahlt und die RNA durch zweistündiges Backen bei 80 °C auf der Membran immobilisiert.

Der Nachweis der RNA auf der Membran erfolgte über die Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde. Die Hybridisierung wurde entsprechend der Anleitung für das Digoxigenin-System (Roche, Mannheim) durchgeführt und ist in Kapitel III.2.18.4 für die Hybridisierung mit immobilisierter DNA beschrieben. Die einzigen Unterschiede bestanden in der Temperatur für die Hybridisierung (im Falle von RNA 50 °C) und in der Dauer der einzelnen Waschkvorgänge nach der Hybridisierung: Die Membranen wurden jeweils zweimal 15 min mit den entsprechenden Waschlösungen (SSC mit 0,1 % SDS) behandelt. Die DNA-Sonde wurde mit dem chemilumineszenten Substrat CDP-Star nachgewiesen (siehe III.2.18.5).

2.13 Reverse Transkriptase Reaktion

Für die reverse Transkription von RNA in cDNA wurden 5 µg Gesamt-RNA in einem 20 µl Ansatz eingesetzt. Ein entsprechendes Aliquot der RNA-Lösung wurde mit 2 µl Random Hexamer Primern (Pharmacia, Konzentration 50 pmol/µl) versetzt und mit sterilem H₂O auf ein Volumen von 10 µl gebracht. Der Ansatz wurde 10 Minuten im Thermocycler auf 60 °C erhitzt, kurz auf Eis gestellt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit die Primer an die RNA binden können.

Anschließend wurden folgende Komponenten zugegeben:

0,4 µl	dNTPs (Konzentration jeweils 25 mM)
4 µl	5 x RT-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe)
2 µl	100 mM DTT (Invitrogen)
2,6 µl	H ₂ O, steril
1 µl	200 U/l Superscript II (Invitrogen)

Der Ansatz wurde im Thermocycler 60 Minuten auf eine Temperatur von 42 °C gebracht, anschließend 15 Minuten auf 70 °C. Die Proben wurden für ihre spätere Verwendung als template in PCR-Reaktionen 1:50 mit H₂O verdünnt und bei -80 °C aufbewahrt.

2.14 PCR

Als template für die PCR mit spezifischen Primern für die Pyrimidin 5'-Nukleotidase wurde eine cDNA-Probe verwendet, die entsprechend Kapitel III.2.13 durch reverse Transkription aus RNA von embryonalen Erythrozyten des elften Entwicklungstages hergestellt wurde. Die Erythrozyten wurden vor der RNA-Isolierung 4 h *in vitro* mit CPCA stimuliert, um die Menge der cAMP-induzierten mRNA zu erhöhen. Außerdem wurden Phagen des ZAP Express Vektors als template verwendet, um mit Hilfe der PCR die klonierten cDNA-Sequenzen zu amplifizieren.

2.14.1 PCR mit degenerierten Primern

Mit dem Primerpaar „terminus(s)“ und „peptid2(as)“ wurde eine PCR mit folgenden Komponenten angesetzt:

template	2 µl
Primer „terminus(s)“ (100 pmol/µl)	1 µl
Primer „peptid2(as)“ (100 pmol/µl)	1 µl
H ₂ O (Millipore, autoklaviert und sterilfiltriert)	36,5 µl
10 x NH ₄ -Reaktionspuffer	5 µl
MgCl ₂ -Lösung (50 mM)	1,5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1 µl
gesamt	48 µl

Der Ansatz wurde im Thermocycler zweieinhalb Minuten auf 94 °C erhitzt. Kurz vor Ablauf dieser Zeit wurden die Proben aus dem Gerät genommen, kurz zentrifugiert und 2 µl PanScript DNA-Polymerase (1:8 verdünnt auf 0,625 U/µl) zugegeben. Das PCR-Programm wurde wieder gestartet und lief nach folgendem Schema ab:

49 °C für 1 min, 72 °C für 1 min.

94 °C	1 min	}	9 Zyklen, dabei wurde die Annealing-Temperatur in jedem Zyklus um 1 °C vermindert
48 °C	1 min		
72 °C	1 min		
94 °C	1 min	}	mehrere Zyklen
40 °C	1 min		
72 °C	1 min		

72 °C für 9 min, 4 °C ∞

2.14.2 PCR mit Primerpaar „sonde1(s)/sonde1(as)“

Für die PCR wurde folgender Ansatz verwendet:

template	2 µl
Primer „sonde1(s)“ (10 pmol/µl)	1 µl
Primer „sonde1(as)“ (10 pmol/µl)	1 µl
H ₂ O (Millipore, autoklaviert und sterilfiltriert)	38,25 µl
10 x NH ₄ -Reaktionspuffer	5 µl
MgCl ₂ -Lösung (50 mM)	1,5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1 µl
PanScript DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
gesamt	50 µl

Folgendes PCR-Programm wurde durchgeführt:

94 °C	1 min 45 s	
94 °C	45 s	} mehrere Zyklen
54 °C	45 s	
72 °C	45 s	
72 °C	9 min	
4 °C	∞	

2.14.3 Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde

Für die Hybridisierungen wurde ein DNA-Fragment in einer PCR mit Digoxigenin markiert. Zur Kontrolle wurde eine Reaktion ohne Digoxigenin-markierte Nukleotide angesetzt. Der PCR-Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

	Sonde	Kontrolle
template	0,8 µl	0,8 µl
Primer „sonde1(s)“ (10 pmol/µl)	0,4 µl	0,4 µl
Primer „sonde1(as)“ (10 pmol/µl)	0,4 µl	0,4 µl
H ₂ O (Millipore, autoklaviert und sterilfiltriert)	7,6 µl	9,2 µl
10 x NH ₄ -Reaktionspuffer	2 µl	2 µl
MgCl ₂ -Lösung (5 mM)	6 µl	6 µl
Dig-dNTP-Mix (0,7 mM Dig-dUTP; 1,3 mM dTTP; Je 2 mM dATP, dCTP, dGTP)	2 µl	
dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		0,4 µl
PanScript DNA Polymerase (0,625 U/µl)	0,8 µl	0,8 µl
gesamt	20 µl	20 µl

Die PCR-Reaktion lief nach folgendem Schema ab:

94 °C	1 min 45 s		
94 °C	45 s	}	35 Zyklen
54 °C	45 s		
72 °C	45 s		
72 °C	9 min		
4 °C	∞		

2.14.4 Phagen-PCR

Für die PCR mit Phagen wurden die Eluate von Phagen in SM-Puffer als template in 50 µl Reaktionsansätzen verwendet. Mit dem Primerpaar „sonde1(s)/sonde1(as)“ wurden die entsprechenden Komponenten wie in Kapitel III.2.14.2 angesetzt. Die Reaktionen wurden nach folgenden Bedingungen durchgeführt:

94 °C	4 min 15 s		
94 °C	45 s	}	35 Zyklen
54 °C	45 s		
72 °C	45 s		
72 °C	9 min		
4 °C	∞		

Mit dem Primerpaar V1(s)/V1(as) wurde die PCR mit folgenden Änderungen durchgeführt: statt 10 pmol wurden 25 pmol jedes Primers eingesetzt, die Annealing-Temperatur betrug 58 °C und die Dauer des Schritts mit 72 °C wurde von 45 Sekunden auf zwei Minuten erhöht.

2.14.5 Untersuchung der Expression der Pyrimidin 5'-Nukleotidase in embryonalen Erythrozyten

Zur Untersuchung der Expression der Pyrimidin 5'-Nukleotidase mRNA in den Erythrozyten wurde die gesamte RNA isoliert und mit jeweils gleichen Aliquots dieser RNA eine reverse Transkription in cDNA durchgeführt. Diese cDNA-Proben wurden in einer PCR mit dem Primerpaar „sonde1(s)/sonde1(as)“ eingesetzt. Die PCR (50 µl Ansätze) wurde wie in III.2.14.2 beschrieben angesetzt. Als Kontrolle bei Stimulationsexperimenten wurden 2 µl der cDNA-Probe, die aus den Erythrozyten vor der Inkubation gewonnen wurde, als template eingesetzt (t_0). Zusätzlich wurde eine Reaktion mit der fünffachen Menge template ($5 \times t_0$, 10 µl in 50 µl PCR-Ansatz) angesetzt. Die Reaktionen liefen nach folgendem Schema ab:

94 °C	1 min 30 s		
94 °C	1 min	}	33 Zyklen
54 °C	1 min		
72 °C	1 min		
4 °C	∞		

Nach jeweils 25, 27, 29 und 31 Zyklen wurden 9 µl der einzelnen Ansätze mit 1 µl Auftragslösung versetzt und auf einem 2 % Agarosegel getrennt. Die Fluoreszenz der einzelnen Banden wurde mit einem Multi-Imager System (Bio-Rad) gemessen und mit dem Programm Multi-Analyst (Bio-Rad) quantitativ ausgewertet. Dazu wurde das Produkt aus Fläche und Intensität der einzelnen Banden gebildet. Für die Auswertung wurde jeweils diejenige Anzahl an Zyklen ausgewählt, bei der alle Banden möglichst stark ausgeprägt waren, und gleichzeitig die stärksten Banden im Vergleich zur vorhergehenden Zyklenzahl noch eine deutliche Zunahme zeigten. Da die Effektivität der PCR bei Zunahme der Zyklenzahl abnimmt, wird gerade bei starken Banden die Zunahme pro Zyklus immer geringer.

2.15 Agarose-Gelelektrophorese

Die bei der PCR erhaltenen Produkte wurden mit Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Je nach Größe der zu trennenden DNA wurden Gele mit einem Agarosegehalt von 0,8-2 % verwendet.

Für die Herstellung der Gele wurde die entsprechende Menge Agarose in einen Erlenmeyerkolben eingewogen, mit Elektrophoresepuffer versetzt und in einem Mikrowellengerät aufgekocht, um die Agarose in Lösung zu bringen. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 50-60 °C wurden 0,2 µg/ml Ethidiumbromid aus einer 10 mg/ml Stammlösung zugegeben und das Gemisch in die Gelkammer gegossen. Vor der Elektrophorese wurde das Gel 30 min zur vollständigen Polymerisation stehen gelassen. Nach der Überschichtung des Gels mit Elektrophoresepuffer wurden 9 µl der DNA-Proben mit 1 µl Auftragslösung versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Von den DNA-Größenstandards wurden jeweils 5 µl aufgetragen. Die Elektrophorese wurde 45 Minuten mit einer konstanten Spannung von 4,5 V/cm Elektrodenabstand betrieben. Nach dem Lauf wurde das Gel auf einen UV-Schirm mit einer Wellenlänge von 312 nm gebracht. Das Bandenmuster der Fluoreszenz des Farbstoffs Ethidiumbromid, der sich in die DNA einlagert, wurde mit einem Gel-Dokumentationssystem mit integrierter Software *Bioprint* (Vilber Lourmat, Marne la Vallee, Frankreich) auf einem Rechner festgehalten.

2.16 Gewinnung von DNA aus Agarosegelen

Nach der elektrophoretischen Trennung von DNA-Fragmenten in einem Agarosegel können diese durch eine Extraktion aus dem Gel zurückgewonnen werden. Dazu wurde ein Nucleospin Extract Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Als Elektrophoresepuffer wurde TAE-Puffer verwendet, mit dem nach der im Kit beiliegenden Anleitung die besten Ergebnisse für die DNA-Isolierung erzielt werden

können. Die entsprechenden DNA-Banden wurden auf einem UV-Schirm bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Dabei wurde darauf geachtet, die DNA nur kurz der ultravioletten Strahlung auszusetzen, um eventuelle Mutationen zu vermeiden. Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden zerkleinert, in ein verschließbares Gefäß gegeben und abgewogen. Pro 100 mg Gel wurden 300 µl Puffer NT1 zugegeben. Zur vollständigen Auflösung der Gelstücke wurde 10 min auf eine Temperatur von 50 °C erwärmt und etwa alle zwei Minuten geschüttelt. Der gesamte Ansatz wurde auf eine oder mehrere Nucleospin Fertigsäulen aufgetragen. Dazu wurde jeweils eine Portion von 500 µl auf die Säule gebracht, 30 Sekunden in einer Heraeus-Tischzentrifuge mit 8000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dieser Schritt wurde je nach Ausgangsmenge mehrmals wiederholt. Die Säulen mit der gebundenen DNA wurden mit 500 µl Puffer NT2 versetzt und eine Minute mit 11000 rpm zentrifugiert. Dieser Spülvorgang diente zum Entfernen von Inhibitoren und Verunreinigungen, die in der Agarose enthalten sein könnten. Nach Zugabe von 600 µl Puffer NT3 und einer Minute mit 11000 rpm wurde noch einmal mit 200 µl NT3 gespült und zwei Minuten mit 11000 rpm zentrifugiert. Dieser letzte Schritt ist genau einzuhalten, um Puffer NT3 vollständig von der Säule zu entfernen, da im Puffer enthaltener Ethanol nachfolgende Reaktionen, z. B. Sequenzierungen, stören kann. Der Durchfluss bei allen Spülvorgängen wurde verworfen, die Säule wurde in ein steriles 1,5 ml Eppendorf Gefäß gestellt und 50 µl autoklaviertes und sterilfiltriertes Millipore-Wasser zugegeben. Nach einer Minute bei Raumtemperatur wurde die gereinigte DNA mit 11000 rpm eluiert und bei -80 °C gelagert.

2.17 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung des DNA-Gehalts von PCR-Proben wurden diese entsprechend verdünnt und zusammen mit DNA-Lösungen mit bekannter Konzentration auf einem Agarosegel aufgetrennt. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe des Plasmids pUC18 (Pharmacia, Freiburg) im Konzentrationsbereich 5-20 ng/ml verwendet. Durch Vergleich der Fluoreszenzintensität der entsprechenden Banden konnte die Konzentration der unbekannten Probe abgeschätzt werden.

2.18 Screening der cDNA-Bank

Für die Aufklärung der gesamten cDNA-Sequenz für die Pyrimidin 5'-Nukleotidase wurde der entsprechende Klon aus einer cDNA-Bank embryonaler Hühnererythrozyten von Tag 11, die mit Noradrenalin stimuliert wurden, isoliert. Diese cDNA-Bank wurde von Frau Dr. Stefanie Dragon in den ZAP Express Vektor (Stratagene) kloniert [Dragon et al. 2002] und zur Verfügung gestellt.

2.18.1 Kultivierung von Wirtsbakterien

Als Wirtsbakterium für den ZAP Express Vektor dient der *E. coli*-Stamm XL1-Blue MRF', der im *ZAP Express cDNA Synthesis Kit* enthalten ist. Der bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefrorene Bakterienstamm wurde auf einer Petrischale mit LB-Tetracyclin Agar ausgestrichen, die Zellen über Nacht in einem Brutschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und in einem Kühlschrank bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu einer Woche aufbewahrt. Nach einer Woche wurde davon eine einzelne Kolonie auf eine andere Platte gebracht und wieder neu inkubiert.

Flüssigkultur

In einem sterilen Erlenmeyerkolben wurden 49 ml LB-Medium, 0,5 ml MgSO_4 (1 M) und 0,5 ml Maltose (20 %) mit einer einzelnen Bakterienkolonie versetzt und in einem Schüttelinkubator bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu einer OD_{600} von 0,3 geschüttelt. Die Bakterienkultur wurde in ein steriles 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 10 min mit 500 g (Beckman-Zentrifuge) bei RT zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in steriler MgSO_4 -Lösung (10 mM) aufgenommen. Die Extinktion bei 600 nm wurde dabei auf 0,5 eingestellt (ca. 25 ml MgSO_4). Die Wirtsbakterien wurden maximal drei Tage im Kühlschrank gelagert.

2.18.2 Kultivierung von Phagen

Zur Gewinnung von Phagenplaques wurde 1 μl einer entsprechenden Verdünnung der Phagenbank in SM-Puffer mit 200 μl der Wirtsbakterien versetzt und in einem Blockthermostat 15 Minuten bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. In sterilen Reagenzröhrchen wurden jeweils 3 ml NZY Top Agar bei $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Wasserbad vorgelegt, mit der Mischung aus Phagen und Bakterien versetzt und auf Petrischalen mit NZY Agar gegossen. Die Petrischalen wurden zuvor auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt. Nach dem Abkühlen des Top Agars wurden die Platten im Brutschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert bis die Phagenplaques zu entsprechender Größe gewachsen waren (in der Regel acht Stunden) und danach im Kühlschrank aufbewahrt.

2.18.3 Transfer auf Nylonmembranen

Für die Hybridisierung mit einer DNA-Sonde wurden die Phagenplaques auf Nylonmembranen übertragen. Von jeder Platte wurden jeweils zwei Filter gezogen, dabei wurde die erste Membran eine Minute, die zweite Membran zwei Minuten aufgelegt. Mit einer Kanüle wurden Markierungen angebracht, um die Filter später wieder mit der Platte in Deckung bringen zu können.

Anschließend wurden die Membranen nacheinander mit folgenden Lösungen behandelt:

- Denaturierungslösung

- Neutralisierungslösung
- 2 x SSC

Dazu wurden die Filter jeweils fünf Minuten auf zwei Lagen Whatman 3MM Papier gelegt, die mit der entsprechenden Lösung getränkt waren. Dazwischen wurden die Filter kurz auf ein Kleenex-Tuch gelegt, um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen.

Zur Fixierung der DNA wurden die Membranen 30 Sekunden mit 120 mJ im UV-Crosslinker bestrahlt.

Um Zellfragmente und Reste des Agars zu entfernen wurde jeder Filter eine Stunde bei 37 °C mit 0,5 ml einer Lösung von Proteinase K (2 mg/ml) in 2 x SSC behandelt und danach zwischen zwei Lagen feuchtes Whatman Papier gelegt. Mit einem Glasstab wurde über das Papier gerollt und die obere Papierschicht mit den Verunreinigungen vorsichtig wieder abgezogen.

2.18.4 Hybridisierung mit einer cDNA-Sonde

Die Membranen wurden in eine Rollerflasche (150 mm x 35 mm) gegeben (mit runden Plastiknetzen dazwischen) und eine Stunde im Hybridisierungssofen mit 20 ml Dig Easy Hyb (vorgewärmt auf 39 °C) bei 39 °C geschwenkt. Die Digoxigenin-markierte Sonde wurde fünf Minuten bei 94 °C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. 6 µl der Sonde wurden mit 6 ml Dig Easy Hyb (vorgewärmt auf 39 °C) vermischt und in die Rollerflasche gegeben. Die Hybridisierung wurde 20 Stunden bei einer Temperatur von 39 °C durchgeführt.

Nach der Hybridisierung wurden die Membranen mehrmals gewaschen:

- Zweimal fünf Minuten bei Raumtemperatur mit 50 ml 0,1 % SDS in 2 x SSC.
- Zweimal 25 Minuten bei 68 °C mit 50 ml 0,1 % SDS in 0,5 x SSC.

2.18.5 Nachweis der Dig-markierten DNA

Die markierte DNA wurde auf der Membran mit Hilfe des chemilumineszenten Substrats CDP-Star nachgewiesen. Alle Reaktionen und Waschvorgänge wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Membranen wurden nach folgendem Schema behandelt:

- Eine Minute mit 80 ml Waschpuffer
- 45 Minuten in 40 ml Blockierungslösung (BS)
- 10 Minuten in 10 ml BS mit 0,5 µl Anti-Digoxigenin-AP
- Zweimal 15 Minuten in 80 ml Waschpuffer
- Zwei Minuten in 40 ml Detektionspuffer

Auf jede Membran wurden 250 µl einer 1:100 Verdünnung von CDP-Star in Detektionspuffer aufgetragen. Die Membranen wurden in handelsübliche Frischhaltefolie eingeschlagen, damit sich das Substrat gleichmäßig auf der Oberfläche

verteilt. Nach fünf Minuten wurde die Chemilumineszenz auf den Membranen mit einem Bio-Rad Multi-Imager System aufgezeichnet.

2.18.6 Isolierung einzelner Phagenplaques

Interessante Plaques (Signal auf beiden Filtern einer Platte sichtbar) wurden mit einer Pasteurpipette ausgestochen und in 500 µl SM-Puffer mit 15 µl Chloroform überführt. Die Suspension wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert, damit die Phagen in den Puffer diffundieren konnten. Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei 4 °C.

2.19 Proteinsequenzierung

Die Proteinsequenzen wurden am Lehrstuhl für Biochemie I der Universität Regensburg von Prof. Dr. Rainer Deutzmann auf einem Protein-Sequenziergerät (Applied Biosystems, Modell Procise 492) mittels Edman-Abbau bestimmt. Für die Sequenzierung einzelner Teilstücke des gesamten Enzyms wurde die entsprechende Proteinbande nach vorheriger Auftrennung auf einem SDS-Gel ausgeschnitten und mit Trypsin versetzt. Die entstandenen Peptide wurden auf einer HPLC-Anlage (Sykam, Fürstenfeldbruck) isoliert und anschließend sequenziert.

2.20 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierungen mittels *Dye Terminator Cycle Sequencing* wurden von der Firma Entelechon (Regensburg) auf einem ABI Prism 377-96 Sequenziergerät (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Für die Sequenzierung von PCR-Produkten wurde eine Menge von 20 ng DNA pro 100 bp benötigt. Es wurden 5-6 pmol des entsprechenden Sequenzierprimers hinzugefügt. Im Fall eines degenerierten Primers wurden 50 pmol verwendet. Die Proben wurden in 0,2 ml PCR-Gefäßen angesetzt. Das Gesamtvolumen betrug 15 µl.

In einigen Fällen konnten keine guten Sequenzierergebnisse erzielt werden. Da nach der Isolierung der DNA aus Agarosegelen Verunreinigungen in der Probe vorhanden sein könnten, welche die Sequenzierung stören (z. B. Ethanol aus Puffer NT3 für die Isolierung aus dem Gel), wurden diese Proben nochmals gereinigt: Ein entsprechendes Aliquot (40-50 µl) wurde mit sterilem Millipore Wasser auf 500 µl verdünnt und mit einem Microcon YM-30 Mikrokonzentrator wieder auf etwa 40 µl konzentriert (15 min mit 10000 g). Dadurch sollte die Konzentration von niedermolekularen Substanzen in der Probe reduziert werden. Nach dieser Behandlung konnten mit diesen Proben gute Sequenzierungen erreicht werden.

