

Untersuchungen zur Lokalisation und Funktion der cAMP-induzierten Proteine IFR1 und TOB bei der terminalen Erythrozytendifferenzierung



DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN
(DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
– BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN –
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON
SIMONE KARIN STEINER
AUS SONTHOFEN

FEBRUAR 2009

Promotionsgesuch eingereicht am: 10.02.2009

Promotionskolloquium am: 29.05.2009

Die Arbeit wurde angeleitet von: PD Dr. Stefanie Dragon

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Richard Warth (Vorsitzender)
PD Dr. Stefanie Dragon (1. Prüfer, Erstgutachten)
PD Dr. Rainer Schreiber (2. Prüfer, Zweitgutachten)
Prof. Dr. Reinhard Sterner (3. Prüfer)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Der Hühnerembryo als Forschungsobjekt	1
1.2 Die Erythropoiese	2
1.2.1 Stadien der Erythropoiese	2
1.2.2 Regulation der Erythropoiese	3
1.2.3 Transkriptionsfaktoren der Erythropoiese	5
1.3 Modelle der Erythrozytendifferenzierung	5
1.4 Entwicklung und Differenzierung der Erythrozyten im Hühnerembryo	6
1.5 Regulation der erythroiden Pyrimidin-5'-Nucleotidase, der Carboanhydrase II und von 2,3-Bisphosphoglycerat	8
1.6 Stimulation von <i>ifr1</i> und <i>tob</i> über den cAMP-Signalweg	11
1.6.1 Das antiproliferative Protein TOB	11
1.6.2 IFR1 als Regulator in der Differenzierung	12
1.7 Zielsetzung der Arbeit	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Geräte	16
2.1.2 Verbrauchsmaterial	17
2.1.3 Chemikalien, Enzyme, Kits	18
2.1.4 Puffer, Medien und Lösungen	19
2.1.4.1 Stammlösungen	19
2.1.4.2 Erythrozyten	19
2.1.4.3 siRNA Puffer und verwendete Liposomen	20
2.1.4.4 Ribosomenpellets	20
2.1.4.5 SDS-PAGE	21
2.1.4.6 Färbungen	21
2.1.4.7 Western und Farwestern	22
2.1.4.8 2D Elektrophorese mit IPG	23
2.1.4.9 AUT Elektrophorese	23
2.1.4.10 Chemischer Crosslink	24
2.1.4.11 UV-Crosslink	24
2.1.4.12 Northern Blot	24
2.1.4.13 Agarose-Gelelektrophorese	25
2.1.4.14 Molekulargewichtsstandards	26
2.1.4.15 Oligonukleotide/Primer RT-PCR	27
2.1.4.16 siRNA Sequenzen	27
2.1.4.17 Antikörper und rekombinantes IFR1	28
2.2 Methoden	29
2.2.1 Arbeiten mit embryonalen Hühner Erythrozyten	29

2.2.1.1	Bebrütung der Eier	29
2.2.1.2	Gewinnung der embryonalen Hühnererythrozyten.....	29
2.2.1.3	<i>In vitro</i> Inkubation.....	29
2.2.1.4	Bestimmung der Hämoglobinkonzentration	30
2.2.1.5	Lyse der embryonalen Hühnererythrozyten	31
2.2.1.6	Blutausstrich der embryonalen Hühnererythrozyten	32
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	32
2.2.2.1	Proteinbestimmung nach M.M. Bradford.....	32
2.2.2.2	SDS-Polyacrylamidgelektrophorese.....	32
2.2.2.3	Coomassie Färbung.....	34
2.2.2.4	Silberfärbung.....	34
2.2.2.5	Western Blot	34
2.2.2.6	Berechnung der IFR1 Proteinkonzentration in Erythrozyten	35
2.2.2.7	Far Western	36
2.2.2.8	Proteinsequenzierung mit MALDI-TOF Massenspektrometrie	36
2.2.2.9	Zweidimensionale IPG-Elektrophorese	37
2.2.2.10	Zweidimensionale Elektrophorese mit AUT-PAGE Acid-Urea-Triton X-100.....	40
2.2.3	Arbeiten mit Ribonucleinsäuren.....	42
2.2.3.1	Isolierung der Gesamt-RNA.....	42
2.2.3.2	Northern Blot.....	43
2.2.3.3	Reverse Transkription (cDNA Synthese)	44
2.2.3.4	Polymerasekettenreaktion („quantitative“ PCR)	45
2.2.3.5	PCR zur Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde.....	46
2.2.3.6	Chemischer Crosslink	47
2.2.3.7	UV Crosslink von Nukleinsäuren und IFR1	48
2.2.3.8	Silencing von mRNA mittels siRNA.....	49
2.2.4	Ultrazentrifugation.....	50
2.2.4.1	30% Saccharosekissen.....	50
2.2.4.2	Dichtegradientenzentrifugation mit Saccharose (kontinuierlichen Sacchrosegradienten)	50
2.2.4.3	Abweichende Saccharosegradienten für die Interaktionsstudien.....	51
2.2.4.4	Proteinfällung mit Aceton	52
2.2.4.5	Saccharosekonzentrationsbestimmung mit dem Refraktometer	52
2.2.4.6	Sequenzierung von DNA.....	53
2.2.5	Software und Internetdienste.....	53
2.2.6	Statistik	53
3	Ergebnisse	54
3.1	Regulation von IFR1 und TOB in Abhängigkeit vom Entwicklungstag	54
3.1.1	Expression von IFR1 und TOB in primitiven und frühen definitiven Erythrozyten	54
3.1.2	Noradrenalin induziert IFR1 und TOB in Tag 11 Erythrozyten.....	56
3.1.3	Der Einfluss des Proteasomen-Inhibitors MG132 auf IFR1 und TOB in Tag 11 Erythrozyten.....	57
3.1.4	Expression von IFR1 und TOB in definitiven Erythrozyten 17 bis 19 Tage alter Hühnerembryos	59

3.1.5	Untersuchung der Stabilität von IFR1 und TOB in Tag 11 und Tag 17 Erythrozyten	60
3.1.6	Intrazelluläre Verteilung von IFR1 und TOB in Tag 11 und Tag 17 Erythrozyten.	63
3.1.7	Konzentrationsbestimmung von IFR1 Protein in Tag 11 Erythrozyten	65
3.2	Silencing von IFR1 in Tag 14 Erythrozyten	66
3.3	Interaktionsstudien von IFR1 und TOB mit Polysomen	69
3.3.1	IFR1 Expression in Ganzzell-Lysat und Hämolsat von Erythrozyten verschiedener Entwicklungstage	69
3.3.2	Saccharosegradientenzentrifugation mit Hämolsat.....	70
3.3.3	IFR1 Akkumulation im Polysomenpellet.....	72
3.3.4	Polysomenpräparation mit einem kontinuierlichen Saccharosegradienten	73
3.3.4.1	Kontroll-Gradient.....	74
3.3.4.2	0,5 M KCl-Gradient	74
3.3.4.3	0,9 M KCl-Gradient	76
3.3.4.4	EDTA-Gradient	77
3.3.4.5	RNaseA-Gradient	78
3.3.4.6	20 mM EDTA und 100 ng/ μ l RNaseA	79
3.4	Crosslink	80
3.4.1	Chemischer Crosslink mit dem Imidoester DMP (Dimethyl Pimelimidat•2HCl) ...	80
3.4.2	Chemischer Crosslink mit Hilfe von NHS Estern.....	81
3.4.3	UV-Crosslink von RNA und Proteinen.....	83
3.4.3.1	Quantitativer UV-Crosslink.....	83
3.4.3.2	Qualitativer UV-Crosslink	84
3.5	Identifizierung potentieller Bindungspartner von IFR1 mit Far Western Blots von IEF- 2D- und AUT-Gelelektrophorese und MALDI-TOF	87
3.5.1	Identifizierung von IFR1-Wechselwirkungen durch Far Western Blots	87
3.5.1.1	Far Western Blot der 2D-Gele nach der IEF	87
3.5.1.2	Far Western Blot der 2D-Gele nach der AUT-Elektrophorese	88
3.5.2	Identifizierung von potentiellen Bindungspartner von IFR1.....	89
3.5.2.1	MALDI-TOF der Proteine aus den IEF-2D Gelen	89
3.5.2.2	MALDI-TOF der Proteine aus den AUT-2D Gelen	90
3.5.2.3	Sequenzvergleiche der IFR1 Bindungspartner	91
4	Diskussion	92
4.1	Die erythroide IFR1 und TOB Expression ist abhängig vom Entwicklungsstadium ..	92
4.1.1	Primitive Erythrozyten.....	92
4.1.2	Definitive Erythrozyten.....	94
4.1.3	Späte definitive Erythrozyten.....	95
4.2	Mögliche Funktionen der induzierten Proteine	96
4.3	Stabilität von TOB und IFR1	97
4.4	TOB ist im Zytosol lokalisiert, IFR1 wandert vom Zytosol in den Kern.....	98
4.5	Knock-down der Genexpression von ifr1 in definitiven Erythrozyten	100
4.6	IFR1 ist in definitiven Erythrozyten mit Ribosomen assoziiert.....	101

4.7	Potentielle Bindungspartner von IFR1	102
4.7.1	Intermolekulare Wechselwirkungen von IFR1 mit Proteinen	102
4.7.2	Kovalente Bindung von IFR1 an RNA durch RNA Bindeproteine	103
4.7.3	Identifizierung von IFR1-Bindungspartnern mit Hilfe des Far Western Blots	104
4.7.4	Ribosomale Proteine als Bindungspartner von IFR1	106
4.8	Ein mögliches Modell der Funktion von IFR1 und TOB.....	108
4.9	Ausblick.....	111
5	Zusammenfassung.....	112
6	Literaturverzeichnis	113
7	Anhang	121
7.1	Abkürzungsverzeichnis	121
7.2	Aminosäuresequenzen von TOB und IFR1	123
7.3	Abbildungsverzeichnis	125
7.4	Tabellen	127
7.5	Eigene Veröffentlichung.....	120
7.6	Danksagung.....	128
7.7	Erklärung.....	129

1 Einleitung

1.1 Der Hühnerembryo als Forschungsobjekt

Der Embryo des Haushuhns *gallus gallus domesticus* dient schon seit über 2000 Jahren als Modell für entwicklungsbiologische Studien. Neben den alten Ägyptern öffnete auch Aristoteles die Eier von Hühnern zu verschiedenen Zeitpunkten um den Fortschritt der Entwicklung des Embryos zu untersuchen [Stern, 2005]. 1628 entdeckte Harvey im Hühnerembryo die Blutinseln und den Unterschied zwischen Arterien und Venen [Stern, 2005]. Mit Transplantations-Experimenten konnten die *zone of polarizing activity* (ZPA) und die *apical ectodermal ridge* (AER) als wichtige Regionen für die Entwicklung der Extremitäten definiert werden [Saunders, 1948; Zwilling, 1956; Tickle, 2004]. Die Blutbildung in der frühen Embryonalentwicklung des Huhns wurde erstmals 1960 von Romanoff beschrieben.

Nachdem 2004 das Hühnergenom vollständig sequenziert wurde, [Wong, 2004], wurde die Suche nach neuen Mitgliedern von Genfamilien, die in der Entwicklung wichtig sind, ermöglicht.

Durch die Einführung von neuen Methoden für *gain- and loss-of-function-* sowie Promotoranalysen, der Isolierung von embryonalen Stammzellen und der Entwicklung von neuen transgenen Methoden [Stern, 2005] zählt das Haushuhn neben dem Fadenwurm *C. elegans*, der Taufliege *D. melanogaster*, dem Zebrabärbling *D. rerio* und der Maus *M. musculus* auch heute zu einem der wichtigsten Modellorganismen. Bei allen wird die Organbildung durch ähnliche Gene und Zellbewegungen wie bei Säugetieren gesteuert [Gilbert, 2003].

Die Vorteile des Hühnerembryos liegen in der ganzjährigen Verfügbarkeit, der kurzen Generationszeit von 21 Tagen und im leichten Zugang zu dem sich entwickelnden Embryo. Durch die einfache Bebrütung und Handhabung des fast in sich abgeschlossenen Systems „Hühnerei“, können Inkubationsbedingungen, wie die Sauerstoffkonzentration und die Temperatur, leicht gesteuert werden. In unserer Arbeitsgruppe dienen die aus dem Hühnerembryo gewonnenen Erythrozyten schon lange als Modell um Fragen zur Physiologie und Differenzierung der Erythrozyten aufzuklären. In dieser Arbeit wird vor allem die Entwicklung der Differenzierung von embryonalen Erythrozyten untersucht.

1.2 Die Erythropoiese

Als Erythropoiese bezeichnet man die Bildung von reifen Erythrozyten aus hämatopoietischen Stammzellen des blutbildenden Knochenmarks. Sie teilt sich bei allen Vertebraten in zwei unterschiedliche Phasen ein: Die nur in der Embryonalentwicklung ablaufende primitive Erythropoiese und die lebenslang ablaufende definitive Erythropoiese.