IV Ergebnisse

1 Eigenschaften der Pyrimidin 5'-Nukleotidase

Zur genaueren Charakterisierung des Enzyms wurden verschiedene katalytische Eigenschaften der Pyrimidin 5'-Nukleotidase aus embryonalen Hühnererythrozyten bestimmt. Außerdem wurde der Einfluss von hormonellen Effektoren auf die Enzymaktivität *in vitro* näher untersucht.

1.1 Substratspezifität des Enzyms

Die Ergebnisse für die Aktivität der Pyrimidin 5'-Nukleotidase mit verschiedenen Nukleosidmonophosphaten als Substrat sind in Abbildung 3 zusammengefasst. Die Versuche wurden mit Hämolysat von Erythrozyten des 15. Bebrütungstages durchgeführt. Für jedes Substrat wurden die entstehenden Produkte quantitativ mittels HPLC bestimmt.

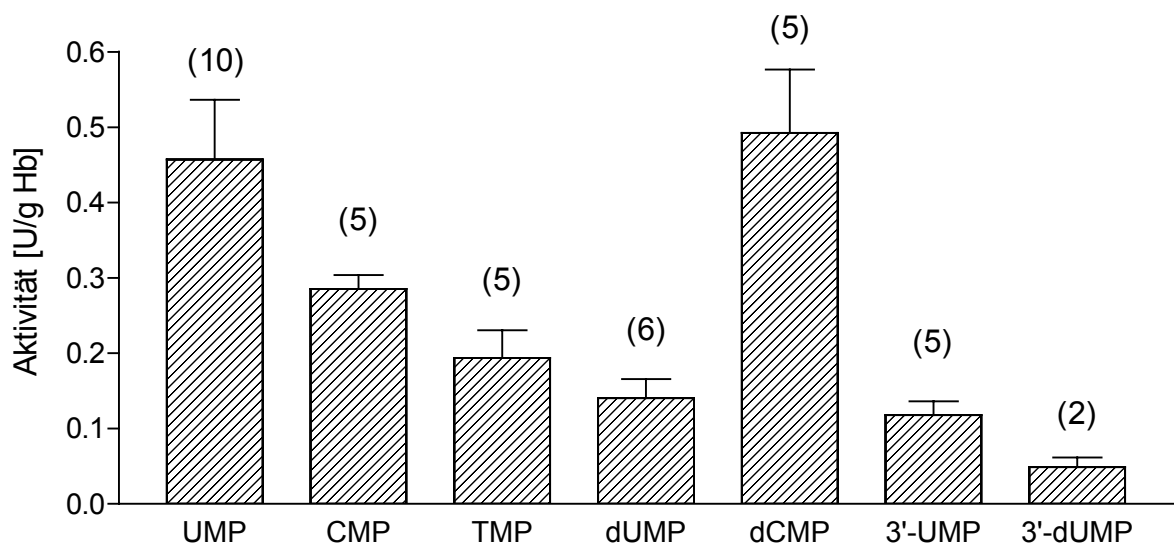


Abbildung 3: Pyrimidin 5'-Nukleotidaseaktivität mit verschiedenen Substraten bei 37 °C. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mehreren unabhängigen Messungen. Die Zahlen in Klammern stehen jeweils für die Anzahl der unabhängigen Versuche. Substratkonzentration jeweils 1 mM. Puffer 50 mM Tris, pH 7,5 mit 10 mM MgCl₂ und 5 mM DTT.

Aus der Abbildung wird deutlich, dass unter den beim Aktivitätstest herrschenden Bedingungen die höchste Aktivität mit UMP und dCMP erreicht wird, gefolgt von CMP und TMP. Die getesteten 3'-Nukleotide werden nur mit relativ geringer Aktivität umgesetzt.

Mit einer Enzympräparation, die durch Chromatographie an DE 52 und Sephacryl S 100 gereinigt worden war (siehe Ergebnisse Kapitel 2.1), wurde geprüft, ob unter

Standardbedingungen des Aktivitätstests (37 °C, pH 7,5) die 5'-Purinnukleotide AMP, GMP und IMP zu ihren Nukleosiden abgebaut werden. Die Fraktion enthielt 6,6 U/l an Aktivität mit einer spezifischen Aktivität von 0,5 U/mg. Für den Aktivitätstest wurden jeweils gleiche Aliquots dieser Fraktion und 1 mM des entsprechenden Substrats eingesetzt. Die Produkte wurden mittels HPLC analysiert. Während in der Kontrolle mit UMP eine deutliche Menge Uridin gemessen wurde, konnten im Fall der anderen Substrate keine Produkte detektiert werden.

Des weiteren wurde mit Hämolsat von 15 Tage alten Embryonen untersucht, ob die Enzymaktivität durch AMP gehemmt wird, da für die Pyrimidin 5'-Nukleotidase aus Humanerythrozyten in Gegenwart von AMP eine geringere Aktivität gemessen wurde [Paglia und Valentine 1975, Magni et al. 1989]. AMP wurde auch als Substrat getestet, es konnte aber keine Aktivität gemessen werden. Es wurden zwei Untersuchungen mit verschiedenen Substratkonzentrationen (1 mM bzw. 0,1 mM UMP) durchgeführt, die AMP-Konzentration betrug in beiden Fällen 1 mM. Es wurde jeweils ein Kontrollwert ohne AMP bestimmt. Die Werte sind in folgender Abbildung dargestellt:

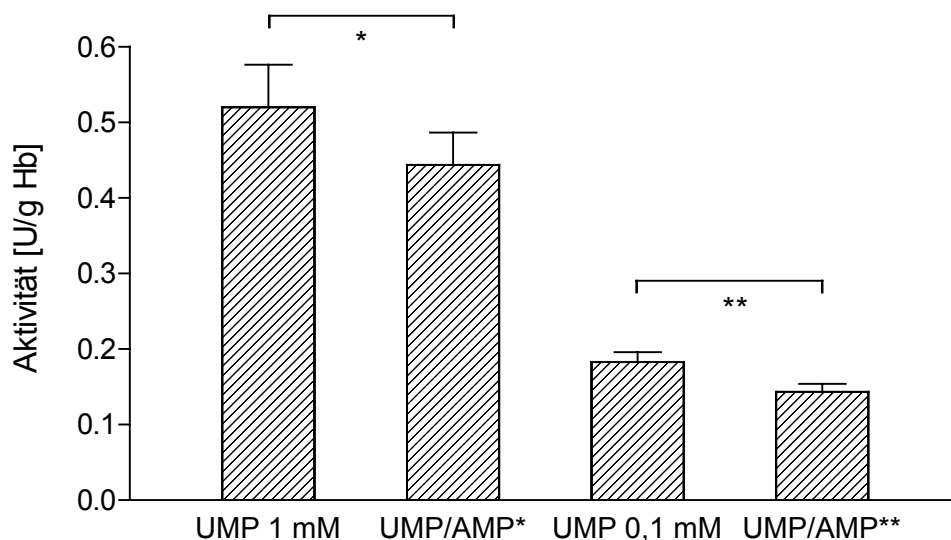


Abbildung 4: Einfluss von 1 mM AMP auf die Pyrimidin 5'-Nukleotidaseaktivität bei 37 °C. Puffer 50 mM Tris, pH 7,5 mit 10 mM MgCl₂ und 5 mM DTT. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) von fünf Messungen. Die Werte wurden mit dem t-test für abhängige Proben analysiert. * 1 mM UMP, 1 mM AMP, $P=0,0011$. ** 0,1 mM UMP, 1 mM AMP, $P=0,0047$.

Die Ergebnisse belegen zwar einen statistisch signifikanten Unterschied in Anwesenheit von AMP, jedoch ist die Hemmung schwach ausgeprägt. Sie beträgt nur etwa 15 % bei einer Konzentration von 1 mM UMP und 21 % bei 0,1 mM UMP.

1.2 Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert

Die Aktivität der Pyrimidin 5'-Nukleotidase im Hämolyolat embryonaler Erythrozyten des 15. Bebrütungstages wurde in Abhängigkeit vom pH-Wert für die Substrate UMP und CMP bestimmt. Für den Aktivitätstest wurde hier anstelle eines Tris-HCl-Puffers eine Pufferkombination aus Trisbase und Maleinsäure, eingestellt auf verschiedene pH-Werte, verwendet.

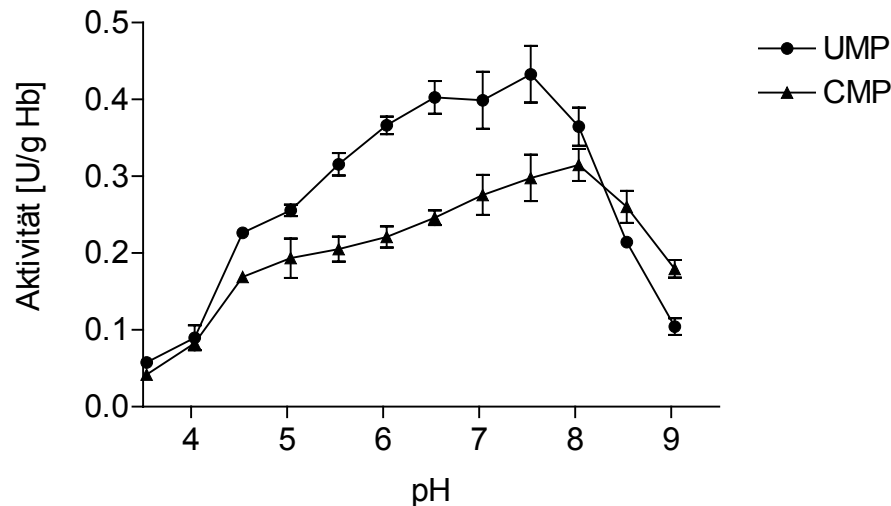


Abbildung 5: Aktivität der Pyrimidin 5'-Nukleotidase mit 1 mM UMP bzw. 1 mM CMP bei verschiedenen pH-Werten ($T=37^\circ\text{C}$). Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert aus drei Messungen. Die Aktivität wurde gemessen in 50 mM Tris-Puffer, mit 10 mM MgCl_2 und 5 mM DTT, mit Maleinsäure auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt.

Die maximale Aktivität der Pyrimidin 5'-Nukleotidase wird bei einem pH-Wert von 7,5 (UMP) bzw. 8,0 (CMP) erreicht. Bei einer Erhöhung des pH-Werts nimmt die Aktivität rasch ab, während die Abnahme der Aktivität bei Erniedrigung des pH-Werts weniger steil verläuft.

1.3 Hemmung der Enzymaktivität durch Metallionen

Es ist bekannt, dass bestimmte Metallionen die Pyrimidin 5'-Nukleotidase aus Humanerythrozyten hemmen [Paglia und Valentine 1975]. Daher wurde der Einfluss von Metallionen auf die Aktivität des Enzyms aus den Erythrozyten 15 Tage alter Hühnerembryonen untersucht.

Die Ergebnisse für die Enzymaktivität in Gegenwart von verschiedenen Metallionen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst. Es wurden jeweils die Mittelwerte aus drei Messungen gebildet. Die Aktivitäten wurden in Prozent des Kontrollwerts angegeben.

Probe	Prozent der Aktivität
Kontrolle	100 ± 1
10 mM Ba ²⁺	93 ± 4
10 mM Mn ²⁺	20 ± 1
10 mM Zn ²⁺	0
1 mM Co ²⁺	96 ± 15
1 mM Cu ²⁺	27 ± 1
1 mM Mn ²⁺	59 ± 5
1 mM Ni ²⁺	88 ± 11
1 mM Zn ²⁺	6 ± 1
1 mM Zn ²⁺ + 5 mM EDTA	86 ± 2
0,5 mM Cr ³⁺	108 ± 3
5 mM EDTA	96 ± 2

Tabelle 1: Aktivität der Pyrimidin 5'-Nukleotidase in Anwesenheit verschiedener Metallionen bei 37 °C (n=3). Puffer 50 mM Tris, pH 7,5 mit 10 mM MgCl₂ und 5 mM DTT.

Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, zeigen die Metalle Ba²⁺, Co²⁺ und Ni²⁺ in einer Konzentration von 10 mM bzw. 1 mM keinen ausgeprägten inhibierenden Effekt. Cr³⁺ in einer Konzentration von 0,5 mM bewirkt sogar eine leichte Aktivierung der Aktivität. Dagegen kann in Gegenwart von 1 mM Cu²⁺, Mn²⁺ und Zn²⁺ ein deutliches Absinken der Aktivität beobachtet werden. Durch Zugabe von 5 mM EDTA zum Reaktionsansatz kann der hemmende Effekt von 1 mM Zn²⁺ wieder aufgehoben werden. Vergleichbare Werte wurden auch für die Pyrimidin 5'-Nukleotidase aus Humanerythrozyten ermittelt [Paglia und Valentine 1975].

1.4 Einfluss von Noradrenalin und Actinomycin D auf die Pyrimidin 5'-Nukleotidaseaktivität definitiver Hühnererythrozyten

Frühere Ergebnisse [Dragon et al. 1998] zeigten, dass bei Stimulierung einer Präparation von Erythrozyten elf Tage alter Hühnerembryonen mit Noradrenalin die Pyrimidin 5'-Nukleotidaseaktivität nach 16 h signifikant steigt. In Ergänzung zu diesen Untersuchungen sollte das Induktionsprofil der Enzymaktivität während einer Langzeitinkubation mit Noradrenalin in FCS und F-10 Medium verfolgt werden. Die Ergebnisse von fünf Inkubationen mit Erythrozyten des elften Bebrütungstages sind in der folgenden Abbildung zusammengefasst:

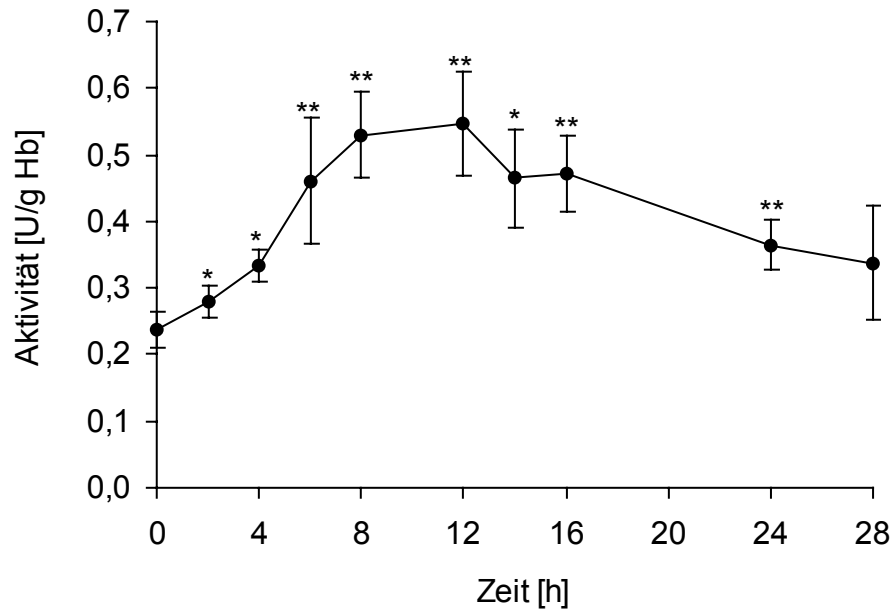


Abbildung 6: Verlauf der Pyrimidin 5'-Nukleotidaseaktivität während einer *in vitro* Inkubation mit 10 μ M Noradrenalin über 28 Stunden. Inkubation mit einem Zytokrit von 4 % bei 37 °C in F-10 Medium mit 10 % FCS, pH 7,4. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert und die Standardabweichung aus fünf Experimenten (14 h und 28 h nur vier Messwerte). Die Ergebnisse wurden mit dem t-test für abhängige Proben analysiert: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Noradrenalin bewirkt nach sechs Stunden eine deutliche Steigerung ($P < 0,01$) der Enzymaktivität. Diese erreicht nach zwölf Stunden ihren maximalen Wert und fällt danach wieder langsam ab. Nach 28 Stunden liegt die Aktivität noch um 42 % über dem Ausgangswert ($P = 0,07$).

Während der Ontogenese (siehe Abbildung 1) kann eine deutliche Abnahme der Enzymaktivität nach Tag 15 beobachtet werden. Diese Abnahme *in vivo* könnte zum Beispiel mit einer kurzen Halbwertszeit der zugehörigen mRNA zusammenhängen. Versuche mit dem Transkriptionshemmstoff Actinomycin D sollten klären, ob die Abnahme der Aktivität *in vitro* von der Transkription bzw. dem RNA-Abbau abhängt.

Dazu wurden in zwei unabhängigen Versuchsreihen Erythrozyten von Tag 11 zunächst sieben Stunden mit Noradrenalin stimuliert, dann wurden die Zellen auf zwei neue Ansätze in Inkubationsmedium (Versuchsreihe 1 ohne Noradrenalin, Versuchsreihe 2 mit Noradrenalin) verteilt. Jeweils einer der beiden neuen Ansätze wurde zusätzlich mit Actinomycin D inkubiert. Jede Versuchsreihe wurde zweimal durchgeführt (Pool 1 und Pool 2). Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Versuchsreihe 1				
	Pool 1		Pool 2	
Zeit [h]	Ohne Effektor	Mit Actinomycin D	Ohne Effektor	Mit Actinomycin D
0	0,451	0,451	0,508	0,508
1	0,551	0,609	0,608	0,588
3	0,653	0,593	0,688	0,539
5	0,562	0,590	0,642	0,519
Versuchsreihe 2				
	Pool 1		Pool 2	
Zeit [h]	Mit 10 μ M NE	10 μ M NE + 35 μ M Actinomycin D	Mit 10 μ M NE	10 μ M NE + 35 μ M Actinomycin D
0	0,620	0,620	0,615	0,615
6	0,791	0,628	0,592	0,416
8	0,818	0,489	0,646	0,337
10	0,813	0,528	0,526	0,300

Tabelle 2: Enzymaktivität während verschiedener Inkubationen von Erythrozytenpräparationen des 11. Bebrütungstages (Zytokrit 4%) mit 10 μ M Noradrenalin (NE) bzw. 35 μ M Actinomycin D bei 37 °C in F-10 Medium mit 10 % FCS, pH 7,4. Die Zellen waren bereits 7 h mit 10 μ M NE vorinkubiert worden.

Bei der ersten Versuchsreihe stieg auch ohne weitere Stimulierung mit Noradrenalin die Aktivität noch etwas an, vergleichbar mit dem Verlauf der Aktivität in Abbildung 6 zwischen sieben Stunden und zwölf Stunden. Der Anstieg war auch in den Proben mit Actinomycin D zu beobachten. Im untersuchten Zeitraum muss die mRNA eine ausreichende Stabilität besitzen, so dass auch bei Hemmung der Transkription weiterhin Enzym synthetisiert wird.

In der zweiten Versuchsreihe, die mit Noradrenalin weiter inkubiert wurde, war die Aktivität in den Proben mit Actinomycin D nach sechs bis zehn Stunden jeweils niedriger als in den Proben ohne Actinomycin D. Allerdings lassen sich aus diesem Ergebnis keine Rückschlüsse ziehen, ob diese Abnahme allein durch den Abbau der entsprechenden mRNA oder durch eine hohe Abbaurate des Enzyms bedingt ist.

1.5 Aktivität der Pyrimidin 5'-Nukleotidase nach Stimulierung von embryonalen Hühnererythrozyten mit CPCA oder Forskolin

Auf der Grundlage bekannter Ergebnisse für die Stimulierung mit Noradrenalin [Dragon et al. 1998] wurde die Wirkung von CPCA und Forskolin auf die Aktivität der Pyrimidin 5'-Nukleotidase von embryonalen Hühnererythrozyten des elften Bebrütungstages untersucht. Die Zellen wurden mit einem Zytokrit von 4 % bei

37 °C in F-10 Medium mit 10 % FCS und 10 µM CPCA bzw. 100 µM Forskolin über 16 Stunden inkubiert. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt:

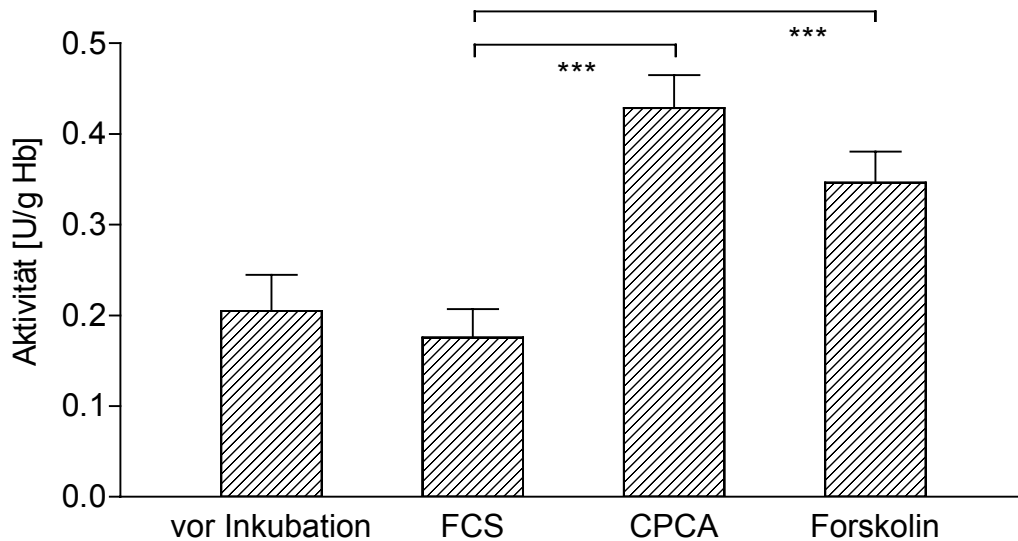


Abbildung 7: Aktivität der Pyrimidin 5'-Nukleotidase nach 16 h Inkubation mit 10 µM CPCA bzw. 100 µM Forskolin. Inkubation mit einem Zytokrit von 4 % bei 37 °C in F-10 Medium mit 10 % FCS, pH 7,4. Die Aktivität wurde mit 1 mM UMP als Substrat bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf Experimenten. *** steht für einen signifikanten Unterschied ($p < 0,001$), ermittelt mit dem t-test für abhängige Stichproben.

Sowohl CPCA als auch Forskolin bewirken eine signifikante Steigerung der Enzymaktivität im Vergleich zum Kontrollansatz mit FCS.

2 Reinigung des Enzyms

2.1 Chromatographie

Nach zahlreichen Versuchen, die sich zunächst an bekannten Schemata [Markin et al. 1983, Amici et al. 1994] für die Reinigung der Pyrimidin 5'-Nukleotidase aus Humanerythrozyten orientierten, aber nur schlechte Ergebnisse lieferten, konnte schließlich mit folgenden Schritten eine erfolgreiche Reinigung erzielt werden:

- 1) Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose (Whatman DE 52)
- 2) Gelfiltration über Sephacryl S 100
- 3) Chromatographie an Blue Sepharose

Als Ausgangsmaterial wurde Hämolyt aus Eiern des 15. Bebrütungstages (ca. 58 ml gepackte Erythrozyten) eingesetzt. Nach der Dialyse gegen Tris-Puffer wurde das Volumen des Hämolytats mit Tris-Puffer genau auf 150 ml eingestellt und das Hämolytat auf die Ionenaustauscher-Säule gebracht. Die detaillierten Ergebnisse

für die einzelnen Schritte sind im Anschluss an diesen Abschnitt dargestellt. Der Verlauf der Reinigung ist in folgender Übersicht zusammengefasst:

	Volumen [ml]	Protein [mg]	Aktivität [U]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Reinigungs- faktor
HämolySAT	150	19830	3,70	$1,87 \cdot 10^{-4}$	100	
DE 52	60	80,3	2,55	0,0317	69	170
Sephacryl S 100	3,2	2,27	1,02	0,451	28	2416
Blue Sepharose	2,5	0,12	0,53	4,61	14	24688

2.1.1 Ionenaustauscher

DEAE-Cellulose

Die folgende Abbildung zeigt den Verlauf der Enzymaktivität in den einzelnen Fraktionen nach der Chromatographie an DE 52. Nach dem Spülen, bei dem vor allem das Hämoglobin entfernt wurde, wurde die Säule mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert. Es wurden Fraktionen mit einem Volumen von 12 ml gesammelt.

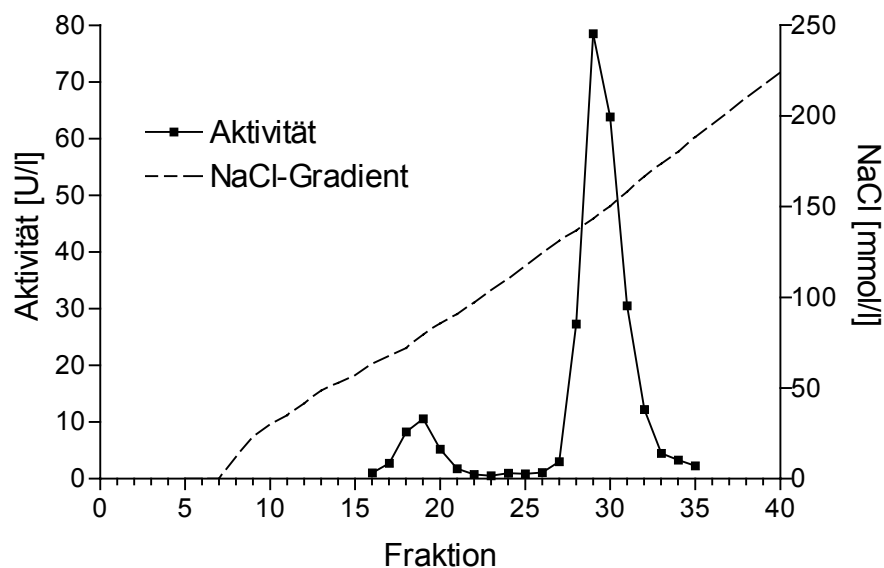


Abbildung 8: Verlauf der Enzymaktivität bei Elution einer DE 52 Säule mit einem Gradienten von 0-0,5 M NaCl bei 4 °C. Äquilibrierungspuffer: 50 mM Tris, pH 7,5 mit 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA und 0,5 mM PMSF.

Es konnten zwei Peaks mit einer Aktivität gegenüber UMP getrennt werden. Die Maxima dieser Peaks lagen bei einer Konzentration von etwa 80 mM bzw. 145 mM NaCl im Elutionspuffer. Die Ausbeute für die beiden Peaks betrug 10 % bzw. 73 %. Die spezifische Aktivität und der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen ist in der nächsten Abbildung dargestellt:

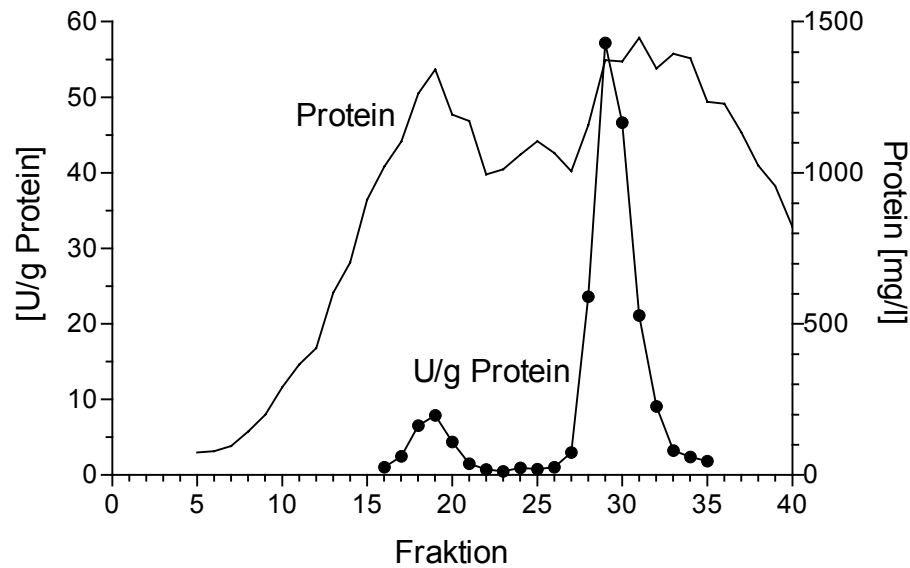


Abbildung 9: Spezifische Aktivität und Gesamtprotein bei Elution einer DE 52 Säule mit einem Gradienten von 0-0,5 M NaCl bei 4 °C. Äquilibrationpuffer: 50 mM Tris, pH 7,5 mit 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA und 0,5 mM PMSF.

Die Fraktionen 28-32 wurden gepoolt und bis zur Gelfiltration bei -80 °C aufbewahrt.

2.1.2 Gelfiltration

Sephacryl S 100

Die Fraktionen 28-32 (53 ml) aus der Reinigung mit DE 52 im vorhergehenden Kapitel wurden vereinigt und durch Ultrafiltration mit einer YM-10 Membran auf etwa 1,6 ml konzentriert. Ein Aliquot (2,5 µl) wurde zur Bestimmung der Aktivität und des Proteingehalts zurückgestellt und 1,6 ml auf die Säule geladen. Die nachstehende Abbildung zeigt die Proteinkonzentration (nach Bradford) und die Enzymaktivität in den einzelnen Fraktionen. Das Volumen jeder Fraktion betrug etwa 3,2 ml.

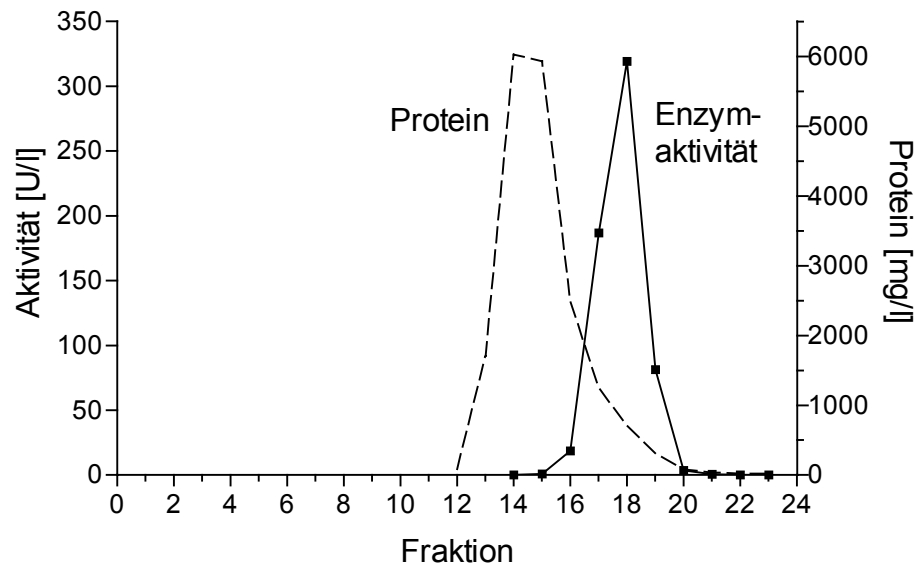


Abbildung 10: Gelfiltration über Sephacryl S 100. Dargestellt sind der Verlauf von Gesamteproteinkonzentration und Enzymaktivität in den einzelnen Fraktionen. Äquilibrationpuffer: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5 mit 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA und 0,5 mM PMSF.

Ein großer Teil der verunreinigenden Proteine läuft im Ausschlussvolumen der Säule (ca. 40 ml) und konnte dadurch von den Fraktionen mit der Pyrimidin 5'-Nukleotidaseaktivität abgetrennt werden.

Die folgende Tabelle enthält die genauen Werte für die einzelnen Fraktionen:

Fraktion	Aktivitätskonzentration [U/l]	Aktivität [mU]	Gesamteprotein [µg/ml]	Spezifische Aktivität [mU/mg]
Aufgetragen	1288	2060	40061	32,2
16	18,7	59,8	2496	7,49
17	187	598	1252	149
18	319	1021	708	451
19	81,3	260	309	263
20	3,63	11,6	80,4	45,1

Die gesamte Ausbeute an aufgetragener Enzymaktivität betrug bei dieser Chromatographie 95 %. In Fraktion 18 konnte eine Steigerung der spezifischen Aktivität um den Faktor 14 bei einer Ausbeute von 50 % erreicht werden.

Die folgende Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus einem 12 % SDS-Gel, auf dem die beiden Fraktionen mit der größten Aktivität aus einer anderen Chromatographie mit Sephacryl S 100 aufgetrennt wurden. Das Volumen jeder Fraktion betrug hier 4,5 ml. Fraktion 10 enthielt 140 mU mit einer spezifischen Aktivität von 0,23 U/mg. Fraktion 11 enthielt 304 mU mit einer spezifischen Aktivität von 0,71 U/mg.

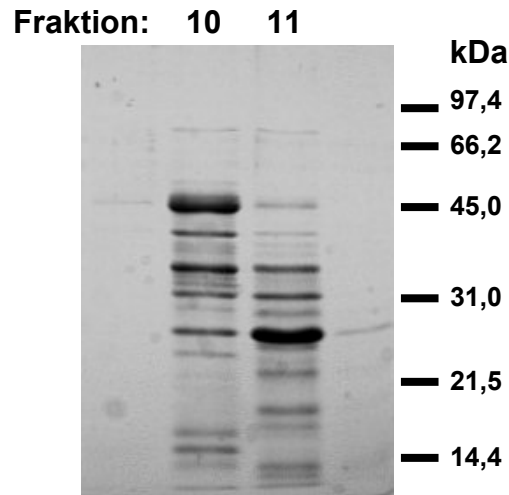


Abbildung 11: 12 % SDS-Gel mit Fraktionen nach Reinigung an Sephacryl S 100. Aufgetragene Aktivität: 3,11 mU (Fraktion 10) bzw. 6,75 mU (Fraktion 11).

Auf dem Elektrophoresegele ist zu erkennen, dass die einzelnen Proben noch eine große Anzahl von verschiedenen Proteinen enthielten. Für die P5N-I aus Humanerythrozyten wurde ein Molekulargewicht von 34000 Da [Amici et al. 1997] bei der SDS-Elektrophorese angegeben. In diesem Bereich waren nach der Gelfiltration noch mehrere, dicht beieinander liegende Banden vorhanden. Daher wurde mit weiteren chromatographischen Schritten versucht, die Reinheit des Enzyms zu verbessern. Verschiedene Verfahren, die sich an der Reinigung des Humanenzyms orientierten, führten zu keinen befriedigenden Ergebnissen (siehe Ergebnisse 2.2). Als beste Möglichkeit stellte sich schließlich eine Chromatographie an Blue Sepharose heraus.

2.1.3 Blue Sepharose

Fraktion 18 aus der Gelfiltration mit Sephacryl S 100 wurde mit Microcon-Filtereinheiten auf etwa 100 µl eingeengt und mit 150 µl Tris-Puffer verdünnt. Ein Aliquot von 2 µl wurde zurückgestellt und 250 µl auf eine Blue Sepharose Säule (Volumen: 5 ml) aufgetragen. Die Säule wurde mit 15 ml Tris-Puffer bei einer Flussrate von 0,1 ml/min gespült. Das Volumen der Fraktionen 1 und 2 betrug jeweils 1,8 ml. Bei den restlichen Fraktionen wurden jeweils 0,83 ml aufgefangen.

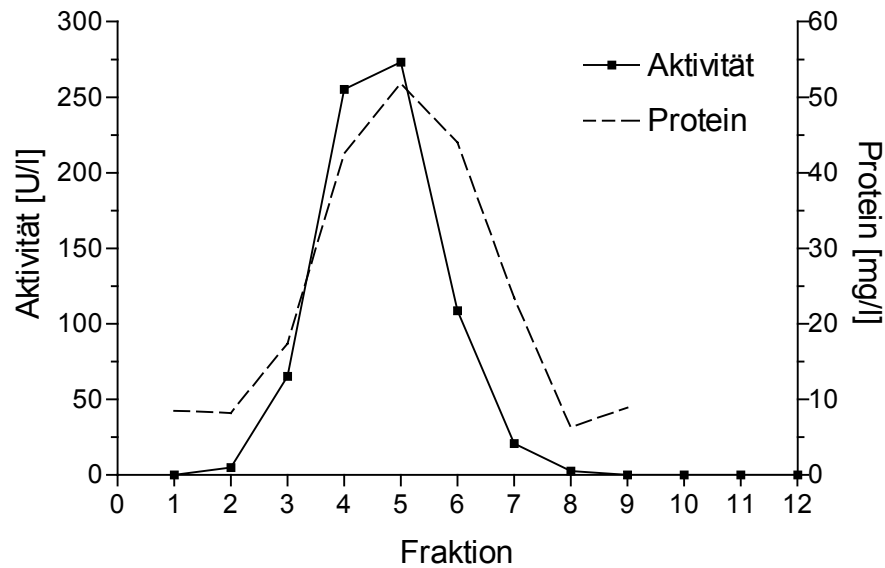


Abbildung 12: Chromatographie an Blue Sepharose (5 ml Säule). Dargestellt sind Enzymaktivität und Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen. Äquilibrierungspuffer: 50 mM Tris, pH 7,5 mit 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA und 0,5 mM PMSF.

Bei den gewählten Bedingungen bindet die Pyrimidin 5'-Nukleotidase nicht an die Säule. Allerdings konnten mit diesem Schritt größere Mengen verunreinigender Proteine entfernt werden. Die Reinheit der einzelnen Fraktionen ist in der Tabelle zusammengefasst:

Fraktion	Aktivitätskonzentration [U/l]	Aktivität [mU]	Gesamtprotein [µg/ml]	Spezifische Aktivität [U/mg]
Aufgetragen	2895	724	6489	0,45
3	65,3	54,17	17,4	3,75
4	255	212	42,5	6,00
5	273	227	51,8	5,27
6	109	90,3	44,0	2,48
7	20,8	17,3	23,5	0,89

Insgesamt konnten 85 % der aufgetragenen Aktivität in den einzelnen Fraktionen wiedergefunden werden. Die höchste spezifische Aktivität wurde in Fraktion 4 erreicht (6 U/mg, Reinigungsfaktor 13, Ausbeute 29 %). Die Fraktionen 4 und 6 wurden für die Proteinsequenzierungen verwendet.

2.2 Vergleich mit der Reinigung des Humanenzym

Zur chromatographischen Reinigung wurden anfangs verschiedene Verfahren getestet, die bei der Isolierung der Pyrimidin 5'-Nukleotidase aus Humanerythrozyten erfolgreich eingesetzt wurden. Dabei zeigte sich allerdings ein unterschiedliches Verhalten des Enzyms aus Hühnererythrozyten und mit diesen Methoden konnten keine positiven Ergebnisse erzielt werden. Die Ergebnisse sind im folgen-

den Abschnitt zusammengefasst. Zur genauen Durchführung siehe Kapitel Material und Methoden.

2.2.1 Hydrophobe Chromatographie

Amici et al. [1994] verwendeten bei der Reinigung der Pyrimidin 5'-Nukleotidase aus Humanerythrozyten erfolgreich eine Säule mit Phenyl-Sepharose. Das Humanenzym konnte dort mit 1 M KCl in 50 mM Imidazol-Puffer bei pH 6,5 eluiert werden. Bei meinen Experimenten war für eine vollständige Elution des Enzyms aus Hühnererythrozyten die Anwesenheit von CHAPS bzw. Triton X-100 im Elutionspuffer erforderlich.

Mit 30 % Ethylenglykol und 1,5 % Triton X-100 in 20 mM Tris-Puffer (pH 7,5) konnte das Enzym vollständig eluiert werden. Da Triton X-100 für weitere Reinigungsschritte störend war, musste es nach der Chromatographie aus den Proben entfernt werden. Da dies nicht durch Dialyse möglich ist, wurde versucht, das Tensid durch Chromatographie an dem unpolaren Material Bio-Beads SM-4 zu entfernen. Allerdings konnte keine Enzymaktivität mehr von der Säule eluiert werden.

Mit 25 % Ethylenglykol und 0,8 mM CHAPS in 20 mM Tris-Puffer (pH 7,5) konnte eine Reinigung um den Faktor 8 mit einer Ausbeute von 70 % erreicht werden. Allerdings wurde dieser Schritt schließlich nicht bei der Reinigung des Enzyms eingesetzt, da durch die Verwendung von Blue Sepharose bessere Reinigungseffekte erzielt wurden.

Von der weniger hydrophoben Methyl-Säule wurde das Enzym nicht gebunden.

2.2.2 Hydroxyapatit

Hydroxyapatit wurde von Amici et al. [1994] bei der Reinigung der Pyrimidin 5'-Nukleotidase aus Humanerythrozyten eingesetzt. In dieser Arbeit wurden mehrere Versuche mit diesem Material unternommen.

Das Enzym konnte nicht wie für das Humanenzym beschrieben mit NaCl von der Säule eluiert werden. Bei der Elution mit KF wurde die meiste Aktivität in einer Fraktion mit 35 mM KF erhalten. Mit KH_2PO_4 wurde die Elution bei 100 mM erreicht. Dabei konnten allerdings nur schlechte Ergebnisse für die Reinheit der erhaltenen Enzympräparation erzielt werden. Außerdem ergaben sich bei allen Versuchen geringe Ausbeuten.

2.2.3 Affinitätschromatographie

Bei der Reinigung des Enzyms aus Humanerythrozyten wurde erfolgreich UDP-agarose eingesetzt [Markin et al. 1983]. Das Enzym aus Hühnererythrozyten konnte aber nicht daran gebunden werden. Daher wurden weitere Materialien, die immobili-

sierte Nukleotide oder Phosphatgruppen enthalten, als mögliche Affinitätsmatrix getestet. Bei einer spezifischen Wechselwirkung des katalytischen Zentrums des Enzyms mit der Matrix sollte sich das Enzym durch das Substrat UMP eluieren lassen. Allerdings konnte keine geeignete Matrix für die Pyrimidin 5'-Nukleotidase gefunden werden. An CMP-agarose und Cellulosephosphat konnte das Enzym ebenfalls nicht gebunden werden.

UDPG-agarose

Mit 10 mM UMP in Trispuffer konnte keine Elution erreicht werden. Bei einer NaCl-Konzentration von 50 mM in Tris-Puffer wurde das Enzym teilweise eluiert, was darauf hinweist, dass die Bindung an die Säule nur durch unspezifische Wechselwirkung mit der Agarose erfolgt.

Red Sepharose

Da einige Enzyme, die Nukleotide als Substrate oder Cofaktoren besitzen, durch ihre Affinität zu Reaktivfarbstoffen gereinigt werden können [Thompson et al. 1975, Hughes et al. 1982], wurde Red Sepharose als Matrix getestet.

Hier konnte nur ein Teil des Enzyms an die Säule gebunden werden. 37 % der aufgetragenen Aktivität wurden bei pH 8,0 nicht gebunden (25 % pH 7,0). Mit UMP konnte keine Elution des Enzyms erreicht werden. Offensichtlich kommt es zu keiner Wechselwirkung des katalytischen Zentrums des Enzyms mit der Matrix. Mit Puffern hoher Salzkonzentration (1 M KCl) konnte das restliche gebundene Enzym eluiert werden (30 % Ausbeute bei pH 8,0; 21 % bei pH 7,0). Da das Enzym von Red Sepharose nur teilweise gebunden wurde und die Ausbeuten der einzelnen Peaks gering waren, wurden keine weiteren Versuche mit Red Sepharose unternommen und stattdessen die Matrix Blue Sepharose getestet.

2.2.4 Weitere Säulenmaterialien

Sephadex A 50, Sephadex G 50 und Sephadex G 75

Da die Reinigungseffekte, sowie Stabilität und Laufeigenschaften von Sephadex A 50 unbefriedigend waren, wurde stattdessen der Ionenaustauscher DE 52 verwendet. Sephadex G 50 brachte im Vergleich mit Sephacryl S 100 keine wesentliche Verbesserung der spezifischen Aktivität, daher wurde auf diesen Schritt verzichtet. Mit Sephadex G 75 wurden bei einer Flussrate von 0,1 ml/min vergleichbare Reinigungseffekte erzielt wie mit Sephacryl S 100. Sephacryl S 100 wurde aufgrund der besseren Laufeigenschaften (höhere Flussrate) des Gels gewählt.