Die primitive Erythropoiese läuft außerhalb des Wirbeltierembryos ab, d.h. im Inneren der „Blutinseln“, die erstmals etwa 15 Stunden nach der Befruchtung in der *Area opaca* aus mesodermalen Zellen entstehen. Während sich die äußeren Zellen der Inseln zu Endothelzellen entwickeln, entstehen im Inneren embryonale Blutzellen. Im weiteren Verlauf der Entwicklung bilden die Endothelzellen das embryonale Gefäßsystem und die inneren Zellen bringen primitive Erythrozyten hervor. Diese werden als unreife Vorläuferzellen, den Erythroblasten, in den Blutkreislauf entlassen. Dort vollziehen sie eine Reihe von Teilungen, bis sie schließlich ihre Differenzierung abgeschlossen haben [Baumann und Dragon 2005]. Ein ausdifferenzierter Erythrozyt von Wirbeltieren führt keine Transkription und Translation mehr aus und seine Ribosomen und Mitochondrien sind abgebaut.

1.2.1 Stadien der Erythropoiese

Ausgehend von einer kleinen Population pluripotenter hämatopoietischer Stammzellen (HSZ) entwickeln sich alle ausgereiften Blutzellen (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten) des peripheren Blutes (siehe Abbildung 1.1). Die Differenzierung der Erythropoiese beginnt auf der Ebene der colony-forming-unit granulocyte, erythrocyte, monocyte, macrophage (CFU-GEMM). Aus diesen unreifen Vorläuferzellen differenzieren sich die weiteren koloniebildenden Zellen der erythroiden Zellreihe, die *burst-forming-unit erythroid* (BFU-E), die in der Zellkultur größere Konglomerate (*bursts*) von mehreren hundert Zellen bilden. Nach einigen Tagen zerfallen die *bursts* in Kolonien, die aus den nun reiferen *colony-forming-unit erythroid* (CFU-E) bestehen. In Tabelle 1.1 sind die nachfolgenden Blutzellen zusammengefasst, die sich unter weiterer Stimulation, erst durch Teilung und dann durch Reifung, bilden.

Tabelle 1.1: Proliferationsfähigkeit und Färbungsverhalten von Säugerblutzellen in verschiedenen Reifungsstadien.

Raues Endoplasmatisches Retikulum (rER), Hämoglobin (Hb)

Blutzellen (Größe)	Proliferationsfähigkeit und Eigenschaften	Zellorganellen	Färbung des Zytoplasma
Proerythroblast (15-20µm)	gering, Synthese von Häm und Globinketten	unkondensiertes Chromatin, relativ großer Nukleus, viele Ribosomen	basophil
Basophiler Erythroblast (~15µm)	gering, geringer Hb-Gehalt	Chromatin kondensiert, viele Ribosomen	basophil
Polychromatischer Erythroblast (~12µm)	gering, zunehmender Hb-Gehalt	Nukleus zunehmend pyknotisch, rER nimmt ab	basophil und azidophil
Orthochromatischer Erythroblast (~9µm)	keine Teilungsfähigkeit fast vollständiger Hb-Gehalt, geringer RNA-Gehalt	Nukleus pyknotisch, wird ausgestoßen; fast kein rER	eosinophil
Retikulozyt (~8µm)	aktiver Übertritt ins periphere Blut	kein Nukleus, wenige Ribosomen	rot mit blauem Retikulum
Erythrozyt (~7µm)	vollständiger Hb-Gehalt	kein Nukleus, keine Zellorganellen	rot

Bei Säugern sind Retikulozyten die ersten Zellen in der Blutzirkulation. Die Anzahl der Retikulozyten im peripheren Blut beträgt 0,5 – 1,6 %. Der reife, voll ausdifferenzierte Erythrozyt ist bikonkav und besitzt keinen Nukleus und keine Mitochondrien oder Ribosomen. Im Gegensatz dazu behalten die Erythrozyten von adulten Vögeln und Amphibien ihren inaktiven, pyknotischen Kern.

1.2.2 Regulation der Erythropoiese

Die Regulation der Erythropoiese und die damit verbundene Differenzierung der Zellen unterliegt einer Vielzahl von externen Signalen, sowie den intrazellulären Transkriptionsfaktoren und hämatopoietischen Wachstumsfaktoren (siehe Abbildung 1.1).

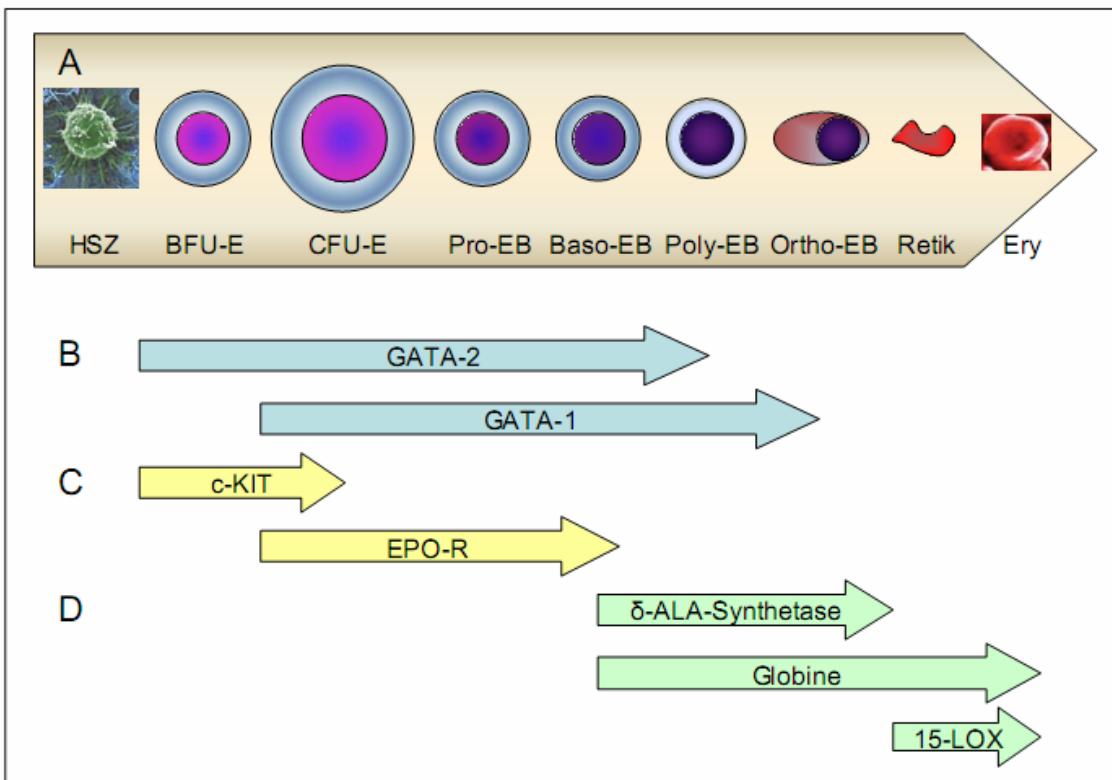


Abbildung 1.1: Relative Größe und morphologisches Aussehen von erythroiden Zellen der Wirbeltiere in unterschiedlichen Differenzierungsstadien.