2.2.5 Reinigung mit Hämolyat von adulten Hühnern

In einem Fall konnte durch Chromatographie an DE 52 (aufgetragen: 1,1 U Aktivität, 22,3 g Gesamtprotein) eine spezifische Aktivität von 0,008 U/mg bei 38 % Ausbeute

erreicht werden. In drei weiteren Versuchen unter ähnlichen Bedingungen ergaben sich noch schlechtere Ausbeuten mit geringeren spezifischen Aktivitäten. Nach anschließender Gelfiltration mit Sephacryl S 100 lag die Reinheit der erhaltenen Proben bei maximal 0,06 U/mg. Da die Enzymaktivität im Hämolysat adulter Hühner geringer ist (0,18 U/g Hb), wurde auch eine größere Ausgangsmenge an Hämolysat benötigt.

2.3 Elektrophoretische Trennung und Sequenzierung des Enzyms

Für die erste N-terminale Sequenzierung wurde eine Probe eingesetzt, die ähnlich dem in Kapitel IV.2.1 beschriebenen Schema durch Chromatographie gereinigt worden war. Diese Fraktion enthielt 65,5 mU Enzym mit einer spezifischen Aktivität von 0,61 U/mg in einem Volumen von 1,8 ml.

1,65 ml dieser Fraktion (60,1 mU) wurden mit Microcon-Filtern konzentriert und durch Elektrophorese auf einem 10 % Nativgel aufgetrennt. Das Enzym wurde mit UMP in Testpuffer nachgewiesen. Die entstehende Bande wurde ausgeschnitten und das Enzym aus dem Gel eluiert. Die erhaltene Proteinprobe wurde auf ein kleines 10 % SDS-Gel aufgetragen, an das eine konstante Stromstärke von 20 mA angelegt wurde.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf eine PVDF-Membran geblottet. Die nächste Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus der Blotmembran:

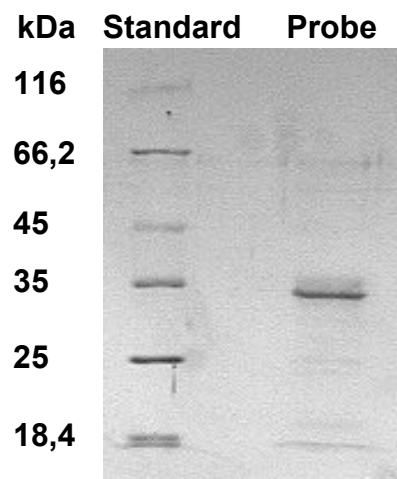


Abbildung 13: Western-Blot der Pyrimidin 5'-Nukleotidase auf PVDF-Membran nach vorhergehender Trennung durch native und SDS-Gelelektrophorese.

Auf dem Blot ist eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von etwa 34 kDa zu erkennen. Die Bande wurde ausgeschnitten und die N-terminale Sequenz nach Edman ermittelt. Dabei ergab sich folgende Sequenz von 12 AS:

PEFQKKTVHIKD

Da zu diesem Zeitpunkt der Arbeit die Protein- und Nukleotidsequenz der P5N-I aus Humanerythrozyten bereits bekannt waren [Amici et al. 2000], konnte durch Vergleich mit der Humansequenz geschlossen werden, dass das sequenzierte Protein der Pyrimidin 5'-Nukleotidase entspricht.

Zur Ermittlung von weiteren Proteinsequenzen wurden die Fraktionen 4 und 6 aus der Chromatographie an Blue Sepharose (Kapitel IV.2.1.3) eingesetzt. Dabei wurde auf die Reinigung durch eine native Gelelektrophorese verzichtet und die Proben direkt auf einem großen SDS-Gel (16 x 20 cm) aufgetrennt.

Fraktion 6 (830 µl, 90,3 mU, 2,5 U/mg) wurde eingengt, in SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf das Gel geladen. Die Elektrophorese wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Nach dem Lauf wurde ein passendes Gelstück entsprechend der Größe einer Blotmembran ausgeschnitten. Um dabei die Lage der Pyrimidin 5'-Nukleotidase ohne Gelfärbung bestimmen zu können, wurde ein vorgefärbter Protein-Standard (Peqlab PeqGOLD) mit auf das Gel geladen. Das Gelstück wurde auf eine PVDF-Membran geblottet, diese wurde mit Coomassie angefärbt. Das Proteinmuster auf dem Blot ist in der nächsten Abbildung zu sehen:

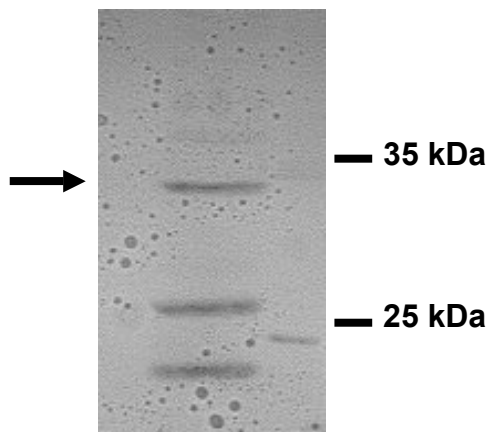


Abbildung 14: Proteinblot mit Fraktion 6 von Blue Sepharose (Kapitel IV.2.1.3, 90 mU Aktivität, 2,5 U/mg) nach vorhergehender Elektrophorese auf 10 % SDS-Gel. Färbung mit Coomassie.

Die Bande bei ca. 34 kDa (siehe Pfeil) wurde ausgeschnitten und die N-terminale Sequenz bestimmt. Als Ergebnis der Sequenzierung wurde eine Anfangssequenz von 39 AS erhalten (siehe Abbildung 21, Kapitel IV.3.4).

Fraktion 4 (830 µl, 212 mU, 6 U/mg) wurde eingengt und mit SDS-Probenpuffer verdünnt. Die Elektrophorese wurde auf einem großen SDS-Gel durchgeführt. Nach dem Lauf wurde anhand eines vorgefärbten Standards ein entsprechender Bereich (6 x 15 cm) des Gels ausgeschnitten und mit Coomassie gefärbt. Nach der Färbung wurde das Gel über Nacht mit reichlich Wasser gewaschen (zweimal gewechselt), um die Reste der Färbelösung möglichst aus dem Gel zu entfernen. Das Bandenmuster des gefärbten Gels wurde fotografisch festgehalten:

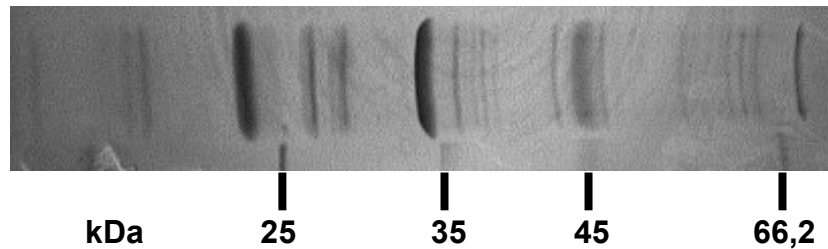


Abbildung 15: Elektrophorese mit Fraktion 4 von Blue Sepharose (Kapitel IV.2.1.3, 212 mU Aktivität, 6 U/mg) auf 10 % SDS-Gel. Färbung mit Coomassie.

Die starke Bande bei etwa 34 kDa wurde ausgeschnitten und einer Peptidspaltung mit Trypsin unterzogen. Nach Isolierung einiger entstandener Peptide mit der HPLC konnten vier weitere Teilsequenzen innerhalb des Proteins erhalten werden: SHALLIEQG, VVSNFMDFDENGILK, GFKGELIHV, IGYLND.

3 Bestimmung der mRNA-Sequenz der Pyrimidin 5'-Nukleotidase

3.1 Amplifikation von Teilsequenzen mit der PCR

Anhand der in Kapitel IV.2.3 ermittelten Proteinsequenzen wurde ein passendes Primerpaar ausgewählt. Aufgrund der Entartung des genetischen Codes wurden die degenerierten Primer „terminus(s)“ und „peptid2(as)“ verwendet, um jedes mögliche Codon für die entsprechende Aminosäure zu berücksichtigen. Durch Vergleich mit der Humansequenz [Amici et al. 2000] ergab sich, dass mit den eingesetzten Primern ein DNA-Fragment von 480 bp erhalten werden müsste (siehe Abbildung 21). Durch Verwendung verschiedener Primerkonzentrationen (10, 100 und 1000 pmol in 50 µl Ansatz) konnte festgestellt werden, dass nur mit 100 pmol jedes Primers ein Produkt erhalten wurde. Auf dem Bild des Agarosegels ist deutlich die entsprechende Bande zu erkennen:

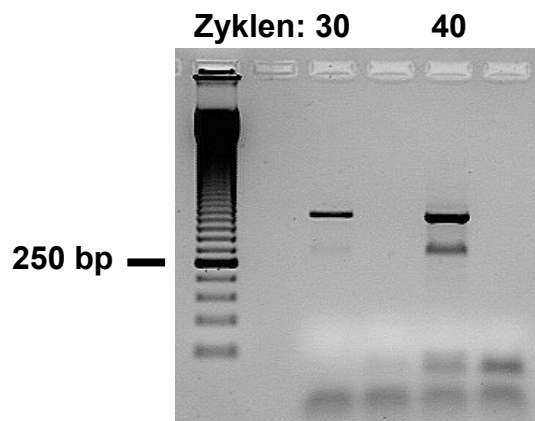


Abbildung 16: Elektrophorese auf 2 % Agarosegel nach PCR mit dem Primerpaar „terminus(s)“ und „peptid2(as)“. Standard 50 bp Leiter.

Auf dem Agarosegel ist neben einer prominenten Bande mit der passenden Größe noch ein kleineres Nebenprodukt zu erkennen. Zur Isolierung der stärkeren Bande wurden 27 µl dieses PCR-Ansatzes mit 3 µl Auftragslösung versetzt und auf drei Spuren eines 2 % TAE-Gels aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel isoliert. Ein Aliquot wurde 1:1000 mit sterilem Millipore-Wasser verdünnt und als template für eine neue PCR eingesetzt. Zwei Ansätze wurden unter den gleichen Bedingungen wie bei der vorhergehenden PCR mit 30 Zyklen amplifiziert. Aus jedem Ansatz wurden 45 µl entnommen und mit 18 µl sterilem H₂O und 12 µl Auftragslösung versetzt. Diese Probe wurde auf 12 Spuren eines 2 % TAE-Gels aufgetragen und nach der Elektrophorese aus dem Gel isoliert. Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein Aliquot auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen. Anhand der Intensität der Bande wurde die DNA-Konzentration auf 15-20 ng/µl geschätzt.

Für die Sequenzierung wurden 7 µl Probe mit 5 µl Primer „terminus(s)“ (Konzentration der Primerlösung 10 pmol/µl) und 3 µl H₂O versetzt.

Es konnte eine Sequenz von ca. 450 bp ermittelt werden. Beim Vergleich mit der Humansequenz [Amici et al. 2000] konnte eine deutliche Übereinstimmung festgestellt werden. Anhand der erhaltenen Basensequenz wurden die Primer „sonde1(s)“ und „sonde1(as)“ innerhalb dieses Fragments ausgewählt, die bei der PCR ein Fragment mit 325 bp liefern sollten. Das Ergebnis der PCR ist in der nächsten Abbildung dargestellt:

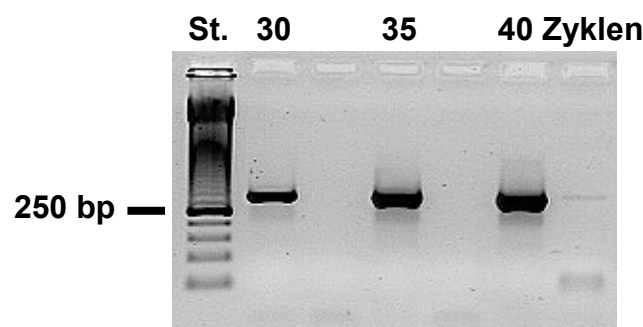


Abbildung 17: PCR mit Primerpaar „sonde1(s)/sonde1(as)“. Standard 50 bp Leiter. Trennung auf 2 % Agarosegel.

Mit dieser PCR konnte ein entsprechendes Produkt amplifiziert werden. Mit den gleichen Reaktionsbedingungen wurde in einer PCR ein DNA-Fragment mit Digoxigenin markiert, um eine spezifische DNA-Sonde für das Screening einer Phagenbank mit cDNA definitiver embryonaler Erythrozyten, die vor der Isolierung ihrer RNA 4 h mit Noradrenalin stimuliert worden waren [Dragon et al. 2002], zu erhalten.

3.2 Herstellung einer Dig-markierten DNA-Sonde

Mit dem Primerpaar „sonde1(s)/sonde1(as)“ wurde in einem 20 µl Ansatz eine PCR mit Digoxigenin-markierten Nukleotiden durchgeführt. Parallel dazu wurde eine Reaktion mit gewöhnlichen Nukleotiden angesetzt. Entsprechende Aliquots der beiden Ansätze wurden auf einem 2 % Agarosegel getrennt:

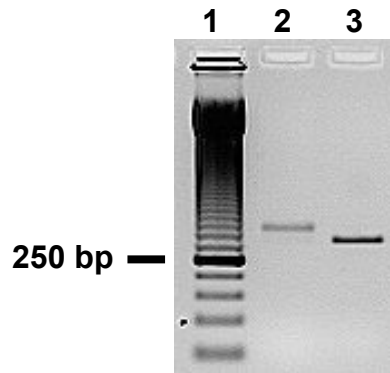


Abbildung 18: Digoxigenin-markierung eines DNA-Fragments. 1: Standard 50 bp Leiter. 2: PCR mit Digoxigenin-markierten Nukleotiden. 3: PCR mit gewöhnlichen Nukleotiden. PCR jeweils 35 Zyklen. 2 % Agarosegel.

Das Molekulargewicht der markierten DNA liegt durch den Einbau von Digoxigenin-11-dUTP, dessen Molekulargewicht größer als das von dTTP ist, etwas oberhalb der nicht markierten DNA. Daher kann von einem erfolgreichen Einbau von Dig-11-dUTP in die DNA ausgegangen werden.

Für die Konzentrationsbestimmung der markierten DNA-Sonde in der Probe wurde ein Aliquot (1 µl) zusammen mit pUC18 Standard auf ein 1,2 % TBE-Gel geladen. Die Konzentration betrug etwa 10 ng/µl.

3.3 Screening der cDNA-Bank

Die cDNA-Bank embryonaler Hühnererythrozyten wurde auf zwei Agarplatten mit jeweils 4500 pfu ausplattiert, die Phagenplaques wurden auf Nylonmembranen übertragen und diese mit der DNA-Sonde hybridisiert. Die Sonde wurde über die Chemilumineszenz des Substrats CDP-Star nachgewiesen. Es konnten mehrere positive Signale erhalten werden.

Die entsprechenden positiven Plaques auf den Platten wurden isoliert und in SM-Puffer/Chloroform aufgenommen. Falls bei zwei nahe beieinanderliegenden Plaques keine von beiden eindeutig zugewiesen werden konnte, wurden beide isoliert.

Die PCR mit den Primern „sonde1(s)/sonde1(as)“ lieferte mit den Eluaten aller isolierten Phagen positive Ergebnisse. In allen Proben konnte das 325 bp DNA-

Fragment nachgewiesen werden. Als Vergleich wurde das entsprechende Fragment aus einer früheren PCR mit auf das Gel aufgetragen:

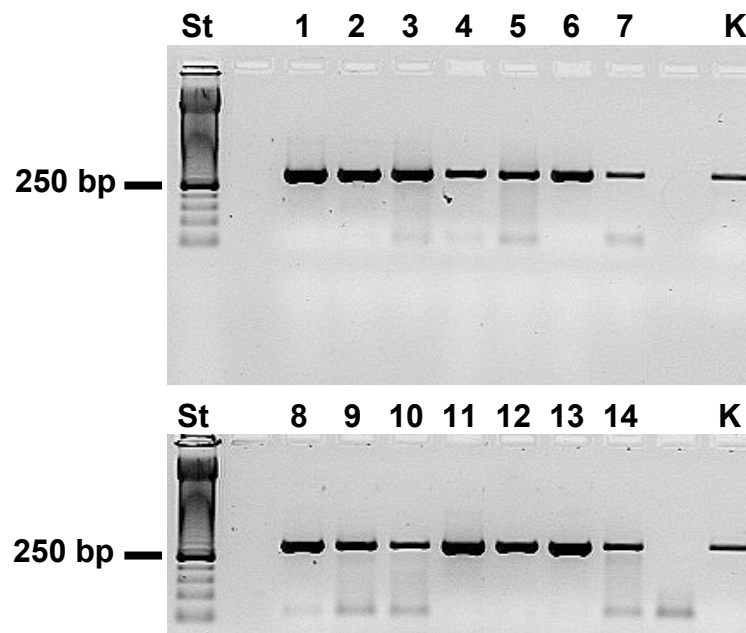


Abbildung 19: PCR (35 Zyklen) mit isolierten Phagen aus 1. Runde des Screening. St: 50 bp Leiter. 1-14: Entsprechende Phagen. K: Kontrolle, 325 bp DNA-Fragment aus Abbildung 17. 2 % Agarosegel.

Da zuvor teilweise zwei Plaques pro Signal isoliert wurden, wurde jeweils nur diejenige Probe aufbewahrt, welche das stärkere Signal in der PCR lieferte (4, 5, 7, 10, 12, 14 verworfen). Die isolierten Phagen wurden erneut ausplattiert. Die Eluate der Phagen 1, 2 und 11 wurden vorher 1:10 mit SM-Puffer verdünnt. Nach 16 h waren 68 (Phage 11) bzw. 10 Plaques (Phagen 1 und 2) entstanden, von denen mehrere isoliert wurden. Die Eluate der restlichen Phagen wurden unverdünnt ausplattiert. Dabei ergaben sich zwischen 150 und 600 pfu pro Platte, von denen jeweils 6 Plaques isoliert wurden. Insgesamt wurden in dieser zweiten Runde 42 Plaques isoliert (Nummer 15-56)

Die Eluate in SM-Puffer aller isolierten Phagen wurden wieder in einer PCR mit dem Primerpaar „sonde1(s)/sonde1(as)“ eingesetzt. Dabei war in der Hälfte der Proben das entsprechende 325 bp Fragment erhalten.

PCR mit Vektorprimern

Alle Phageneluate, die das 325 bp DNA-Fragment enthielten, wurden als template in einer PCR mit den Vektorprimern V1(s) und V1(as) aus der Umgebung der Klonierungsstelle des ZAP Express Vektors eingesetzt.

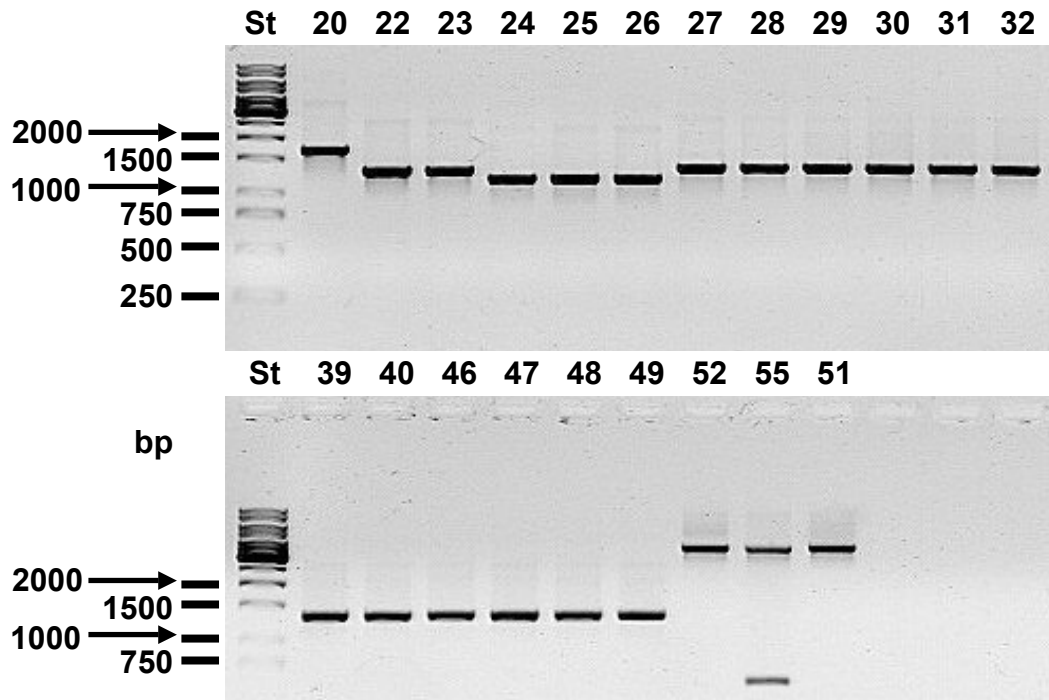


Abbildung 20: PCR (35 Zyklen) der Phageneluat aus dem Screening der cDNA-Bank mit Vektorprimern V1(s) und V1(as). St.: 1 kb Leiter. 0,8 % Agarosegel.

Mit der PCR konnten die in den Vektor klonierten Fragmente amplifiziert werden. Die Größe der meisten Fragmente lag im Bereich von 1000–1700 bp. Nur die Proben 51, 52 und 55 (alle von Phagenplaque 13 der ersten Runde des Screening) lieferten ein deutlich größeres Produkt. Mit den PCR-Produkten der Phagen 20 (11), 29 (3) und 48 (9) (in Klammern die Nummer des Phagenplaques aus dem ersten Screening) wurde eine DNA-Sequenzierung durchgeführt.