Pluripotente hämatopoietische Stammzelle (HSZ), Burst-forming unit-erythroid (BFU-E), Colony-forming unit-erythroid (CFU-E), Proerythroblasten (Pro-EB), basophile Erythroblasten (Beso-EB), polychromatische Erythroblasten (Poly-EB), orthochromatische Erythroblasten (Ortho-EB), Retikulozyten (Retik), und Erythrozyten (Ery). (B) Transkriptionsfaktoren der Erythrozytendifferenzierung: Zinkfingerfaktoren die GATA Sequenzen binden (GATA-1, GATA-2) (C) Rezeptoren für hämatopoietische Wachstumsfaktoren: Stammzellfaktor-Rezeptor (c-KIT), Erythropoietin Rezeptor (EPO-R), (D) Erythrozyten Proteine: gezeigt sind die Expressions-Zeiträume von strukturellen und funktionellen erythroiden Proteinen; 15-Lipoxygenase (15-LOX). Die Stärke der Expression kann im angegebenen Zeitraum stark variieren. Modifiziert nach Koury, 2002].

Die hämatopoietischen Wachstumsfaktoren sind verantwortlich für die Aufrechterhaltung der hämatopoietischen Stammzellen sowie deren Proliferation und Differenzierung in die verschiedenen Zellreihen [Dexter, 1990; Heath, 1990; Ihle und Askew 1989].

Zu den Wachstumsfaktoren zählen:

1. Kolonie-Stimulierende Faktoren (CSF), Erythropoietin (EPO) und der Stammzellfaktor (SCF). Sie wirken auf die Vorläuferzellen der verschiedenen Zellreihen und steuern deren Proliferation und Differenzierung.
2. Interleukine IL-3, IL-6, IL-7, IL-1. Interleukine sind Proteine die von Leukozyten sezerniert werden. Sie sind an der Zell-Aktivierung, Zell-Proliferation, Zell-Differenzierung und an Zell-Zell-Interaktionen beteiligt.

Während der abschließenden Reifung der Retikulozyten zu Erythrozyten wird die erythroide Lipoxygenase 15-LOX exprimiert. Sie ist verantwortlich für die Degradation der Mitochondrien [Thiele, 1979; Schewe und Rapoport, 1981].

1.2.3 Transkriptionsfaktoren der Erythropoiese

Das Programm der Erythropoiese wird hauptsächlich durch die DNA-Bindenden Transkriptionsfaktoren GATA-2 und GATA-1 gesteuert [Shimizu und Yamamoto, 2007]. GATA-2 wird in hämatopoietischen und in embryonalen Stammzellen sowie in Endothelzellen exprimiert und ist damit für die Vermehrung wichtig und das Überleben von frühen hämatopoietischen Zellen auf Kosten der Differenzierung essentiell. [Shivdasani, 1996]. GATA-1 ist für die späte erythroide Differenzierung verantwortlich [Shivdasani, 1997].

Die Hauptkennzeichen der Erythrozytendifferenzierung ist die Synthese von großen Mengen des sauerstofftransportierenden Proteins Hämoglobin. Die Erythrozytendifferenzierung beinhaltet zum einen die koordinierte Regulation von zwei unterschiedlichen Globin-Genen (α und β) und der Bereitstellung von Häm. Wie in Abbildung 1.1 zu sehen, beginnt die Globin- und die Hämsynthese bereits in den basophilen Erythroblasten. Die primäre Kontrolle der Hämbiosynthese wird durch das Enzym δ -ALA-Synthetase ausgeübt. In Abbildung 1.1 ist zu erkennen, dass der Zeitraum der δ -ALA-Synthetase-Expression vor der Globin-Expression, im Stadium der Retikulozyten aufhört. Damit erliegt auch die Hämbiosynthese.

1.3 Modelle der Erythrozytendifferenzierung

Zur Erforschung der Differenzierung menschlicher erytroider Zellen gibt es kein *in vitro*-Modell, in dem die Stadien der Differenzierung durchgehend verfolgt werden können, da keine passenden Kulturbedingungen gefunden sind, die eine anhaltende Erneuerung von Vorläuferzellen und Erythropoiese gestatten [Marks, 1987]. Aus diesem Grund werden Zelllinien aus verschiedenen Spezies als Modelle für die erytroiden Zelldifferenzierung *in vitro* verwendet (siehe Tabelle 1.2).

Allerdings repräsentieren die genannten Zelllinien nur bestimmte Stadien der Erythropoiese und sind nicht für die Untersuchung der terminalen Differenzierung geeignet, da es sich dabei um Vorstufen der Erythrozyten handelt. Sie können daher allenfalls bedingt als Reifungsmodelle der erytroiden Zelldifferenzierung verwendet werden.

Tabelle 1.2: Übersicht der Modelle der erythroiden Zelldifferenzierung. Proerythroblasten (Pro-EB)

Zelllinie	Zellstadium	Induktor der Differenzierung	Organismus	Literatur
K562 (Leukämiezelllinie)	Kolonien ähnlich der BFU-E	Erythropoietin / Butyrat	Mensch	Gahmberg und Andersson, 1981
MEL (Erythroleukämiezelllinie)	CFU-E	Dimethylsulfoxid und Hexamethylenbis-acetamid	Maus	Orkin, 1978
HD3 (Hühnererythroblastenzelllinie)	Erythrozyten-ähnlich	Temperaturerhöhung, Hemin, Butyrat und pH	Huhn	Beug, 1982
FVA (Friendvirus-infizierte Pro-EB)	Proerythroblasten	Erythropoietin	Maus	Koury, 1984
Retikulozyten	Vorstufe der Erythrozyten	Phenylhydrazin <i>in vivo</i>	Kaninchen	Thiele, 1981

Im Gegensatz dazu bietet das System der Inkubation von embryonalen Hühnererythrozyten die Möglichkeit zu jedem Entwicklungstag einen direkten Bezug zwischen den Erythrozyten aller Stadien und den jeweils vorherrschenden, auch von außen veränderbaren, physiologischen Bedingungen herzustellen. Es zeigt sich immer mehr, dass es sich bei der Untersuchung der terminalen Differenzierung von Erythrozyten im Hühnerembryo um ein flexibles und kostengünstiges Modell handelt.

1.4 Entwicklung und Differenzierung der Erythrozyten im Hühnerembryo

In der frühen Embryonalentwicklung höherer Vertebraten gehören embryonale Erythrozyten zu den ersten Zelltypen, die eine lebenswichtige Funktion, den Transport von Atemgasen ausüben. Bereits 26 bis 38 Stunden nach Bebrütungsbeginn treten die ersten hämoglobinhaligen Zellen in den Blutinseln des Dottersacks auf [Burns und Ingram, 1973; Fucci, 1983], wobei Hämoglobin erstmals 24h nach der Eiablage nachgewiesen werden kann. Sie sind gekennzeichnet durch embryonale Hämoglobinarten, wie Hb P, P', M und E [Brown und Ingram, 1974] und sie werden als

unreife Erythroblasten in die Blutbahn entlassen. Die letzten mitotischen Teilungen und die terminale Differenzierung schließen sie in der Blutbahn ab.