3.4 Sequenzierung der cDNA

Von dem PCR-Produkt des Phagenplaques 20 aus dem vorhergehenden Abschnitt wurden 26 µl mit 26 µl Auftragslösung und 208 µl H₂O versetzt und auf 26 Spuren eines 0,8 % Agarosegels aufgetragen. Die entsprechenden Banden (Größe etwa 1700 bp) wurden aus dem Gel isoliert. Mit einem Aliquot der Probe wurde die Konzentration über ein Agarosegel abgeschätzt. Mehrere Proben mit einem DNA-Gehalt von ca. 340 ng wurden mit verschiedenen Primern sequenziert. Dabei wurden anhand von erhaltenen Sequenzen wieder geeignete Primer ausgewählt. Folgende Primer wurden verwendet: seq1(s), V1(s), seq2(as) und seq3(s). Mit dem Vektorprimer V1(s), der sich in 5'-Richtung vor der klonierten cDNA-Sequenz befindet, wurde eine schlechte Sequenz (Länge nur ca. 280 bp, teilweise schlecht aufgelöste Peaks) erhalten. Deswegen wurde mit dem Primer seq2(as) eine Sequenzierung des Gegenstrangs durchgeführt, die bis zum Beginn der Klonierungsstelle erfolgreich war. Die Lage der einzelnen Primer ist in Abbildung 21

gekennzeichnet. Aus den einzelnen sich überlappenden Teilsequenzen konnte die gesamte cDNA-Sequenz zusammengesetzt werden. Es ergab sich eine Sequenz von 1664 bp (539 A, 490 T, 327 G, 308 C) mit einem offenen Leseraster von 855 bp, die für ein Protein mit 285 AS codiert. Die Sequenzen von cDNA bzw. mRNA und Protein sind auf der folgenden Seite gegenübergestellt.

Zur Kontrolle wurden die PCR-Produkte der Phagenplaques 29 und 48 ebenfalls vollständig sequenziert. Dazu wurden die Primer seq2(as), sonde1(s) und seq1(s) verwendet. Es ergaben sich insgesamt Sequenzen von 996 bzw. 1247 bp. Die Basensequenz für das offene Leseraster war in allen drei Sequenzen identisch.

1	ctctcaagcaggaggaatcttcttcttctgagctgctcctgcaaaaccctcggcct	
61	gtatgcaagccctgctgctctgactctgcttgccacctatgcagttgcagtaggacaaa	
121	atcaaggacagaagaatcaggagtgccctaagctcaacgcacaggacggggatttcaca	
181	cctgctgaactcaatattgttcattcgtcaagatgccagaatttcagaagaagactgtc	
	M P E F Q K K T V	9
241	cacattaaggacccagggagagtagaagagattatttggcctcatcaaaggaggagct	
	H I K D P G R V E E I I C G L I K G G A	29
301	gctaaacttcagattattacagattttgatatgacattaagtagattttcctacaatgga	
	A K L Q I I T D F D M T L S R F S Y N G	49
361	aaaagatgtccaacttgccataaacatcattgataactctaagctcatcacagaggaatgc	
	K R C P T C H N I I D N S K L I T E E C	69
421	cgaaaaaagttgttgagctgaaagaaacatattatgctattgaaattgaccagccctc	
	R K K L L Q L K E T Y Y A I E I D P A L	89
481	actattgaagaaaaatatccatatatggtagaatggtacaataaatctcatgcactactc	
	T I E E K Y P Y M V E W Y N K S H A L L	109
541	attgaacaaggcttacaaaaggataagcttgacagaagttgtgagagaatctgatgttatg	
	I E Q G L Q K D K L A E V V R E S D V M	129
601	ctgaaggaaggatacgagaacttctttgataagctcagtgacataatattcctgtgttc	
	L K E G Y E N F F D K L S E H N I P V F	149
661	atattttctgctgggattggagacattcttgagggaagttatccaccaggctggagtctac	
	I F S A G I G D I L E E V I H Q A G V Y	169
721	cattctaattgtcaaagttgtttccaatttcattggttttgatgaaaatggaatattaaaa	
	H S N V K V V S N F M D F D E N G I L K	189
781	gggttttaaggagaaattgattcatgtttacaacaacatgatggtgccttgaagaataca	
	G F K G E L I H V Y N K H D G A L K N T	209
841	gagtatttttaacaactgaaagacaacagtaatatcatactgctgggtgattcccaagga	
	E Y F K Q L K D N S N I I L L G D S Q G	229
901	gacttgagtatggcagatggagtagcaaatgttgagcacatccttaagattggttatctc	
	D L S M A D G V A N V E H I L K I G Y L	249
961	aatgataaagtagatgaacttctggaaaaatacatggactcttacgatattgtcttggtg	
	N D K V D E L L E K Y M D S Y D I V L V	269
1021	aaagatgaatccctggaagttgccaactccatcctacagaaaattctgtaacttgcagtc	
	K D E S L E V A N S I L Q K I L *	285
1081	tcaagtcactgcttcccttccagaaggcaactgaatagaagagcacacgcgtgcaatctt	
1141	aagtgtatctgttactcattgacagaactgtttaatttaaaacttttatcctcattttgt	
1201	tattttggagtatatatggtacccattgtcaactagaagctccttttactgctgttaggc	
1261	tgttcttttattgtctcacactcctattaaaaactagatttaaatggatttacagatgtga	
1321	ttaactgcttctgatgggttactgtggtttgctgacttttaatacaggcggttttaagaac	
1381	attttactaaatgtggctattgtgtaaaactgaagatgcaaacatgctctgaataagccg	
1441	cgtgcatgggtttgttttgcttttgccttttcaaagtgtcatccaaaatccaggaagaa	
1501	aactctctgattccactgcagcggttagaaaaagaaaagatttcagtcccagctgtacttt	
1561	gaaagatactacttatatgctacagactgtcacagaagtttttcatacatatttttcttc	
1621	agtaaaaaatactgcacccaccccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	

Abbildung 21: cDNA-Sequenz und Proteinsequenz der Pyrimidin 5'-Nukleotidase. Die bei der Proteinsequenzierung erhaltenen Peptidsequenzen sowie die Lage der einzelnen verwendeten Primer sind durch einen Rahmen markiert. Zur Bezeichnung der Primer siehe Kapitel 1.5 in Material und Methoden.

4 Analyse der Expression der Pyrimidin 5'-Nukleotidase

4.1 Nachweis der Pyrimidin 5'-Nukleotidase mRNA mittels Northern Blot

Erythrozyten des elften Bebrütungstages wurden *in vitro* für 4 h bzw. 12 h mit 10 μ M Noradrenalin stimuliert und anschließend ihre RNA isoliert. Die RNA wurde auf einem Formaldehydgel aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. Die Membran wurde mit einer für die Pyrimidin 5'-Nukleotidase spezifischen Digoxigenin-markierten cDNA-Sonde hybridisiert:

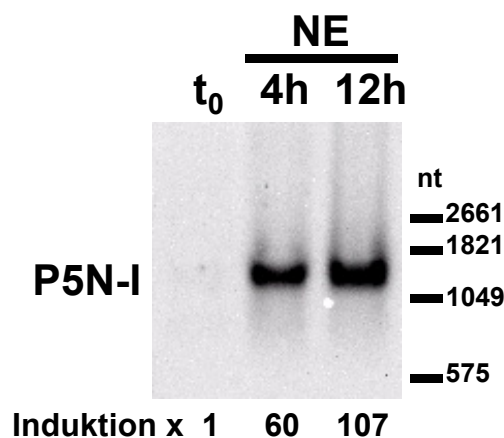


Abbildung 22: Northern-Blot mit RNA aus Erythrozyten von Tag 11 nach Stimulierung mit 10 μ M Noradrenalin. Inkubation in F-10 Medium mit 10 % FCS (pH 7,4) bei 37 °C. Die RNA wurde mit einer Digoxigenin-markierten cDNA-Sonde nachgewiesen.

Bei der Kontrolle vor der Inkubation (t_0) ist keine RNA-Bande auf dem Blot sichtbar, während nach Stimulierung mit Noradrenalin eine deutliche Bande mit einer Größe von ca. 1500 nt zu erkennen ist. Die Auswertung der Signalintensitäten ergab eine Induktion um den Faktor 60 nach 4 h, bzw. 107 nach 12 h mit Noradrenalin.

4.2 Untersuchung der P5N-I Expression mittels RT-PCR

Der Gehalt der für die Pyrimidin 5'-Nukleotidase codierenden mRNA wurde an den verschiedenen Entwicklungstagen, sowie nach Stimulierung der Genexpression *in vitro* durch Noradrenalin und CPCA und *in vivo* durch hypoxische Bebrütung untersucht. Dazu wurden nach Isolierung der gesamten RNA jeweils gleiche Aliquots für die reverse Transkription eingesetzt. Die erhaltenen Proben mit cDNA wurden als template in einer PCR mit dem für die Pyrimidin 5'-Nukleotidase spezifischen Primerpaar „sonde1(s)“ und „sonde1(as)“ eingesetzt. Die Fluoreszenzintensität der Banden wurde quantitativ erfasst und gegenübergestellt.

4.2.1 Expression der P5N-I in definitiven Erythrozyten nach Inkubation mit CPCA

Eine Präparation von Erythrozyten des elften Entwicklungstages wurde 4 h mit 10 μ M CPCA stimuliert. Das Ergebnis einer PCR ist in folgender Abbildung dargestellt:

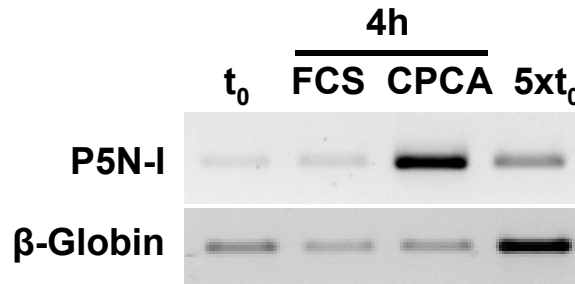


Abbildung 23: Expression der Pyrimidin 5'-Nukleotidase bzw. β -Globin mRNA nach 4 h Stimulierung der Erythrozyten (Tag 11) mit 10 μ M CPCA in F-10 Medium mit 10 % FCS (pH 7,4) bei 37 °C.

Als Vergleich wurde die Expression von β -Globin mit dargestellt, die relativ unverändert bleibt. Insgesamt wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die quantitative Auswertung lieferte folgendes Ergebnis:

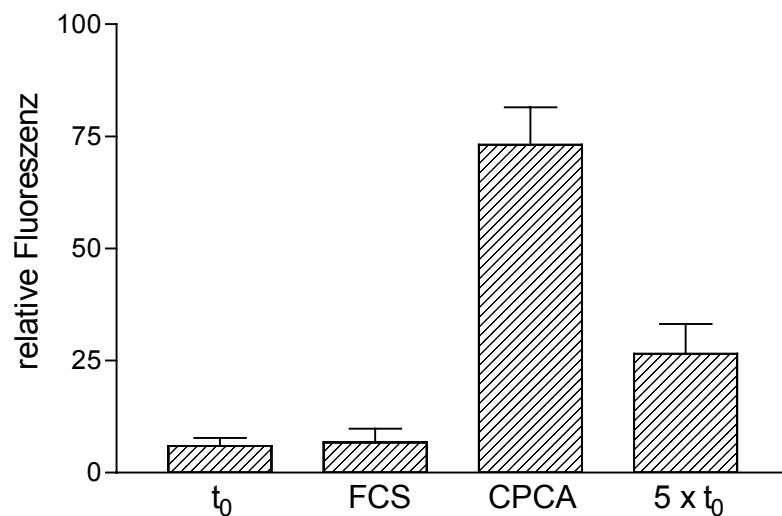


Abbildung 24: Expression der P5N-I in definitiven Erythrozyten von elf Tage alten Hühnerembryonen nach 4 h mit 10 μ M CPCA. Mittelwert der Fluoreszenzintensität aus drei unabhängigen Experimenten.

Nach der Stimulierung mit CPCA ist eine signifikante Zunahme ($P < 0,01$) der mRNA im Vergleich zur Kontrolle (FCS) zu beobachten.

4.2.2 Expression der P5N-I in definitiven Erythrozyten nach Stimulierung mit Noradrenalin

Kinetik während 4 h mit Noradrenalin

In einer Stimulierung von Erythrozyten des elften Entwicklungstages mit $1\ \mu\text{M}$ Noradrenalin wurden über einen Zeitraum von 4 h mehrere Proben entnommen. Für die PCR ergab sich folgendes Ergebnis:

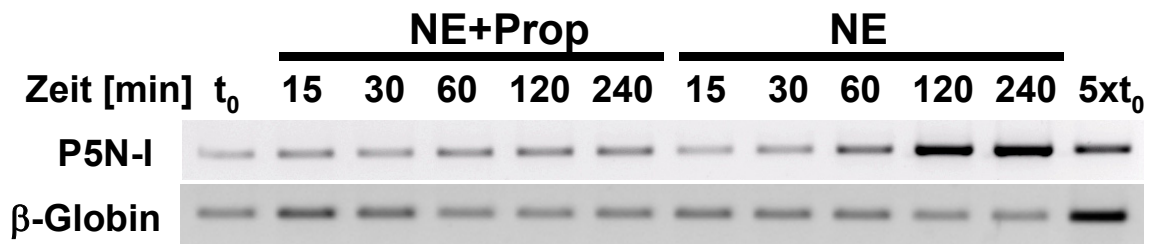


Abbildung 25: Ergebnisse der PCR nach 4 h Stimulierung von RBZ von Tag 11 mit $1\ \mu\text{M}$ Noradrenalin (NE) und $10\ \mu\text{M}$ Propranolol (Prop) in F-10 Medium mit 10 % FCS (pH 7,4) bei $37\ ^\circ\text{C}$.

Die quantitative Auswertung der einzelnen Banden für die P5N-I ergab folgendes Bild:

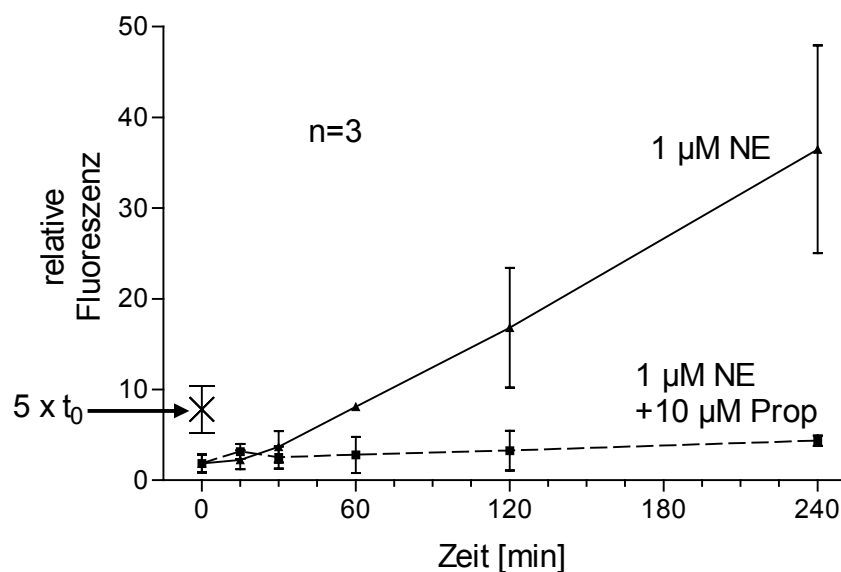


Abbildung 26: Zunahme der P5N-I mRNA während der Stimulierung von definitiven Erythrozyten von Tag 11 mit Noradrenalin. Mittelwert aus drei Experimenten.

Bereits nach 60 Minuten konnte eine signifikante Steigerung ($P < 0,01$) der mRNA-Expression festgestellt werden, die bis vier Stunden linear zunahm. In Gegenwart von Propranolol blieb die mRNA in diesem Zeitraum unverändert.

Verlauf der Aktivität und Expression während einer Langzeitinkubation mit Noradrenalin

Eine Präparation von Erythrozyten des 11. Bebrütungstages wurde 24 h mit NE inkubiert. Es wurden mehrere Proben zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen. Als Kontrolle wurden Zellen in Inkubationsmedium ohne Noradrenalin angesetzt. Zum Vergleich wurde die Expression von β -Globin untersucht.

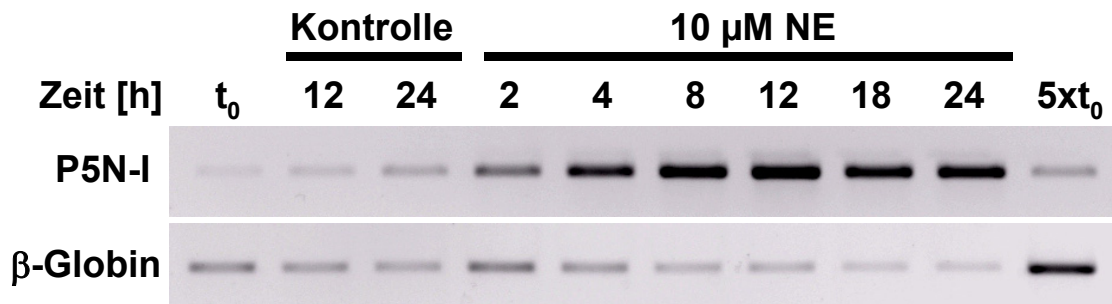


Abbildung 27: Ergebnis der RT-PCR nach einer Inkubation von Erythrozyten des elften Entwicklungstages mit 10 μ M Noradrenalin (NE) in Medium F-10 mit 10 % FCS (pH 7,4) bei 37 °C.

Während die Intensität der Banden der Kontrollgruppe nach 12 bzw. 24 h kaum zunahm, konnte bei den stimulierten Zellen eine deutlich gesteigerte Expression festgestellt werden. Die Mittelwerte aus drei Experimenten sind zusammen mit der Enzymaktivität aus Abbildung 6 im nächsten Bild gegenübergestellt:

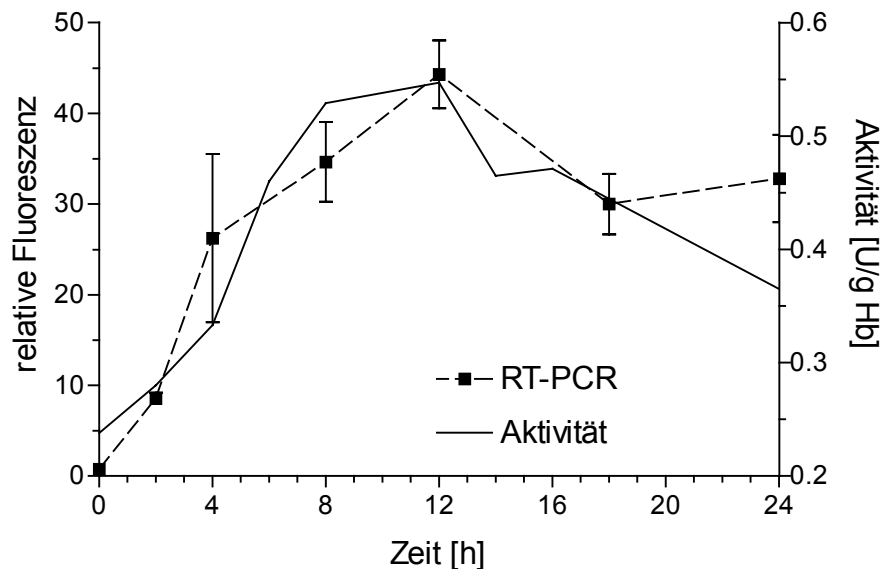


Abbildung 28: Verlauf von Enzymaktivität und mRNA-Gehalt ($n=3$) für die P5N-I während einer 24 h Inkubation mit 10 μ M Noradrenalin. Statistische Analyse der mRNA-Daten (t -test für abhängige Stichproben): $P < 0,01$ (4 h Wert $P < 0,05$).

Es ergibt sich eine deutliche Korrelation zwischen der Aktivität und der Expression der zugehörigen mRNA. Das Maximum wird jeweils nach 12 h erreicht, und es folgt

ein langsamer Abfall, dabei liegen die Werte auch nach 24 h noch deutlich über dem Ausgangswert.

4.2.3 Verlauf von Expression und Aktivität des Enzyms während der Embryogenese

Die Expression der P5N-I wurde an den einzelnen Entwicklungstagen untersucht und mit dem Verlauf der Enzymaktivität verglichen. Zur Ergänzung der bekannten Daten für die Enzymaktivität an den einzelnen Entwicklungstagen [Dragon et al. 1998] wurde die Aktivität in Erythrozyten nach dreieinhalb (84 h) bzw. fünf Tagen Bebrütung ermittelt: Die Aktivität wurde in 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5) mit 10 mM MgCl_2 und 5 mM DTT bei 37 °C mit 1 mM UMP als Substrat gemessen. Dabei ergaben sich folgende Werte:

	Tag 3,5	Tag 5
Mittelwert der Aktivität [U/g Hb]	0,737	0,279
Standardabweichung	0,101	0,062
Anzahl der Messungen	4	3

Das Ergebnis der RT-PCR für die Expression der P5N-I an den einzelnen Tagen ist im folgenden Bild dargestellt. Als Vergleich wurde die Expression des ribosomalen Proteins S17 mit in die Abbildung aufgenommen, die während der ersten zwei Wochen konstant bleibt:

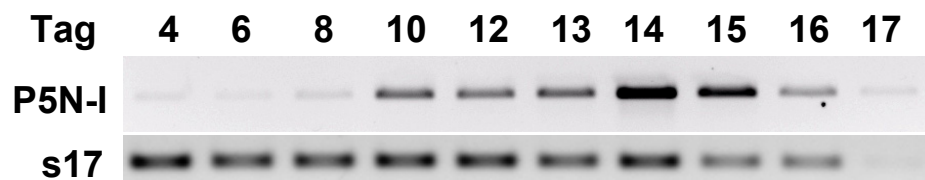


Abbildung 29: Expression von Pyrimidin 5'-Nukleotidase und S17 an den verschiedenen Bebrütungstagen.

Der Verlauf der Mittelwerte aus zwei bis vier Einzelwerten (es wurde jeweils die RNA einzelner Eier für die Versuche isoliert), ist zusammen mit der Aktivität an den entsprechenden Tagen im folgenden Bild zusammengefasst:

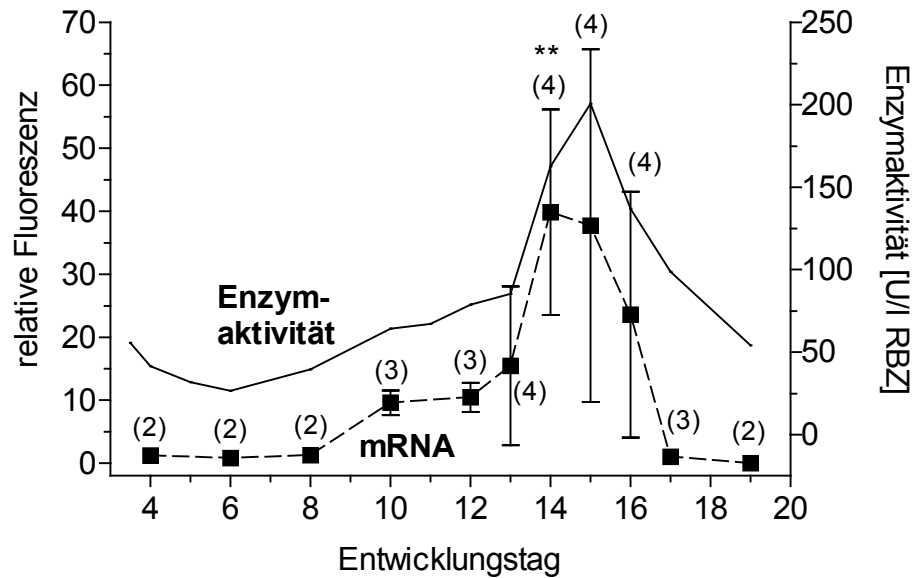


Abbildung 30: Aktivität und mRNA-Expression der Pyrimidin 5'-Nukleotidase an verschiedenen Entwicklungstagen. Die Zahlen in Klammern bezeichnen die Anzahl der einzelnen Messwerte für die mRNA Expression. Die Werte für die Aktivität wurden aus Dragon et al. [1998] entnommen und mit den Werten für den MCHC an den einzelnen Tagen [Romanoff 1967] auf U/l RBZ umgerechnet. ** $P < 0,01$ ($n=3$) für die Differenz der mRNA-Daten zwischen Tag 14 und Tag 12.

Der Verlauf der Enzymaktivität und der mRNA-Expression zeigt über den gesamten untersuchten Zeitraum eine gute Korrelation. An den Tagen 13 bis 16 zeigen die Ergebnisse für die mRNA eine hohe Standardabweichung, da für die Experimente an den Tagen 8-17 die RNA einzelner Eier verwendet wurde. Aufgrund unterschiedlicher Gasleitfähigkeiten einzelner Eier eines Bebrütungstages setzt der hypoxische Reiz in individuellen Embryonen nicht exakt zum gleichen Zeitpunkt und mit gleicher Stärke ein [Koller et al. 1994]. In jedem Fall ist ein Anstieg der mRNA im entsprechenden Zeitraum (ab Tag 13) zu beobachten, der allerdings unterschiedlich stark ausgeprägt ist.

4.2.4 Expression der Pyrimidin 5'-Nukleotidase nach Kurzzeithypoxie

Hypoxie führt *in vivo* zu einer deutlichen Änderung des Nukleotidmusters in definitiven Erythrozyten [Baumann et al. 2003], die unter anderem auf eine Zunahme der Pyrimidin 5'-Nukleotidaseaktivität zurückzuführen ist [Oetli 1997]. Um zu testen, ob die Expression der P5N-I durch Hypoxie beeinflusst wird, wurde eine Gruppe Eier nach vorhergehender normaler Bebrütung an Tag 11 kurzzeitig (30-75 Minuten) mit 13 % O_2 bebrütet, während die Kontrollgruppe weiter mit normalem Sauerstoffgehalt bebrütet wurde. Die RNA einzelner Eier wurde isoliert und für die RT-PCR eingesetzt.

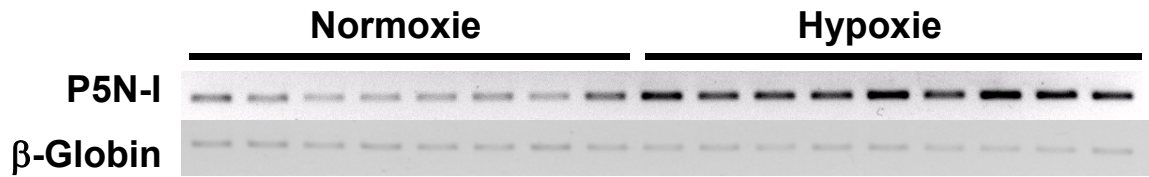


Abbildung 31: Ergebnisse der RT-PCR für die Expression von P5N-I nach normoxischer ($n=8$) und hypoxischer ($n=9$, 13 % O_2) Bebrütung. Jede Bande entspricht der RNA aus einem einzelnen Ei.

Auf dem Gel ist bereits ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Gruppen zu erkennen. Die quantitative Auswertung ergab folgendes Ergebnis:

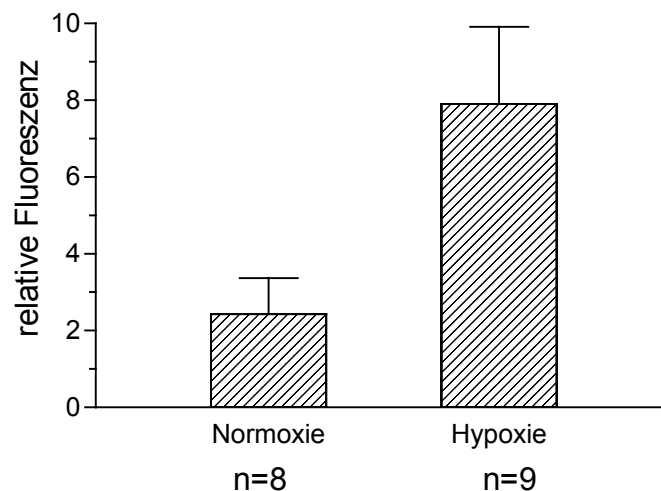


Abbildung 32: Vergleich des mRNA-Gehalts für die P5N-I nach normoxischer bzw. hypoxischer Bebrütung (13 % O_2 für 30-75 min). $P < 0,001$.

Es ergibt sich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Die akute Hypoxie führt zur raschen Induktion der P5N-I mRNA.

4.2.5 Einfluss von Noradrenalin auf die Expression der P5N-I in primitiven Erythrozyten

Es sollte getestet werden, ob primitive Erythrozyten, die erste erythroide Population, *in vitro* in gleicher Weise auf hormonelle Effektoren reagieren wie die von uns untersuchten definitiven Erythrozyten von Tag 11. Dazu wurden Erythrozyten des fünften Entwicklungstages für vier Stunden mit 1 μ M Noradrenalin in FCS und F-10 Medium stimuliert. Es wurden drei Inkubationen durchgeführt, für jede wurden die Erythrozyten aus 30 Eiern (ca. 160 μ l) gesammelt.

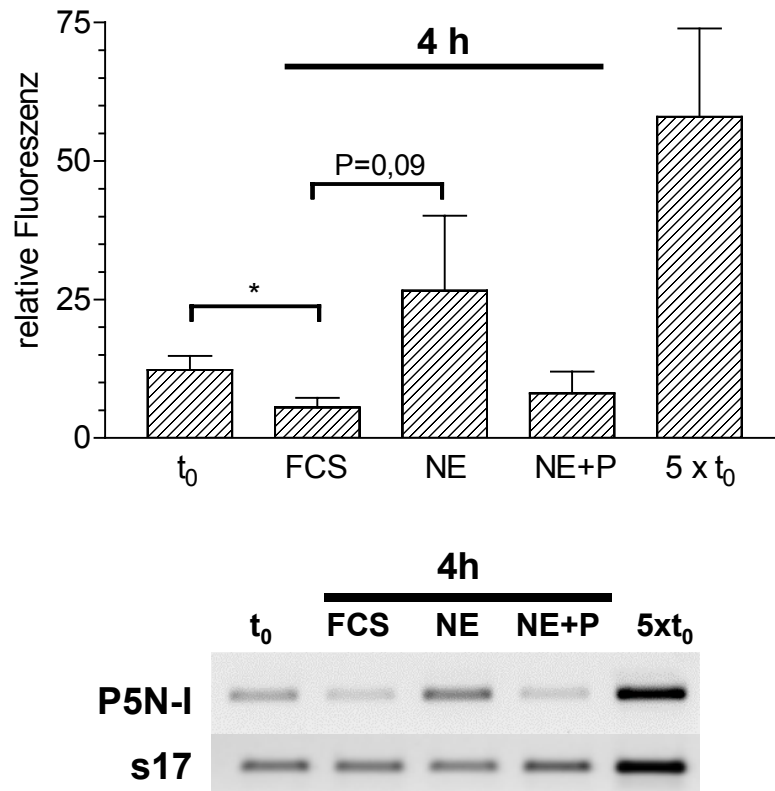


Abbildung 33: Ergebnis der RT-PCR für die Expression der P5N-I in Erythrozyten des fünften Bebrütungstages nach Stimulierung mit 1 μ M Noradrenalin (NE) bzw. 1 μ M Noradrenalin und 10 μ M Propranolol (P) in F-10 Medium mit 10 % FCS (pH 7,4) bei 37 °C. Obere Grafik: Mittelwert und SD aus drei Ansätzen. Die untere Abbildung zeigt das Ergebnis der RT-PCR eines Ansatzes.

Nach vier Stunden Inkubation in Medium ohne Noradrenalin (FCS) wurde ein signifikanter Abfall des mRNA-Gehalts ($P < 0,05$) im Vergleich zum Ausgangswert (t_0) vor der Inkubation festgestellt. Dagegen ergab sich nach vier Stunden Inkubation mit Noradrenalin in jedem der drei Experimente ein höherer Wert für die mRNA im Vergleich mit den Proben, die in FCS inkubiert wurden. Allerdings war dieser Anstieg statistisch nicht signifikant. In primitiven Erythrozyten ist die Induktion der Pyrimidin 5'-Nukleotidase nur gering im Vergleich mit den Ergebnissen für definitive Erythrozyten. Der Wert für NE blieb auch deutlich unter dem $5 \times t_0$ -Wert.

V Diskussion

Wenngleich schon lange bekannt ist, dass der RNA-Abbau terminal differenzierender Erythrozyten bei mangelnder Aktivität der Pyrimidin 5'-Nukleotidase gestört ist [Valentine et al. 1974], lagen bisher keine Untersuchungen über die Steuerung der Expression des Enzyms während der erythroiden Differenzierung vor. Am System des Vogelembryos konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals die Regulation auf Ebene der Genexpression in differenzierenden embryonalen Erythrozyten aufgeklärt werden. Dabei wurden drei Hauptziele verfolgt: Als erstes wurde die Pyrimidin 5'-Nukleotidase aus definitiven embryonalen Erythrozyten isoliert, ihre Proteinsequenz analysiert und nach Identifizierung des entsprechenden Klons aus einer cDNA-Bank embryonaler Erythrozyten die Basensequenz der für das Enzym codierenden mRNA bestimmt. Anschließend wurde die Expression des Enzyms in den Erythrozyten während der Embryogenese untersucht und mit der Enzymaktivität an den einzelnen Tagen verglichen. Außerdem wurden Untersuchungen zur hormonellen Induktion der Expression der Pyrimidin 5'-Nukleotidase in den Zellen durchgeführt. Im folgenden soll auf die einzelnen Ergebnisse detaillierter eingegangen werden:

Sequenz und funktionelle Eigenschaften der Pyrimidin 5'-Nukleotidase

Ein Vergleich der von mir ermittelten Proteinsequenz mit der bekannten Sequenz für das Enzym aus Humanerythrozyten [Amici et al. 2000, EMBL #AF312735] ergibt eine Übereinstimmung der einzelnen Aminosäurereste von 87 % (Abbildung 34). Bei den Abweichungen handelt es sich überwiegend um konservative Substitutionen, nur bei weniger als 4 % der Reste liegt ein nicht-konservativer Austausch vor. Eine ähnliche Homologie (86 %) ergibt sich auch mit einem Proteinprodukt aus Embryonen der Maus [EMBL #AK011894]. Die Sequenzen von Mensch und Maus stimmen zu über 92 % überein. Die Aminosäuresequenz des Enzyms zeigt also eine hohe Konservierung. Die häufigsten Unterschiede zwischen den drei Proteinen finden sich im Bereich von Position 103-125 der Hühnersequenz.

Die Humansequenz enthält fünf Cysteinreste, die sich alle innerhalb der ersten 70 Aminosäuren vom N-terminalen Ende befinden. Vier dieser Cysteine finden sich auch an identischen Positionen im Hühnerenzym, nur an Position 62 ist Cystein durch Serin ersetzt. Somit ist denkbar, dass die beiden Enzyme eine ähnliche Anordnung von Disulfidbrücken bilden. Die Cysteinreste sind vermutlich auch verantwortlich für die Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber einer Inaktivierung durch Blei [Paglia et al. 1999].

1	MPEFQKKTVHIKDPGRVEEIIICGLIKGGAAKLQIITDFDMTLSRFSYNGK	50
	:: : : :	
2	MPEFQKSSVRIKNPTRVEEIIICGLIKGGAAKLQIITDFDMTLSRFSYK GK	51
51	RCPTCHNIIDNSKLITEECRKKLLQLKETYYAIEIDPALTIEEKYPYMVE	100
	: : : : : : : : : :	
52	RCPTCHNIIDNCKLVTDECRKKLLQLKEKYAIEVDPVLTVEEKYPYMVE	101
101	WYNKSHALLIEQGLQKDKLAEVVRESDVMLKEGYENFFDKLSEHNIPVFI	150
	: : : : : : : : : : : :	
102	WYTKSHGLLVQQALPKAKLKEIVAESDVMLKEGYENFFDKLQQHSIPVFI	151
151	FSAGIGDILEEVIHQAGVYHSNVKVVS NFMDFDENGILKGFKGELIHVYN	200
	: : : : : : : : : : :	
152	FSAGIGDVLEEVIRQAGVYHPNVKVVS NFMDFDETGVLKGFKGELIHVFN	201
201	KHDGALKNTEYFKQLKDNSNIILLGDSQGDLSMADGVANVEHILKIGYLN	250
	: : : : : : : : : :	
202	KHDGALRNTEYFNQLKDNSNIILLGDSQGD LRMADGVANVEHILKIGYLN	251
251	DKVDELLEKYMDSYDIVLVKDESLEVANSILQKIL	285
	: : : : : :	
252	DRVDELLEKYMDSYDIVLVQDESLEVANSILQKIL	286

Abbildung 34: Vergleich der Aminosäuresequenz der Pyrimidin 5'-Nukleotidase aus Erythrozyten des Huhns (obere Reihe) und aus Humanerythrozyten (untere Reihe). Identische Aminosäuren sind mit einem Strich gekennzeichnet, konservative Substitutionen mit einem Doppelpunkt.

Eigenschaften des Enzyms

Die getesteten katalytischen Eigenschaften des Enzyms entsprechen weitgehend denen des Enzyms aus Humanerythrozyten. Das Enzym setzt hauptsächlich UMP, CMP und dCMP um, während mit Purinnukleotiden keine Aktivität festgestellt werden konnte. Das pH-Maximum liegt bei 7,5 (UMP) bzw. 8,0 (CMP), im stärker alkalischen Bereich nimmt die Aktivität rasch ab. Für die Pyrimidin 5'-Nukleotidase aus Humanerythrozyten wurde ein vergleichbares Profil für die pH-Abhängigkeit der Aktivität angegeben [Paglia und Valentine 1975, Torrance et al. 1977].

Das besondere Merkmal der P5N-I aus Erythrozyten ist die Affinität gegenüber den drei vorhin genannten Pyrimidinnukleotiden, während andere Nukleotide nur schlechte Substrate mit höheren K_M -Werten sind. Dieses Verhalten ergab sich auch für die P5N-I aus Humanerythrozyten [Paglia et al. 1987, Amici et al. 1991] bzw. für die P5N-I aus den Erythrozyten von Ratten [Hokari et al. 1998] und adulten Hühnern [Hokari et al. 2001a]. In diesen Spezies wurde auch eine dem Isoenzym P5N-II entsprechende Aktivität in den Erythrozyten nachgewiesen. Meine Ergebnisse für den Abbau verschiedener Pyrimidinnukleotide bei pH 7,5 zeigen, dass im Häm-

lysat definitiver embryonaler Erythrozyten des 15. Entwicklungstages hauptsächlich P5N-I Aktivität vorhanden ist, da Desoxynukleotide kaum umgesetzt wurden.

Die Existenz einer für Pyrimidinnukleotide spezifischen Nukleotidase, die keine Purinnukleotide umsetzt, erscheint bei roten Blutzellen im Hinblick auf die Erhaltung ihres Adeninnukleotidpools sinnvoll. Kernlose Erythrozyten können energiereiche Phosphatverbindungen wie ATP nur durch anaerobe Glykolyse produzieren, eine *de novo* Synthese von Adenin in den Zellen ist nicht möglich. Würde AMP durch eine vorhandene Nukleotidase abgebaut, so könnte das resultierende Adenosin entweder direkt die Zelle verlassen oder durch die Adenosin-Desaminase zu Inosin abgebaut werden. Somit würde eine irreversible Verringerung des Vorrats an Adeninnukleotiden resultieren [Paglia und Valentine 1975]. Gleichzeitig müssen während der erythroiden Entwicklung, die mit einem Abbau der zellulären RNA verknüpft ist, die anfallenden Pyrimidinnukleotide aus der Zelle entfernt werden. Dieser Abbauweg für Pyrimidine kann in Erythrozyten durch die P5N-I unabhängig reguliert werden. Eine ähnliche Funktion könnte auch die P5N-II beim Abbau der zellulären DNA erfüllen [Paglia et al. 1984].

Mit verschiedenen Metallionen wurde eine deutliche Hemmung der Enzymaktivität festgestellt, die Ergebnisse entsprachen weitgehend den Ergebnissen für das Humanenzym [Paglia und Valentine 1975]. Die Hemmung durch Schwermetalle kann auf deren Affinität zu Cysteinresten in der Sequenz zurückgeführt werden. Über das Humanenzym wurde berichtet, dass es ein zinkhaltiges Metalloenzym ist [Markin et al. 1983], jedoch wurde dieser Befund in anderen Arbeiten nicht bestätigt. Paglia und Valentine [1975] stellten ab einer Konzentration von 0,1 mM Zn^{2+} eine Hemmung des Enzyms fest. In der vorliegenden Arbeit bewirkte die Anwesenheit von 1 mM Zn^{2+} eine Reduktion der Aktivität des Hühnerenzyms auf 6 % des Kontrollwerts.

Unterschiedliches Verhalten von P5N-I aus Hühner- und Humanerythrozyten bei der Chromatographie

Trotz der hohen Sequenzhomologie zwischen der Pyrimidin 5'-Nukleotidase I aus den Erythrozyten des Huhns bzw. des Menschen zeigte das Enzym bei einigen chromatographischen Verfahren, die in Anlehnung an bekannte Reinigungsschemata [Markin et al. 1983, Amici et al. 1994] für das Humanenzym durchgeführt wurden, ein deutlich abweichendes Verhalten.

Mit allen Materialien, die als spezifische Matrix für eine Affinitätschromatographie getestet wurden, zeigte das Hühnerenzym keine oder nur geringe Wechselwirkung, so dass es bereits mit niedriger Salzkonzentration von der Säule abgelöst wurde. Im Gegensatz zum Humanenzym [Markin et al. 1983] bindet das Enzym nicht an UDP-

agarose. Durch Chromatographie an Hydroxyapatit [Amici et al. 1994] konnten die beiden Isoenzyme aus Humanerythrozyten in zwei scharfen Peaks voneinander getrennt werden. In der vorliegenden Arbeit konnten mit Hydroxyapatit keine positiven Resultate erzielt werden.

Bei der hydrophoben Chromatographie des Humanenzyms an Phenyl-Sepharose [Amici et al. 1994], konnte das Enzym mit einer Salzkonzentration von 1 M NaCl in 50 mM Imidazol bei einem pH-Wert von 6,5 von der Säule eluiert werden. Hier zeigt sich ein deutlicher Unterschied zu meinen Ergebnissen. Mit wässrigen Puffern allein konnte das Enzym nicht mehr von der Säule eluiert werden, es mussten Tenside wie CHAPS oder Triton X-100 zusammen mit Ethylenglykol verwendet werden. Das Hühnerenzym muss also Bereiche enthalten, die weitaus stärkere hydrophobe Wechselwirkungen zur Matrix ausbilden.

Die Pyrimidin 5'-Nukleotidase aus Humanerythrozyten besitzt einen isoelektrischen Punkt von 5,1 [Amici et al. 1997]. Derselbe Wert wurde auch für die Pyrimidin 5'-Nukleotidase aus den Erythrozyten adulter Hühner bestimmt [Hokari et al. 2001a]. Obwohl beide Proteine einen identischen isoelektrischen Punkt aufweisen, scheinen in der Struktur der Proteine doch lokale Unterschiede in der Ladungsverteilung bzw. in der Ausbildung von hydrophoben Domänen zu bestehen, die zu einer deutlich veränderten Wechselwirkung zwischen den Proteinen und der Matrix führen.

Hormonelle Steuerung der Expression von P5N-I in embryonalen Erythrozyten

Durch verschiedene Versuche konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass die Expression der P5N-I in definitiven embryonalen Erythrozyten durch Noradrenalin bzw. den Adenosinrezeptoragonisten CPCA induziert wird. Bei Stimulierung mit Noradrenalin wurde mittels Northern-Blot nach vier Stunden eine Zunahme der entsprechenden mRNA um den Faktor 60 festgestellt, mit RT-PCR konnte bereits nach einer Stunde ein signifikanter Anstieg der mRNA nachgewiesen werden. Auch durch CPCA wird nach vier Stunden Inkubation von Erythrozyten des elften Entwicklungstages ein deutlicher Anstieg der mRNA verursacht. In Langzeitinkubationen mit Noradrenalin wurden über einen Zeitraum von 24 h die Expression der P5N-I in den Zellen untersucht und mit den Ergebnissen der Enzymaktivitätsmessungen verglichen. Dabei zeigte sich eine enge Korrelation zwischen der P5N-I Aktivität und dem Gehalt an P5N-I mRNA. Daraus folgt, dass die Zunahme der Enzymaktivität nach hormoneller Stimulierung durch gesteigerte Expression der codierenden mRNA verursacht wird.