Die primitiven Erythrozyten des Huhns sind rund und besitzen einen großen Kern, mit lockerer Chromatinstruktur. Das Zytoplasma der teilungsfähigen primitiven Erythrozyten ist basophil und es findet Transkription und Translation statt. An Tag 3 der Bebrütung ist der RNA- und ATP-Gehalt sehr hoch [Dragon, 2002]. Diese erste Generation von primitiven roten Blutzellen ist bis zum sechsten Entwicklungstag die vorherrschende Population in der Blutzirkulation [Bruns und Ingram, 1972] (siehe Abbildung 1.2 Tag 5).

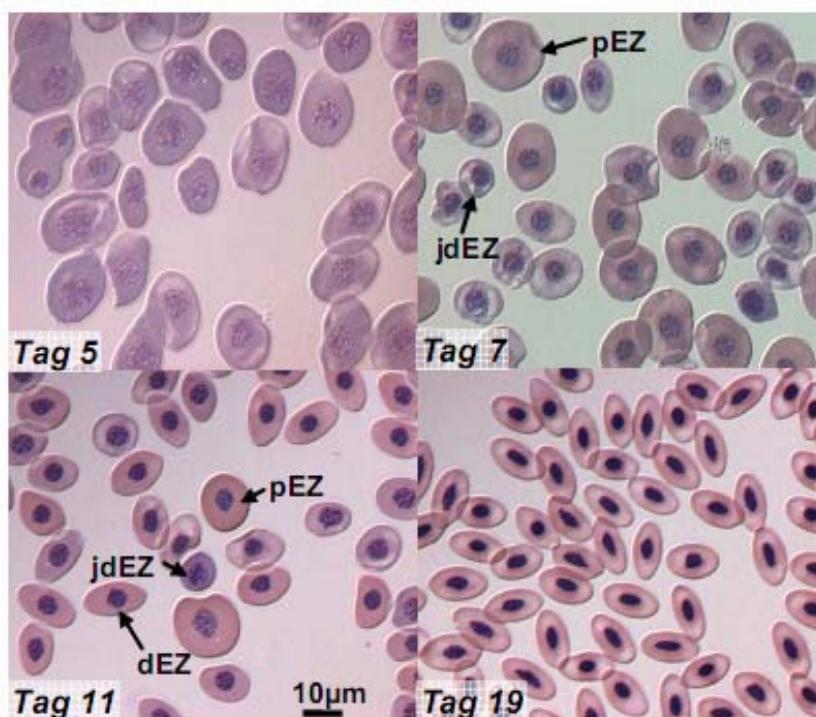


Abbildung 1.2 Übersicht der Differenzierung von Hühnererythrozyten.

Zu sehen sind Blutausstriche verschiedener Entwicklungsstadien (Tag 5 bis Tag 19) von Hühnererythrozyten: primitive Erythrozyten (pEZ), junge definitive Erythrozyten (jdEZ), definitive Erythrozyten (dEZ).

Die definitive Erythrozytenpopulation taucht ab dem sechsten Tag erstmals im Blut des Hühnerembryos auf (25-40% der gesamten Erythrozyten [Bruns und Ingram, 1972]. Die unreifen, postmitotischen und polychromatischen Zellen sind rund und der Zellkern kondensiert immer mehr (Abbildung 1.2, Tag 7). Sie reifen in der Blutzirkulation zu orthochromatischen Erythrozyten aus und besitzen weiterhin eine Translations- und Transkriptionsaktivität, welches ein Kennzeichen für nicht voll ausdifferenzierte Erythrozyten ist. Der RNA-Gehalt nimmt weiter ab, während der Hämoglobingehalt ansteigt.

Ab Tag 11 (Abbildung 1.2) bilden die eosinophilen, ausdifferenzierten definitiven Erythrozyten den Hauptanteil von 85% der Zellen in der Blutzirkulation. Ihre

Morphologie ist oval, mit einem runden Zellkern und sie sind etwas kleiner als die primitiven Erythrozyten.

Am 14. Entwicklungstag kann die erste Population unreifer, definitiver Erythrozyten, wegen ihrer kurzen Lebensdauer im Blutkreislauf nicht mehr nachgewiesen werden [Lemez, 1977].

Am Ende der zweiten Bebrütungswoche nehmen Transkription und Translation der embryonalen Erythrozyten langsam ab. Zwischen Tag 17 und 18 stellen reife, definitive Erythrozyten beides ein [Bruns und Ingram, 1973; Lasky und Tobin, 1979].

Gegen Ende der Entwicklung, zwischen Tag 16 und Tag 18, verlagert sich die gesamte Hämatopoiese vom Dottersack ins Knochenmark und in die Milz. [Romanoff, 1960; Dieterlen-Lievre, 1988].

Bis zu Tag 19 (Abbildung 1.2) steigt das Blutvolumen und damit wächst die Erythrozytenanzahl ständig. Die reifen, definitiven Erythrozyten entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen, und produzieren neben der vorübergehend auftretenden Hämoglobinart H auch die adulten Hämoglobinarten A und D [Burns und Ingram, 1973, Beaupain, 1985]. Was auf molekularer Ebene für den Populationswechsel der Erythrozyten verantwortlich ist, konnte noch nicht geklärt werden.

1.5 Regulation der erythroiden Pyrimidin-5'-Nucleotidase, der Carboanhydrase II und von 2,3-Bisphosphoglycerat

Bedingt durch die begrenzte Sauerstoffzufuhr durch die Eischale fällt ab dem 13. Tag der Embryonalentwicklung der O₂-Partialdruck immer mehr ab, d.h. es kommt zu einer progressiven, entwicklungsbedingten Hypoxie. Der hypoxische Stress führt zur Freisetzung von Noradrenalin (NoA) und Adenosin (A) ins Plasma [Dragon und Baumann, 2001]. Durch die Ausschüttung von Noradrenalin und Adenosin, den *first messenger*, werden die β-adrenergen Rezeptoren (β-R) und die Adenosin A₂ Rezeptoren (A₂R) der definitiven Erythrozyten angeregt. Die Stimulierung der Rezeptoren führt zu einer Aktivierung des G_s-Proteins (G). Es kommt zum Austausch von GDP durch GTP in der α-Untereinheit des G-Proteins. Die so freigesetzte α-Untereinheit löst sich von der β- und γ-Untereinheit und wirkt als Effektor der Adenylatcyclase (AC), die ATP zu cAMP umsetzt. Das als *second messenger* bezeichnete cAMP kann z.B. die Proteinkinase A (PKA) durch Abspaltung des regulatorischen Proteins (rP) aktivieren, die wiederum je nach Zelltyp unterschiedliche Enzyme und Transkriptionsfaktoren über eine Phosphorylierung aktivieren kann. Als

Beispiel ist in Abbildung 1.3 die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB gezeigt. Dies steht in Zusammenhang mit der Vermutung von Mass et al. die 2003 zeigen konnten, dass die Expression der Pyrimidin-5'-Nukleotidase in definitiven Erythrozyten durch eine Aktivierung der Transkription über die PKA-abhängige Phosphorylierung von CREB-Proteinen abläuft.

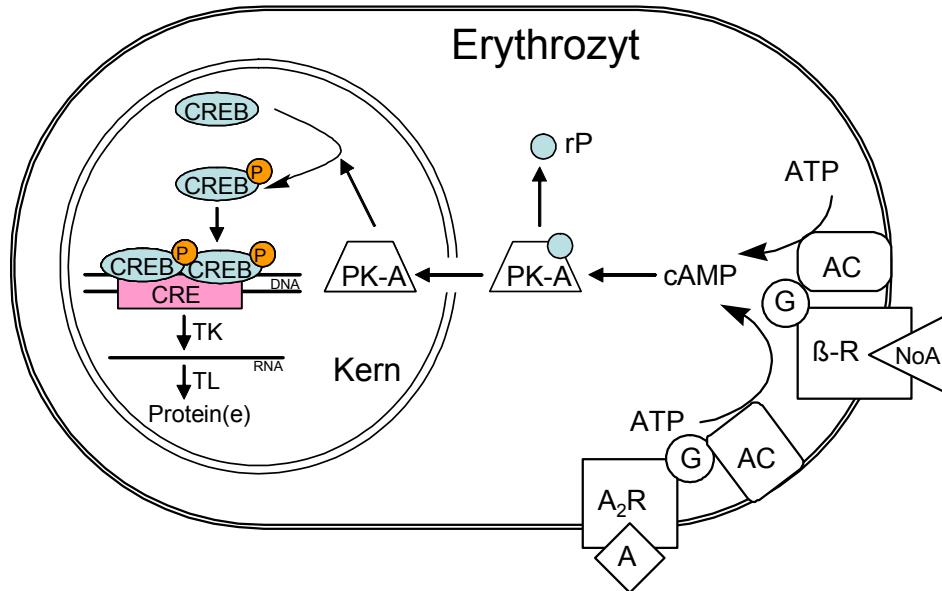


Abbildung 1.3 Modell der Signaltransduktion im Erythrozyten

Stimulierung des β -adrenergen (β -R) und des Adenosin A₂-Rezeptors (A₂R) mit Noradrenalin (NoA) und Adenosin (A), G-Protein (G), Proteinkinase-A (PK-A), regulatorisches Protein (rP), „cAMP-response element-binding“ Protein (CREB), „cAMP response element“-Sequenz (CRE), Phosphatgruppe (P), Transkription (TK), Translation (TL) [modifiziert nach Mass, 2003].

In definitiven Erythrozyten bewirkt das cAMP Signal eine gesteigerte Synthese von zellspezifischen Proteinen, wie der Carboanhydrase (CAII) und der Pyrimidin-5'-Nucleotidase (P5N), sowie des Hitzeschockproteins 70 (Hsp70). Zudem wurden eine Erhöhung von 2,3-Bisphosphoglycerat (2,3BPG) und ein Absinken der ATP-Konzentration gemessen.

Während der terminalen erythroiden Differenzierung treten Monophosphate und Mononukleotide als Produkte der RNA-Degradation und des Abbaus von ribosomaler RNA auf [Dragon und Baumann, 2001]. Die P5N katalysiert dabei die Dephosphorylierung der Pyrimidinmononukleotide, CMP und UMP, in ihre zugehörigen Nukleoside. Uridin und Cytosin können so in den Extrazellulärraum abgegeben werden und stehen somit in anderen Geweben zur Verfügung, was den Vorteil hat, dass eine kostspielige Neusynthese der Nukleotide vermieden wird [Dragon, 2003]. Dieses Enzym spielt auch bei der terminalen Reifung von humanen Erythrozyten eine wichtige Rolle, denn ein Mangel an P5N durch einen Enzymdefekt führt zu einer Form der

hämolytischen Anämie, bei der Pyrimidinnukleotide und ribosomale RNA in den Erythrozyten akkumulieren [Valentine, 1974; Paglia und Valentine, 1980].

Hsp70 spielt als Chaperon eine wichtige Rolle in der terminalen Differenzierung. Der Abbau der Zellorganellen erfordert eine Vielzahl von Neufaltungen der Proteine die von Hsp70 unterstützt werden [Dragon und Baumann, 2003].

In Abhängigkeit vom Entwicklungsalter der Erythrozyten ist die P5N-Aktivität *in vitro* in primitiven Erythrozyten von Tag 4 sehr hoch, in den späten primitiven (Tag 6) und den frühen definitiven (Tag 8) Erythrozyten werden die niedrigsten Konzentrationen gemessen, und erreicht ihr Maximum an Tag 16. Ab Tag 17 kommt es zu einem Abfall der P5N-Aktivität [Mass, 2003].

Die Genexpression von *p5n* folgt zeitlich verzögert dem Anstieg der Enzymaktivität. Eine Expression von *p5n* ist nur in den definitiven Erythrozyten, durch eine Stimulation des β -adrenergen-/Adenosin-Rezeptors induzierbar. Die primitiven Erythrozyten reagieren bei einer Stimulation mit cAMP nicht mit einer Erhöhung der Genexpression von *p5n* [Mass 2003]. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass die teilungsaktiven, primitiven Erythrozyten die Nukleotide für die DNA-Replikation benötigen.

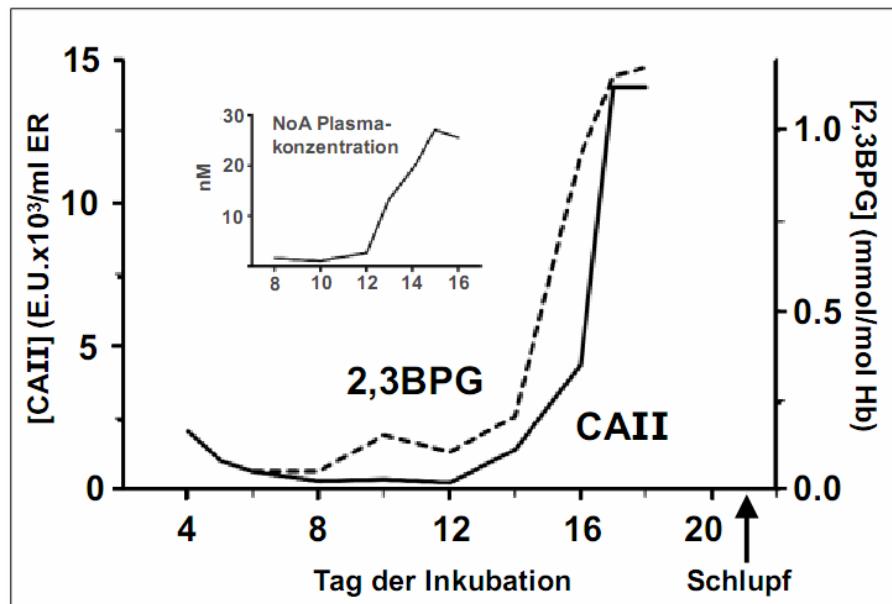


Abbildung 1.4 2,3-Bisphosphoglycerat (2,3BPG)- Konzentration und Carboanhydrase II (CAII)- Aktivität, sowie die Plasmakonzentration von Noradrenalin während der Hühnerembryo Entwicklung [aus Dragon und Baumann 2003]