Verglichen mit den Ergebnissen in definitiven Erythrozyten zeigt die Expression der Pyrimidin 5'-Nukleotidase in primitiven Erythrozyten nur eine schwache Induktion nach *in vitro* Stimulierung mit Noradrenalin.

Frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe [Dragon et al. 1996] zeigten, dass durch Katecholamine die Synthese einer Vielzahl von Proteinen in definitiven Erythrozyten induziert wird. Mittlerweile konnte eine Reihe von Genen in embryonalen Hühnererythrozyten identifiziert werden, deren Expression über den cAMP-Signaltransduktionsweg kontrolliert wird: Dazu zählt das Enzym Carboanhydrase II, dessen Funktion für den CO₂-Transport in Erythrozyten bedeutend ist, sowie das auch in anderen Zelltypen verbreitete Hitzeschockprotein Hsp70, das als Chaperon für die korrekte Faltung von neu synthetisierten Proteinen während der Zelldifferenzierung eine wichtige Rolle spielt [Dragon und Baumann 2001]. Außerdem gehören dazu die regulatorischen Faktoren Fos, Ifr1 und Tob [Dragon et al. 2002], deren spezielle Funktion bei der erythroiden Entwicklung noch weitgehend unbekannt ist. In anderen Zellsystemen sind diese Faktoren über verschiedene Signalwege mit der Proliferation und Differenzierung der Zellen verknüpft:

Der Transkriptionsfaktor Fos bindet zusammen mit anderen Faktoren wie Jun oder Maf als Heterodimer an AP-1 Zielsequenzen in Promotoren oder Enhancern [Angel und Karin 1991]. Tob gehört zur Familie der APRO (anti-proliferativen) Proteine [Matsuda et al. 2001], die mit verschiedenen Signalketten (Rezeptortyrosinkinasen, Serin/Threoninkinaserezeptoren und Cyclin-abhängige Kinasen) verknüpft sind. Tob unterdrückt ein mitogenes Signal, indem es an Komponenten dieser Signaltransduktionswege bindet. Ifr1 ist vor allem in der Myoblasten Zelllinie C2C12 der Maus untersucht worden [Guardavaccaro et al. 1995]. Bei Blockierung der Expression von Ifr1 in den Zellen erfolgte eine verzögerte Differenzierung der Zellen und eine verringerte Expression bestimmter Myocyten-spezifischer Gene.

Definitive bzw. primitive embryonale Erythrozyten zeigen nach hormoneller Stimulierung *in vitro* in Bezug auf die untersuchten Gene unterschiedliches Verhalten: Definitive Erythrozyten des elften Entwicklungstages reagieren bei Stimulierung mit Noradrenalin bereits nach einer Stunde mit einer signifikant gesteigerten Expression der Pyrimidin 5'-Nukleotidase und aller anderen genannten Gene [Dragon und Baumann 2001, Dragon et al. 2002].

In Experimenten mit primitiven Erythrozyten aus fünf Tage alten Embryonen wurden nach *in vitro* Stimulierung mit Noradrenalin für die untersuchten Gene folgende Ergebnisse erhalten: In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression der Pyrimidin 5'-Nukleotidase nicht signifikant gesteigert werden. Das in definitiven Erythrozyten durch cAMP regulierte *hsp70* zeigte in primitiven Erythrozyten ebenfalls keine Induktion [Dragon und Baumann 2001]. Dagegen wurde eine signifikante Induktion von *tob*, *fos*, *ifr1* und *call* beobachtet [Dragon et al. 2002]. Dies weist auf Unterschiede in der cAMP-abhängigen Regulation der Genexpression primitiver und definitiver Erythrozyten hin.

Die Induktion der durch cAMP regulierten Gene erfordert keine Proteinneusynthese [Dragon et al. 2002]. Neue Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass nach Inkubation mit Noradrenalin innerhalb von Minuten ein Anstieg der phosphorylierten Form der Transkriptionsfaktoren CREB (cAMP response element binding protein), CREM und ATF-1 um mehr als das dreifache erfolgt [Simo, persönliche Mitteilung]. Diese Faktoren besitzen spezifische Serin-Reste für die Phosphorylierung durch die Proteinkinase A. Über die Proteinkinase A kann cAMP diese Transkriptionsfaktoren aktivieren. Daraufhin binden diese an eine bestimmte Consensus-Sequenz in der Promotor-Region des Gens, das cAMP Response Element (CRE) [De Cesare et al. 1999, Shaywitz und Greenberg 1999]. Möglicherweise könnte die Transkription der Gene, die während der Erythrozytenreifung cAMP-abhängig reguliert werden, über diesen Weg gesteuert werden.

Einfluss von Hypoxie auf die P5N-I Expression in embryonalen Erythrozyten

Die durch *in vitro* Stimulierung mit Noradrenalin oder CPCA ausgelöste Induktion der Pyrimidin 5'-Nukleotidase kann auch *in vivo* durch hypoxische Inkubation ausgelöst werden, da Hypoxie den physiologischen Reiz für die Freisetzung von Noradrenalin [Dragon et al. 1996] und Adenosin [Glombitza et al. 1996, Dragon et al. 1999] während der Embryonalentwicklung darstellt. Infolgedessen führt akute Hypoxie bei elf Tage alten Embryonen zur gesteigerten Expression von P5N-I. Auch die durch cAMP regulierten Gene *cal*, *fos*, *ifr1* und *tob* werden an Tag 11 durch Hypoxie induziert [Dragon et al. 2002].

Allerdings lassen sich die Wirkungen der Hypoxie z. B. im Fall der Carboanhydrase beim Hühnerembryo erst ab Tag 7 der Ontogenese beobachten [Million et al. 1991], obwohl sich in primitiven Erythrozyten von Tag 5 *in vitro* durch CPCA und NE die Carboanhydrase induzieren lässt [Dragon und Baumann 2001]. Der Hühnerembryo kann offensichtlich an den frühen Tagen als Antwort auf Hypoxie nicht mit gesteigerter Ausschüttung von Noradrenalin oder Adenosin reagieren, so dass keine pO₂-abhängige Regulation der Expression durch cAMP in primitiven Erythrozyten möglich ist.

Dennoch könnten Katecholamine für primitive Erythrozyten, die aus den Blutinseln des Dottersacks stammen [Bruns und Ingram 1973], eine Rolle spielen: Der Dotter enthält Noradrenalin und Adrenalin [Ignarro und Shideman 1968b], die über die Zirkulation des Dottersacks aufgenommen werden, so dass die primitiven Erythrozyten dort in Kontakt mit Katecholaminen kommen. Da im Embryo ab Tag 3 der Ontogenese Noradrenalin und Adrenalin nachgewiesen wurden, müssen diese Katecholamine aus dem Dotter stammen, da zu diesem Zeitpunkt die entsprechenden Enzyme zur *de novo* Synthese noch nicht vorhanden sind [Ignarro und Shideman 1968a]. Möglicherweise kommt es an den frühen Tagen durch die

obligate Exposition der primitiven Erythrozyten zu Noradrenalin zu einer Stimulierung der Synthese von Pyrimidin 5'-Nukleotidase. Dies deutet auch die höhere Aktivität der Pyrimidin 5'-Nukleotidase an Tag 3,5 an.

Expression der Pyrimidin 5'-Nukleotidase während der Ontogenese

Durch die Aufklärung der Basensequenz der P5N-I mRNA konnte erstmals das Expressionsmuster dieses Gens in den Erythrozyten während eines Großteils der Ontogenese untersucht werden. Allerdings ergeben sich aufgrund der verwendeten Methode bestimmte Einschränkungen hinsichtlich der Bewertung der Ergebnisse: Zwischen Tag 4 und Tag 6 nimmt der RNA-Gehalt der Erythrozyten sehr stark ab (Abbildung 2), während er ab Tag 8 bis Tag 19 nahezu konstant bleibt. Da bei der reversen Transkription jeweils gleich große Aliquots der gesamten zellulären RNA eingesetzt wurden, können die mittels RT-PCR erhaltenen Daten für den Zeitraum zwischen Tag 4 und Tag 6 nicht mit den Ergebnissen ab Tag 8 verglichen werden.

Zwischen Tag 8 und Tag 19 der Ontogenese zeigt der Verlauf der Genexpression eine enge Korrelation mit der Enzymaktivität. Ab Tag 14 kommt es vorübergehend zu einem signifikanten Anstieg der P5N-I mRNA sowie der P5N-I Aktivität. Nach Tag 15 gehen die Werte innerhalb von zwei Tagen wieder zurück. Das Enzym muss mit einer entsprechenden Geschwindigkeit in den Zellen abgebaut werden, da bei einer Abnahme der P5N-I mRNA in den Zellen die Enzymaktivität ebenfalls rasch abnimmt. Dies zeigte sich auch *in vitro* während einer Langzeitinkubation von Erythrozyten elf Tage alter Embryonen mit Noradrenalin. Über die Steuerung der Expression kann die Enzymaktivität in definitiven Erythrozyten offensichtlich schnell angepasst werden.

Die RT-PCR Signale der primitiven Erythrozyten von Tag 4 bis Tag 6 zeigen eine gleichbleibend geringe Expression der P5N-I mRNA, obwohl die Enzymaktivität in diesem Zeitraum etwas abnimmt. Bei der Interpretation der RT-PCR Daten ist zu berücksichtigen, dass die Menge der zellulären RNA an Tag 4 und Tag 6 erheblich höher ist, so dass anhand der Signalstärke kein Rückschluss auf die tatsächliche Abundanz der mRNA pro Zelle gezogen werden kann. Hier stößt die verwendete Methodik zur Analyse der Genexpression an ihre Grenzen: tatsächlichen Aufschluss über die mRNA Expression in diesem Zeitraum könnten nur run-on Experimente liefern.

Beim Vergleich der Expression von Pyrimidin 5'-Nukleotidase und Carboanhydrase zeigen sich Gemeinsamkeiten während der zweiten Hälfte der Ontogenese: Auch im Fall der CA II steigt ab Tag 13 der Gehalt der bis dahin kaum exprimierten mRNA in den Zellen mit einem Maximum an Tag 15 [Dragon und Baumann 2001]. Gleichzeitig nimmt die Aktivität des Enzyms ab diesem Zeitpunkt zu [Baumann et al.

1986]. Während die Aktivität der Pyrimidin 5'-Nukleotidase nach Tag 15 wieder auf ein niedrigeres Niveau zurückgeht, steigt die Aktivität der Carboanhydrase bis Tag 18 weiter an.

Aufgrund der fortschreitenden Hypoxie während der Ontogenese kommt es ab Tag 13 zu einem Anstieg der Noradrenalin-Konzentration im Plasma [Dragon et al. 1996], die zu einer gesteigerten Expression der beiden Enzyme führt. Infolge der erhöhten P5N-I Aktivität nehmen die Konzentrationen von UTP und CTP ab und die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins nimmt zu [Baumann et al. 2003]. Die erhöhte Aktivität der CA II ist eine Anpassung an die auftretende Hyperkapnie in der zweiten Hälfte der Ontogenese. Damit wird eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Embryos gewährleistet.

Insgesamt liegen die während der Embryonal-/Fetalentwicklung gemessenen Werte der P5N-I Aktivität deutlich höher als die Aktivität im Blut adulter Organismen. Im Hämolysat adulter Hühner wurde von mir eine Aktivität gemessen, die der Aktivität an Tag 19 der Ontogenese entspricht, wenn bereits ausdifferenzierte definitive Erythrozyten mit niedriger P5N-I Aktivität in der Zirkulation vorliegen. Auch für Humanerythrozyten ist bekannt, dass die unreiferen fetalen Erythrozyten während der 17-23. Woche der Schwangerschaft eine höhere Pyrimidin 5'-Nukleotidaseaktivität enthalten als die Erythrozyten der Mutter [Lestas et al. 1986]. Da auch während der Differenzierung von adulten Humanerythrozyten [Torrance et al. 1980] sowie von Erythrozyten adulter Hühner [Hokari et al. 2001a] Stadien mit erhöhter Aktivität der Pyrimidin 5'-Nukleotidase auftreten, lässt sich vermuten, dass die Regulation der Enzymaktivität während der Erythropoese im Knochenmark sowohl bei Säugern als auch bei Vögeln ähnlich verläuft.

Funktion der Pyrimidin 5'-Nukleotidase für die Entwicklung des Embryos

Die Pyrimidin 5'-Nukleotidase stellt eine Verknüpfung zwischen dem Abbau der RNA während der Zelldifferenzierung und einer funktionellen Anpassung der Erythrozyten in Form der Regulation der Sauerstoffaffinität durch die aus dem RNA-Abbau stammenden Nukleotide UTP und CTP her. Die Sauerstoffversorgung des Vogelembryos ist zum einen abhängig von Umweltbedingungen, beispielsweise ist bei höhenbrütenden Vögeln der pO_2 in der Umgebungsluft bereits niedriger, zum anderen besitzen einzelne Eier eine unterschiedliche Diffusionskapazität für die Atemgase O_2 und CO_2 aufgrund von Unterschieden in der Eigröße [Xu und Mortola 1988, Koller et al. 1994] und der Schalendicke [Visschedijk et al. 1985, Nakazawa und Tazawa 1988]. Durch die hormonelle Regulation der Enzymaktivität in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck ist eine individuelle Anpassung an die Bedürfnisse des Embryos möglich.

Außerdem ist die Reduktion der Konzentration von Pyrimidinnukleotiden über den Abbau von UMP und CMP zu den Nukleosiden Uridin und Cytidin durch die Pyrimidin 5'-Nukleotidase wohl für die Funktionsfähigkeit und Integrität der Erythrozyten wichtig, wie das Auftreten der durch eine zu geringe Aktivität der P5N-I verursachten hämolytischen Anämie in Humanerythrozyten zeigt [Valentine et al. 1974].

Darüber hinaus könnte die Pyrimidin 5'-Nukleotidase noch in weiteren Zusammenhängen für die Entwicklung des Organismus von Bedeutung sein. Von embryonalen Erythrozyten abgegebenes Uridin und Cytidin könnte in anderen Geweben von den Zellen aufgenommen werden und als Vorläufer für dort benötigte Nukleotide dienen, um eine energetisch aufwändige *de-novo* Synthese zu vermeiden.

Bei adulten Organismen findet die Erythropoese im Knochenmark statt, wobei die einzelnen Differenzierungsschritte vergleichbar ablaufen. Die erythropoetische Aktivität des Knochenmarks wird durch Katecholamine über sympathische Innervation beeinflusst [Afan et al. 1997, Maestroni et al. 1998]. Daher könnte auch bei der Erythropoese im Knochenmark in der Phase des RNA-Abbaus eine Induktion der Pyrimidin 5'-Nukleotidase durch Katecholamine ausgelöst werden. Die von den Zellen abgegebenen Nukleoside könnten im Knochenmark von erythroiden Zellen, die sich in einem früheren Entwicklungsstadium befinden, aufgenommen werden. Somit könnten sich diese zumindest einen Teil der aufwändigen *de-novo* Synthese ersparen.

Die niedrige Pyrimidin 5'-Nukleotidaseaktivität während der zweiten Woche der Ontogenese ermöglicht eine weitgehende Stabilisierung der intrazellulären UTP-Konzentration zwischen Tag 8 und Tag 11. Diese ist im Vergleich zu den Werten, die für viele andere Zelltypen bekannt sind [Traut 1994], außergewöhnlich hoch. Das Maximum an UTP tritt zu einem Zeitpunkt auf, an dem die Chorioallantois mit maximaler Geschwindigkeit wächst. [Ackerman und Rahn 1981]. UTP wirkt auf die Chorioallantois als angiogener Faktor ähnlich wie VEGF [Satterwhite et al. 1999]. Eine Abgabe von UTP aus den Erythrozyten könnte daher an der Regulation des Wachstums der Chorioallantois beteiligt sein. Verschiedene Zelltypen, darunter Blutplättchen, besitzen die Fähigkeit, geringe Mengen UTP an ihre Umgebung abzugeben [Lazarowski und Harden 1999], wobei dieses UTP als extrazelluläres Botenmolekül wirken kann [Lazarowski und Boucher 2001]. Bei Erythrozyten mehrerer Spezies ist bekannt, dass diese als Reaktion auf mechanische Deformierung ATP abgeben können [Sprague et al. 2001]. In welchem Ausmaß UTP von embryonalen Hühnererythrozyten freigesetzt wird, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Die Regulation der Pyrimidin 5'-Nukleotidaseaktivität ist also mit verschiedenen Aspekten der endgültigen erythroiden Differenzierung bzw. der Embryonalentwicklung verknüpft. Mit Hilfe der am System des Vogelembryos erhaltenen Ergebnisse können neue Einblicke in die während der Erythropoese ablaufenden Mechanismen gewonnen werden, die auch zur Aufklärung der Abläufe in anderen Spezies beitragen können. Eine zentrale Rolle spielt dabei die hormonell gesteuerte und durch cAMP vermittelte Regulation der Expression mehrerer Gene, die zusammen mit der Pyrimidin 5'-Nukleotidase die Entwicklung zum reifen Erythrozyten beeinflussen. Auch bei Säugererythrozyten ist bekannt, dass sie ein entsprechendes cAMP-Signaltransduktionssystem besitzen [Porzig et al. 1991, 1995]. Eine mögliche Beteiligung von cAMP an der erythroiden Differenzierung wurde bisher nur an der transformierten Erythroblasten-Zelllinie HD3 des Huhns nachgewiesen [Grdisa und White 2000], die Aufklärung der Regulation der Pyrimidin 5'-Nukleotidase durch cAMP *in vivo* in embryonalen Vogelerythrozyten unterstreicht den Wert dieses Systems für die Erforschung der Erythropoese.

VI Zusammenfassung

Die Pyrimidin 5'-Nukleotidase ist das Schlüsselenzym für den Abbau von Pyrimidinnukleotiden in Erythrozyten. Da während der terminalen Differenzierung mehr als 90 % der zellulären RNA abgebaut werden, führt ein Mangel an Pyrimidin 5'-Nukleotidase in adulten Erythrozyten zu hämolytischer Anämie. Auch während der Embryonalentwicklung spielt das Enzym eine wesentliche Rolle: In embryonalen Vogelerythrozyten werden durch Veränderungen der Pyrimidin 5'-Nukleotidaseaktivität die Konzentrationen von UTP und CTP, die als allosterische Effektoren des Hämoglobins wirken, angepasst. Bislang lagen jedoch keine Studien zur Regulation der Expression der Pyrimidin 5'-Nukleotidase vor.

In dieser Arbeit wurde erstmals die Expression des Enzyms während verschiedener Entwicklungsstadien des Embryos, in denen unterschiedliche Differenzierungsgrade der Erythrozyten vorliegen, untersucht. Dazu wurden folgende Experimente durchgeführt:

1. Reinigung der Pyrimidin 5'-Nukleotidase mit proteinchemischen Methoden und Bestimmung seiner Aminosäuresequenz.
2. Erstellen der Basensequenz der Pyrimidin 5'-Nukleotidase mRNA nach Screening einer cDNA-Bank embryonaler Hühnererythrozyten.
3. Untersuchung der Expression des Enzyms mittels RT-PCR zwischen Tag 4 und Tag 19 der Embryogenese.
4. Untersuchung des Einflusses von *in vivo* Hypoxie bzw. von *in vitro* Stimulation mit Noradrenalin und dem Adenosinrezeptoragonisten CPCA auf die Expression der Pyrimidin 5'-Nukleotidase.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Die ermittelte Proteinsequenz zeigt eine ausgeprägte Homologie zum entsprechenden Enzym aus Humanerythrozyten (Sequenzhomologie >87 %).

Die Untersuchung der Expression während der Embryonalentwicklung ergab eine markante vorübergehende Expressionssteigerung zwischen Tag 13 und Tag 17. Der Verlauf der Pyrimidin 5'-Nukleotidaseaktivität zeigt eine enge Korrelation mit dem Expressionsmuster der Pyrimidin 5'-Nukleotidase mRNA.

Durch kurzfristige hypoxische Inkubation lässt sich in definitiven Erythrozyten die Expression der Pyrimidin 5'-Nukleotidase deutlich steigern. Diese Induktion wird ausgelöst durch hypoxiebedingte Freisetzung von Noradrenalin und Adenosin (aus früheren Untersuchungen bekannt), da direkte Stimulation der Erythrozyten mit

Noradrenalin und CPCA ebenfalls über Aktivierung des cAMP-Signaltransduktionsweges eine deutliche Steigerung der Expression hervorruft.

Im Gegensatz zu den definitiven Erythrozyten, die ab Tag 7 die dominierende erythroide Population darstellen, zeigen sich in primitiven Erythrozyten, die als erste Population gebildet werden, nur geringe Änderungen der Expression nach Stimulation des cAMP-Signaltransduktionsweges, obwohl die cAMP-abhängige Signaltransduktion in gleicher Stärke wie in definitiven Erythrozyten vorliegt. Wir schließen daraus, dass die Expression der Pyrimidin 5'-Nukleotidase in primitiven Erythrozyten noch über andere Faktoren geregelt wird.

Anhand der Ausschüttung von hormonellen Effektoren infolge von Hypoxie lässt sich auch der vorübergehende Anstieg der Aktivität der Pyrimidin 5'-Nukleotidase gegen Ende der Embryogenese erklären, denn in diesem Zeitraum entwickelt sich eine zunehmende intraembryonale Hypoxie. Da durch die Steigerung der Pyrimidin 5'-Nukleotidaseaktivität der Abbau von UTP und CTP beschleunigt wird, kommt es zu einer kompensatorischen Erhöhung der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins als Anpassung an die zunehmende Hypoxie.

Dies unterstreicht die funktionelle Bedeutung der Pyrimidin 5'-Nukleotidase und der mit der Steuerung der Expression verknüpften Signaltransduktionswege für die erythroide Differenzierung.