In der späten Embryonalentwicklung (Zeitfenster Tag 11 bis Tag 19) kommt es zum Anstieg des Noradrenalins im Plasma (siehe kleine Abbildung in Abbildung 1.4) und in den definitiven Erythrozyten wird ein koordinierter Anstieg der CAII-Synthese und der

2,3BPG-Konzentration nachgewiesen (siehe Abbildung 1.4) [Dragon, 1996; Dragon, 2002]. CAII führt zu einer Erhöhung der Bindungsaffinität und damit zu einem verbesserten Transport von CO₂. Dies ist wichtig, da in der späteren Entwicklung des Hühnerembryos der pCO₂ steigt. Die Aktivierung der CAII Synthese hilft dabei die Ausdehnung der respiratorischen Azidose und die damit verbundenen negativen Effekte auf die Sauerstoffbeladung der Erythrozyten zu verringern [Koller, 1994]. 2,3BPG sorgt dafür, dass bei relativ reduzierter Sauerstoffaufnahme, mehr Sauerstoff abgegeben werden kann [Dragon, 1996].

1.6 Stimulation von *ifr1* und *tob* über den cAMP-Signalweg

Mit Hilfe einer cDNA Bank wurden 2002 von Dragon et al. drei Gene identifiziert, die sowohl in primitiven als auch in definitiven Erythrozyten des Hühnerembryos durch Noradrenalin induziert werden. Es handelt sich dabei um die zu den Säugern homologen *immediate early genes fos* (Protoonkogen, Transkriptionsfaktor), *tob* (transducer of erbB2) und *ifr1* (Interferon-related protein 1). Diese Gene sind in vielen zellulären Systemen bekannt als Regulatoren der Proliferation und Differenzierung, und ihr Studium kann damit Anhaltspunkte für die Funktion und Aufgabe in der späten Differenzierung der Erythrozyten im Hühnerembryo geben [Vietor, 2007; Dragon, 2002].

Während der Differenzierung der Erythrozyten im Hühnerembryo konnte gezeigt werden, dass *ifr1*, *tob* und *fos* kurzzeitig hoch reguliert werden. Parallel dazu laufen andere cAMP-abhängige Prozesse, wie die CAII-, 2,3BPG- und P5N-Synthese und ATP-Abbau ab, welche charakteristisch für die späte erythroide Differenzierung sind [Dragon, 2002].

1.6.1 Das antiproliferative Protein TOB

Über die Stimulation mit Noradrenalin *in vitro* wird auch die Genexpression von *tob* in primitiven und definitiven Erythrozyten induziert [Dragon, 2002]. Das 36,0 kDa große TOB ist identisch mit TIS21 (TPA induced sequence 21) und PC3, und wurde zusammen mit IFR1 (TIS7, PC4 (siehe 1.6.2) als *immediate early-response gene* in Swiss 3T3 Fibroblasten [Varnum, 1989] und in PC12 Zellen [Tirone, 1989] entdeckt. Die Transkripte und Proteine der *immediate early-response genes* werden sehr schnell nach ihrer Stimulierung mit z.B. Wachstumsfaktoren wie nerve growth factor (NGF) oder der Behandlung mit Phorbol Ester detektierbar [Fletcher, 1991; Bradbury, 1991].

TOB gehört zu einer großen APRO (*antiproliferative*) Proteinfamilie, welche die Proliferation von Zelllinien blockiert, wenn diese überexprimiert werden [Jia und Meng, 2007]. Als Bindungspartner von TOB wurden die folgenden Proteine gefunden:

- erb2, SMAD1,2,4,5,8 [Jia und Meng, 2007] - Rezeptor-gebundene Zellzyklus Kontrolle
- CAF1 [Ikematsu, 1999; Temme, 2004] - mRNA Metabolismus
- PABP und iPABP [Albrecht, 2004; Okochi, 2005] - zytoplasmatische Poly(A) bindende Proteine

Außerdem konnte gezeigt werden, dass TOB ein PABP-abhängiger positiver Regulator [Ezzeddine, 2007] und allgemeiner Aktivator der zytoplasmatischen mRNA-Deadenylierung ist [Mauxion, 2008]. Die *tob Knock-out* Maus weist acht Wochen nach der Geburt 30% mehr Knochenmasse auf und die erwachsenen Tiere entwickeln eine erhöhte Neigung zu Krebs [Yoshida, 2000, 2003].

Durch einen Aminosäure-Sequenzvergleich (siehe Anhang), konnte eine hohe Homologie (bis zu 94%) von TOB in unterschiedlichen Organismen, wie dem Huhn, der Maus und dem Menschen, gefunden werden [Dragon, 2002].

1.6.2 IFR1 als Regulator in der Differenzierung

Auch IFR1 (48,8 kDa) ist in die Differenzierung verschiedener Zelltypen wie epithelialen Zellen, Myoblasten, Neuronen oder hämatopoietischen Zellen involviert [Vietor und Huber, 2007].

In Analogie zu TOB konnte auch bei IFR1 eine hohe Homologie des Proteins (bis zu 93%) in unterschiedlichen Organismen festgestellt werden [Dragon, 2002]. Über das Programm „Prosite motif search“ wurden unter anderem mögliche Phosphorylierungsstellen für die cAMP-abhängige PKA, Proteinkinase C (PKC), Caseinkinase II (CK II) und eine Prolin-Glutaminsäure-Serin-Threonin (PEST)- Sequenz gefunden.

Studien haben ergeben, dass die Regulation und Funktion von IFR1 in verschiedenen Zelltypen (siehe Tabelle 1.3) durch eine Vielzahl von Mitogenen induziert werden kann: So reagieren PC12 Zellen auf den *nerve growth factor* (NGF) mit der Transkription von IFR1, zusammen mit TOB und FOS [Tirone und Shooter, 1989]. In der Swiss 3T3 Fibroblastenzelllinie wird IFR1 durch TPA und Serum, sowie EGF und FGF induziert [Lim, 1987; Varnum, 1994]. Dabei scheint IFR1 immer eine Funktion als Regulator der Differenzierung von Nerven, Muskeln, Zellen oder von hämatopoietischen Vorläuferzellen einzunehmen. Es könnte also sein, dass die IFR1-Expression durch die verschiedensten Liganden und auf den unterschiedlichsten Signalwegen reguliert werden kann [Vietor und Huber, 2007].