VII Literaturverzeichnis

- Ackerman R.A. und Rahn H. (1981)** In vivo O₂ and water vapor permeability of the hen's eggshell during early development. *Respir. Physiol.* **45**: 1-8.
- Afan A.M., Broome C.S., Nicholls S.E., Whetton A.D. und Miyan J.A. (1997)** Bone marrow innervation regulates cellular retention in the murine haemopoietic system. *Br. J. Haematol.* **98**: 569-577.
- Amici A., Natalini P., Ruggieri S., Vita A. und Magni G. (1989)** A spectrophotometric method for the assay of pyrimidine 5'-nucleotidase in human erythrocytes. *Br. J. Haematol.* **73**: 392-395.
- Amici A., Ferretti E., Vincenzetti S., Vita A. und Magni G. (1991)** Pyrimidine 5'-nucleotidase(s) of human erythrocytes: enzymatic and molecular characterization. *Adv. Exp. Med. Biol.* **309B**: 245-248
- Amici A., Emanuelli M., Ferretti E., Raffaelli N., Ruggieri S. und Magni G. (1994)** Homogeneous pyrimidine nucleotidase from human erythrocytes: enzymic and molecular properties. *Biochem. J.* **304**: 987-992
- Amici A., Emanuelli M., Magni G., Raffaelli N. und Ruggieri S. (1997)** Pyrimidine nucleotidases from human erythrocyte possess phosphotransferase activities specific for pyrimidine nucleotides. *FEBS Lett.* **419**: 263-267
- Amici A., Emanuelli M., Raffaelli N., Ruggieri S., Saccucci F. und Magni G. (2000)** Human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase, PN-I, is identical to p36, a protein associated to lupus inclusion formation in response to α -interferon. *Blood* **96(4)**: 1596-1598.
- Angel P. und Karin M. (1991)** The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* **1072**: 129-157.
- Bartels H., Hiller G. und Reinhardt W. (1966)** Oxygen affinity of chicken blood before and after hatching. *Respir. Physiol.* **1**: 345-356.
- Baumann R. und Baumann F.H. (1978)** Respiratory function of embryonic chicken hemoglobin. In: *Respiratory function in birds, adult and embryonic*, Hrsg: J. Piiper, Springer-Verlag, Berlin: 292-297.
- Baumann R., Padeken, S., Haller E.A. und Brilmayer T. (1983)** Effects of hypoxia on oxygen affinity, hemoglobin pattern, and blood volume of early chicken embryos. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **244**: R733-R741
- Baumann R. (1984)** Regulation of oxygen affinity of embryonic blood during hypoxic incubation. In: *Respiration and metabolism of embryonic vertebrates*, Hrsg: R.S. Seymour, Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, Niederlande: 221-230.

- Baumann R., Haller E.A., Schöning U. und Weber M. (1986)** Hypoxic incubation leads to concerted changes of carbonic anhydrase activity and 2,3-DPG-concentration of chick embryo red cells. *Dev. Biol.* **116**: 548-551.
- Baumann R., Blass C., Götz R. und Dragon S. (1999)** Ontogeny of catecholamine and adenosine receptor-mediated cAMP signaling of embryonic red blood cells: role of cGMP-inhibited phosphodiesterase 3 and hemoglobin. *Blood* **94**(12): 4314-4320.
- Baumann R., Götz R. und Dragon S. (2003)** NTP pattern of avian embryonic red cells: role of RNA degradation and AMP deaminase/5'-nucleotidase activity. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **284**: R771-R779.
- Beaupain D. (1985)** Line-restricted hemoglobin synthesis in chick embryonic erythrocytes. *Cell. Differ.* **16**: 101-107.
- Bradford M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brown J.L. und Ingram V.M. (1974)** Structural studies on chick embryonic hemoglobins. *J. Biol. Chem.* **249**: 3960-3972.
- Bruns G.A.P. und Ingram V.M. (1973)** The erythroid cells and haemoglobins of the chick embryo. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **266**: 225-305.
- Burton F.G. und Tullett S.G. (1985)** Respiration of avian embryos *Comp. Biochem. Physiol. A* **82**: 735-744.
- Calvaruso G. und Taibi G. (1985)** Partial purification and some properties of a 5'-nucleotidase from chicken liver with activity toward pyrimidine nucleoside monophosphates. *Boll. Soc. It. Biol. Sper.* **61**: 335-341.
- Chomczynski P und Sacchi N. (1987)** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.
- Cirotto C. und Arangi I. (1989)** How do avian embryos breathe? Oxygen transport in the blood of early chick embryos. *Comp. Biochem. Physiol. A* **94**: 607-613.
- Clark A.M. (1951)** Carbonic anhydrase activity during embryonic development. *J. Exp. Biol.* **28**: 332-343.
- Cormier F. und Dieterlen-Lievre F. (1988)** The wall of the chick embryo aorta harbours M-CFC, G-CFC, GM-CFC and BFU-E. *Development* **102**: 279-285.
- De Cesare D., Fimia G.M. und Sassone-Corsi P. (1999)** Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. *TIBS* **24**: 281-285.

- Dieterlen-Lievre F. (1987)** Respective roles of programs and differentiation factors during hemoglobin switching in the embryo. In: *Molecular and Cellular Aspects of Erythropoietin and Erythropoiesis*, Hrsg. I.N. Rich, Springer-Verlag, Berlin: 127-145.
- Dragon S., Glombitza S., Götz R. und Baumann R. (1996)** Norepinephrine-mediated hypoxic stimulation of embryonic red cell carbonic anhydrase and 2,3-DPG synthesis. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **271**: R982-R989.
- Dragon S., Hille R., Götz R. und Baumann R. (1998)** Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate (cAMP)-inducible pyrimidine 5'-nucleotidase and pyrimidine nucleotide metabolism of chick embryonic erythrocytes. *Blood* **91**(8): 3052-3058.
- Dragon S., Carey C., Martin K. und Baumann R. (1999)** Effect of high altitude and in vivo adenosine/ β -adrenergic receptor blockade on ATP and 2,3-BPG concentrations in red blood cells of avian embryos. *J. Exp. Biol.* **202**: 2787-2795.
- Dragon S. und Baumann R. (2001)** Erythroid carbonic anhydrase and hsp70 expression in chick embryonic development: role of cAMP and hypoxia. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **280**: R870-R878.
- Dragon S., Offenhäuser N. und Baumann R. (2002)** cAMP and in vivo hypoxia induce *tob*, *ifr1*, and *fos* expression in erythroid cells of the chick embryo. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **282**: R1219-R1226.
- Freeman B.M. und Misson B.H. (1970)** pH, pO_2 and pCO_2 of blood from the foetus and neonate of *gallus domesticus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **33**: 763-772.
- Freeman B.M. und Vince M.A. (1974)** *Development of the Avian Embryo*. Chapman and Hall, London: 121.
- Fritzson P. und Smith I. (1971)** A new nucleotidase of rat liver with activity toward 3'- and 5'-nucleotides. *Biochim. Biophys. Acta* **235**: 128-141
- Glombitza S., Dragon S., Berghammer M., Pannermayr M. und Baumann R. (1996)** Adenosine causes cAMP-dependent activation of chick embryo red cell carbonic anhydrase and 2,3-DPG synthesis. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **271**: R973-R981.
- Grdisa M. und White M.K. (2000)** Erythrocytic differentiation and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression are regulated by protein phosphorylation and cAMP in HD3 cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**: 589-595.
- Guardavaccaro D., Ciotti M.T., Schäfer B.W., Montagnoli A. und Tirone F. (1995)** Inhibition of differentiation in myoblasts deprived of the interferon-related protein PC4. *Cell Growth Differ.* **6**: 159-169.

- Gültekin H. und Heermann K.H. (1988)** The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal. Biochem.* **172**: 320-329.
- Hirono A., Fujii H. und Miwa S. (1985)** Isozymes of human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase – chromatographic separation and their properties. *Japan. J. Exp. Med.* **55**: 37-44.
- Höglund L. und Reichard P. (1990)** cytoplasmic 5'(3')-nucleotidase from human placenta. *J. Biol. Chem.* **265**: 6589-6595.
- Høiby M., Aulie A. und Reite O.B. (1983)** Oxygen uptake in fowl eggs incubated in air and pure oxygen. *Comp. Biochem. Physiol. A* **74**: 315-318.
- Hokari S., Miyazaki T., Hasegawa M. und Komoda T. (1998)** Enhanced activity of pyrimidine 5'-nucleotidase in rat red blood cells during erythropoiesis. *Biol. Chem.* **379**: 329-333.
- Hokari S., Miyazaki T., Hasegawa M., Koyama I. und Komoda T. (2001a)** Chicken erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase: purification and characterization of the subclass I enzyme. *Biol. Chem.* **382**: 919-924.
- Hokari S., Miyazaki T., Matsunaga T., Koyama I., Hasegawa M. und Komoda T. (2001b)** Expression of pyrimidine 5'-nucleotidase subclass I during erythrocyte maturation in rats. *J. Hematother. Stem Cell Res.* **10**: 703-707.
- Holloway P.W. (1973)** A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. *Anal. Biochem.* **53**: 304-308.
- Hughes P., Lowe C.R. und Sherwood R.F. (1982)** Metal ion-promoted binding of proteins to immobilized triazine dye affinity adsorbents. *Biochim. Biophys. Acta* **700**: 90-100.
- Ignarro L.J. und Shideman F.E. (1968a)** Appearance and concentrations of catecholamines and their biosynthesis in the embryonic and developing chick. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **159**: 38-48.
- Ignarro L.J. und Shideman F.E. (1968b)** Norepinephrine and epinephrine in the embryo and embryonic heart of the chick: uptake and subcellular distribution. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **159**: 49-58.
- Isaacks R.E. und Harkness D.R. (1975)** 2,3-Diphosphoglycerate in erythrocytes of chick embryos. *Science* **189**: 393-394.
- Isaacks R.E. und Harkness D.R. (1980)** Erythrocyte organic phosphates and hemoglobin function in birds, reptiles, and fishes. *Amer. Zool.* **20**: 115-119.
- Itoh R., Oka J. und Ozasa H. (1986)** Regulation of rat heart cytosol 5'-nucleotidase by adenylate energy charge. *Biochem. J.* **235**: 847-851.

- Jarvis S.M., Hammond J.R., Paterson A.R.P. und Clanachan A.S. (1982)** Species differences in nucleoside transport. *Biochem. J.* **208**: 83-88.
- Koller M., Dragon S. und Baumann R. (1994)** Control of red cell function of late chick embryos: role of extracellular ATP/AMP and egg size. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **267**: R542-R548.
- Lachant N.A., Zerez C.R. und Tanaka K.R. (1987)** Pyrimidine nucleoside monophosphate kinase hyperactivity in hereditary erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency. *Br. J. Haematol.* **66**: 91-96.
- Laemmli U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lassila O., Martin C., Toivanen P. und Dieterlen-Lievre F. (1982)** Erythropoiesis and lymphopoiesis in the chick yolk-sac-embryo chimeras: contribution of yolk sac and intraembryonic stem cells. *Blood* **59**: 377-381.
- Lazarowski E.R. und Harden T.K. (1999)** Quantitation of extracellular UTP using a sensitive enzymatic assay. *Br. J. Pharmacol.* **127**: 1272-1278.
- Lazarowski E.R. und Boucher R.C. (2001)** UTP as an extracellular signaling molecule. *News Physiol. Sci.* **16**: 1-5.
- Lemez L. (1977)** Quantitative Studie der fünf Typen der definitiven Erythrozyten (E II) beim Hühnerembryo. *Verh. Anat. Ges.* **71**: 235-238.
- Lestas A.N., Nicolaides K.H., Rodeck C.H. und Bellingham A.J. (1986)** Normal levels of ATP, total nucleotides and activities of three enzymes related to nucleotide metabolism in fetal erythrocytes. *Br. J. Haematol.* **63**: 471-476.
- Liang L. und Johnstone R.M. (1992)** Evidence for an internal pool of nucleoside transporters in mammalian reticulocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1106**: 189-196.
- Madrid-Marina V. und Fox I.H. (1986)** Human placental cytoplasmic 5'-nucleotidase. *J. Biol. Chem.* **261**: 444-452.
- Maestroni G.J.M., Cosentino M., Marino F., Togni M., Conti A., Lecchini S. und Frigo G. (1998)** Neural and endogenous catecholamines in the bone marrow. Circadian association of norepinephrine with hematopoiesis? *Exp. Hematol.* **26**: 1172-1177.
- Magni G., Amici A., Ruggieri S., Vita A. und Natalini P. (1989)** Erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase: HPLC assay, observation on the enzyme behavior. *Adv. Exp. Med. Biol.* **253B**: 165-171.

- Marinaki A.M., Escuredo E., Duley J.A., Simmonds H.A., Amici A., Naponelli V., Magni G., Seip M., Ben-Bassat I., Harley E.H., Thein S.L. und Rees D.C. (2001)** Genetic basis of hemolytic anemia caused by pyrimidine 5' nucleotidase deficiency. *Blood* **97**: 3327-3332.
- Markin R.S., Angle C.R., Swanson M.S. und Stohs S.J. (1983)** Partial purification and zinc dependence of human red cell pyrimidine-5'-nucleotidase. *Enzyme* **30**: 134-138.
- Matsuda S., Rouault J.P., Magaud J.P. und Berthet C. (2001)** In search of a function for the TIS21/PC3/BTG1/TOB family. *FEBS Lett.* **497**: 67-72.
- Matsudaira P. (1987)** Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* **262(21)**: 10035-10038.
- Medvinsky A.L., Samoylina N.L., Müller A.M. und Dzierzak E.A. (1993)** An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* **364**: 64-67.
- Million D., Zillner P. und Baumann R. (1991)** Oxygen pressure-dependent control of carbonic anhydrase synthesis in chick embryonic erythrocytes. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **261**: R1188-R1196.
- Misson B.H. und Freeman B.M. (1972)** Organic phosphates and oxygen affinity of chick blood before and after hatching. *Respir. Physiol.* **14**: 343-352.
- Nakazawa S. und Tazawa H. (1988)** Blood gases and hematological variables of chick embryos with widely altered shell conductance. *Comp. Biochem. Physiol. A* **89**: 271-277.
- Nimmo H.G. und Nimmo G.A. (1982)** A general method for the localization of enzymes that produce phosphate, pyrophosphate, or CO₂ after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **121**: 17-22.
- Oettl K. (1997)** *Die Rolle der Pyrimidin-5'-Nukleotidase im Pyrimidinabbau embryonaler Hühnererythrozyten.* Zulassungsarbeit, Universität Regensburg.
- Paganelli C.V., Ar A., Rahn H. und Wangenstein O.D. (1975)** Diffusion in the gas phase: the effects of ambient pressure and gas composition. *Respir. Physiol.* **25**: 247-258.
- Paglia D.E. und Valentine W.N. (1975)** Characteristics of a pyrimidine-specific 5'-nucleotidase in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **250**: 7973-7979.

- Paglia D.E., Valentine W.N., Keitt A.S., Brockway R.A. und Nakatani M. (1983)** Pyrimidine nucleotidase deficiency with active dephosphorylation of dTMP: Evidence for existence of thymidine nucleotidase in human erythrocytes. *Blood* **62**: 1147-1149.
- Paglia D.E., Valentine W.N. und Brockway R.A. (1984)** Identification of thymidine nucleotidase and deoxyribonucleotidase activities among normal isozymes of 5'-nucleotidase in human erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 588-592.
- Paglia D.E., Valentine W.N., Brockway R.A. und Nakatani M. (1987)** Substrate specificity and pH sensitivity of deoxyribonucleotidase and pyrimidine nucleotidase activities in human hemolysates. *Exp. Hematol.* **15**: 1041-1047.
- Paglia D.E., Renner S.W. und Bhambhani K. (1999)** Differential effects of low-level lead exposure on the natural isozymes of erythrocyte 5'-nucleotidase. *Clin. Biochem.* **32**: 193-199.
- Porzig H., Moudry R. und Montandon J.B. (1991)** Analysis by cell hybridization of mechanisms that regulate β -adrenergic responses in reticulocytes and in differentiating erythroid cells. *J. Cell. Physiol.* **147**: 439-446.
- Porzig H., Gutknecht R., Kostova G. und Thalmeier K. (1995)** G-protein-coupled receptors in normal human erythroid progenitor cells. *Naunyn-Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* **353**: 11-20.
- Rahn H., Ar A. und Paganelli C.V. (1979)** How bird eggs breathe. *Sci. Am.* **240**: 38-47.
- Rampazzo C., Johansson M., Gallinaro L., Ferraro P., Hellman U., Karlsson A., Reichard P. und Bianchi V. (2000)** Mammalian 5'(3')-deoxyribonucleotidase, cDNA cloning, and overexpression of the enzyme in *Escherichia coli* and mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **275**: 5409-5415.
- Rapoport S.M. (1986)** The reticulocyte. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Romanoff A.L. (1960)** The avian embryo. Macmillan Company, New York.
- Romanoff A.L. (1967)** Biochemistry of the avian embryo. Wiley, New York.
- Satterwhite C.M., Farrelly A.M. und Bradley M.E. (1999)** Chemotactic, mitogenic, and angiogenic actions of UTP on vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **276**: H1091-H1097.
- Seagrave J. und Reyes P. (1985)** Pyrimidine nucleoside monophosphate kinase from rat bone marrow cells: Purification to high specific activity by a two-step affinity chromatography procedure. *Anal. Biochem.* **149**: 169-176.

- Shaywitz A.J. und Greenberg M.E. (1999)** CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 821-861.
- Sprague R.S., Ellsworth M.L., Stephenson A.H. und Lonigro A.J. (2001)** Participation of cAMP in a signal-transduction pathway relating erythrocyte deformation to ATP release. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **281**: C1158-C1164.
- Spychala J., Madrid-Marina V. und Fox I.H. (1988)** High K_m soluble 5'-nucleotidase from human placenta. *J. Biol. Chem.* **263**: 18759-18765.
- Swallow D.M., Aziz I., Hopkinson D.A. und Miwa S. (1983a)** Analysis of human erythrocyte 5'-nucleotidases in healthy individuals and a patient deficient in pyrimidine 5'-nucleotidase. *Ann. Hum. Genet.* **47**: 19-23.
- Swallow D.M., Turner V.S. und Hopkinson D.A. (1983b)** Isozymes of rodent 5'-nucleotidase: evidence for two independent structural loci *Umph-1* and *Umph-2*. *Ann. Hum. Genet.* **47**: 9-17.
- Tazawa H. (1971)** Measurement of respiratory parameters in blood of chicken embryo. *J. Appl. Physiol.* **30**(1): 17-20.
- Tazawa H. und Mochizuki M. (1977)** Oxygen analysis of chicken embryo blood. *Respir. Physiol.* **31**: 203-215.
- Tazawa H. (1980)** Oxygen and CO₂ exchange and acid-base regulation in the avian embryo. *Am. Zool.* **20**: 395-404.
- Thompson S.T., Cass K.H. und Stellwagen E. (1975)** Blue dextran-sepharose: an affinity column for the dinucleotide fold in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 669-672.
- Tobin A.J., Hansen D.A., Seftor E.A., McCabe J.B. und DeCloe J. (1983)** Transcription and processing of mRNAs during erythroid development in chickens. in: *Regulation of Hemoglobin Biosynthesis*, Hrsg: E. Goldwasser, Elsevier Biomed., New York: 271-280.
- Tomoda A., Noble N.A., Lachant N.A. und Tanaka K.R. (1982)** Hemolytic anemia in hereditary pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency: nucleotide inhibition of G6PD and the pentose phosphate shunt. *Blood* **60**(5): 1212-1218.
- Torrance J.D., Whittaker D. und Beutler E. (1977)** Purification and properties of human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 3701-3704.
- Torrance J.D. und Whittaker D. (1979)** Distribution of erythrocyte nucleotides in pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency. *Br. J. Haematol.* **43**: 423-434.

- Torrance J.D., Whittaker D. und Jenkins T. (1980)** Erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase. *Br. J. Haematol.* **45**: 585-597.
- Towbin H., Staehelin T. und Gordon J. (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.
- Traut T.W. (1994)** Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol. Cell. Biochem.* **140**: 1-22
- Valentine W.N., Fink K., Paglia D.E., Harris S.R. und Adams W.S. (1974)** Hereditary hemolytic anemia with human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency. *J. Clin. Invest.* **54**: 866-879.
- Visschedijk A.H.J., Tazawa H. und Piiper J. (1985)** Variability of shell conductance and gas exchange of chicken eggs. *Respir. Physiol.* **59**: 339-345.
- Wangensteen O.D. und Rahn H. (1970/71)** Respiratory gas exchange by the avian embryo. *Respir. Physiol* **11**: 31-45.
- Wegelin I., Pane G. und Clo C. (1990)** Studies of pyrimidine metabolism during chick development: two enzymes involved in UMP breakdown. *Ital. J. Biochem.* **39**: 361-367.
- Xu L. und Mortola J.P. (1988)** Development of the chick embryo: effects of egg mass. *Respir. Physiol.* **74**: 177-186.
- Zon L.I. (1995)** Developmental biology of hematopoiesis. *Blood* **86**: 2876-2891.

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Physiologie der Universität Regensburg unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. med. Rosemarie Baumann.

Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei:

...Frau Prof. Dr. Baumann für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Betreuung dieser Arbeit.

...Frau Dr. Stefanie Dragon für ihre stetige Diskussionsbereitschaft, die immer wieder zu hilfreichen Anregungen und neuer Motivation führte.

...Herrn Robert Götz für zahlreiche wertvolle Hilfestellungen und Tipps bei technischen Problemen.

...Frau Regine Volkmann und Frau Frieda Webinger für die gewissenhafte Durchführung einiger Experimente zur Genexpression.

...Frau Erika Simo, die eine überaus angenehme und nette Kollegin war.

...Herrn Prof. Dr. Rainer Deutzmann und Herrn Eduard Hochmuth für die Durchführung der Proteinsequenzierungen.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei allen Angehörigen des Instituts für die angenehme Atmosphäre und für Hilfestellungen jeder Art bedanken. Nicht zuletzt muss die hervorragende kulinarische Versorgung infolge diverser Geburtstage von Mitarbeitern des Instituts hervorgehoben werden, wodurch der Laboralltag angenehm aufgelockert wurde.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Markus Maß