Tabelle 1.3 Regulation/Induktion und Funktion von IFR1 in verschiedenen Zelllinien

Zelllinie	Modell für:	Regulation/Induktion durch:	Funktion	Literatur
Chromaffine Zelllinie PC12 (Ratte) (Pheochromacytoma)	Nerven	NGF	Regulator der neuronalen Differenzierung	Kujubu, 1987; Tirone und Shooter, 1989; Arenander, 1989
Swiss3T3 (Maus)	Fibroblasten	Tetradecanoyl-Phorbolester (TPA) und Serum, sowie EGF, FGF	Zellproliferation und -differenzierung	Lim, 1987; Varnum, 1994
C2C12 (Maus)	Muskel	antisense-IFR1 blockiert myozytenspezifische Expression von Myogenin und Myosin	positiver Regulator während der Muskeldifferenzierung	Guardavaccaro, 1995
IEC-17, IEC-18, Caco-2 (Mensch)	Epithel	EGF	Erhöhung der IFR1 mRNA	Rubin, 1998
Brustdrüsenzelllinie c-JunER (Maus)	Krebs	Östrogen	Korepressor der Transkription; Interaktion mit HDAC1	Vietor, 2002
32DC13 (G) (Maus)	Hämato-poiese	G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor)	Myeloide Differenzierung	Kreider und Rovera, 1992

Die genaue Funktion des IFR1 Proteins ist noch nicht aufgeklärt, bisher ist allerdings bekannt, dass *in vivo* die IFR1-Expression in Differenzierungsprozessen [Varnum, 1989], Proliferationsereignissen [Rubin, 1998], Stresssituationen [Iacopetti, 1996; Dragon, 2001] und Regenerationsprozessen [Roth, 2003] induziert wird. Von Vietor et al. konnte 2005 gezeigt werden, dass IFR1 als Transkriptions-Repressor einer Reihe von Genen agiert, aber die Funktionsweise ist noch nicht vollständig geklärt. So deuten Studien mit der Myoblast Zelllinie C2C12 und *tis7 Knock-out* Mäusen an, dass IFR1 für die muskelspezifischen Proteinexpression benötigt sein könnte [Guardavaccaro, 1995; Vadivelu, 2004].

Obwohl IFR1 als zytosolisches Protein beschrieben wurde, konnte bisher nur eine Funktion im Zellkern identifiziert werden. Dort dient es als transkriptioneller Ko-

Repressor der Transkription, der mit dem Histondeacetylasekomplex interagiert [Vietor, 2002]. In unreifen Hühnererythrozyten konnte gezeigt werden, dass die Histondeacetylase ein Bestandteil der inneren Kernmatrix ist [Hendzel, 1991] und nicht nur Histone, sondern auch Proteine acetyliert und ihre Aktivität damit direkt kontrolliert werden können [Yoshida, 2003]. Darüber hinaus wurde in Hefe eine Acetyltransferase entdeckt, die mit dem Ribosom verbunden ist und mit der wachsenden Polypeptidkette interagiert [Gautschi, 2003]. In Säugergewebe kommt die höchste mRNA Expression von IFR1 Homologen interessanterweise in der fetalen Leber [Buanne, 1998] vor, die bekannt ist als Erythropoieseort, sowie im Blut [Su, 2002]. Das Auftauchen von IFR1 in sehr differenzierten, postmitotischen Zellen lässt eine wichtige Rolle von IFR1 in der terminalen Differenzierung erythroider Zellen vermuten.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Unsere Arbeitsgruppe konnte anhand des Modells von embryonalen Hühnererythrozyten in vorangegangenen Versuchen die cAMP-abhängige Regulierung von CAII, P5N und 2,3BPG in den unterschiedlichen Stadien der Erythrozyten klären. Zudem konnte gezeigt werden, dass die *ifr1*, *tob* und *fos* mRNA, sowie das FOS Protein in primitiven Erythrozyten mit NoA induziert werden können [Dragon, 2002].

Zum heutigen Zeitpunkt ist über die Proteinexpression, den Abbau von mRNA oder Ribosomen während der terminalen Erythrozytendifferenzierung noch sehr wenig bekannt. Mit Hilfe des Hühnererythrozyten-Modells kann zur Aufklärung der Zusammenhänge zwischen der Differenzierung und der Funktion der cAMP-abhängigen Regulation der gefundenen Proteine IFR1 und TOB beitragen werden.

Fragestellungen dieser Arbeit sind:

- die cAMP-induzierte Expression von IFR1 und TOB in Abhängigkeit vom Entwicklungstag
- Kann die *ifr1/tob*- Genexpression in definitiven Erythrozyten mit NoA induziert werden?
- Kann die Proteinexpression von IFR1 und TOB in primitiven und definitiven Erythrozyten mit NoA induziert werden?
- Untersuchungen zur Stabilität und der intrazellulären Verteilung der beiden Proteine in definitiven Erythrozyten
- Funktioneller Nachweis der *ifr1* mRNA und des dazugehörigen, kodierenden Gens durch Experimente mit RNA interference (RNAi) Technik
- Auffinden und Identifikation von potentiellen Bindungspartnern von IFR1 und TOB
- Ableitung einer Funktion für IFR1 und TOB in den sich differenzierenden Erythrozyten

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Abbé Refraktometer	Zeiss, Jena
Autoklav Typ Tuttnauer 2540 EK	Systec, Wettenberg
Brutschrank mit Wendearmatik	Grumbach, Wetzlar
Capilettor (1-5µl, 5-25µl, 10-50µl)	Selzer GmbH, Waghäusel
Computer	Inspiron 8600, Dell, Frankfurt am Main
Crosslinker	Stradagene, Cedar Creek USA; Modell Stardalinker 1800
Elektrophoresekammern: Protean II, Mini-Protean II	Bio-Rad, München
Gefrierschrank	Privileg, Quelle Fürth
Halbmikroküvetten aus OS/QS	Hellma, Müllheim/Baden
Heizblöcke: Thermomixer 5437 Blockthermostat BT 100	Eppendorf, Hamburg Kleinfeld, Gehrden
Homogenisator	Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, Staufen
Hybridisierungsofen Typ OV4	Biometra, Göttingen
Kamera AxioCam MRm	Zeiss, Jena
Kühlschranke	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlzentrifugen: Typ GS-15R Typ RC 5C Plus	Beckman, München Sorvall (Du Pont), Bad Homburg
Magnetrührer MR 80	Heidolph, Schwabach
Mikroskop AxioStar plus	Zeiss, Jena
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 Power Supply 2103	Bio-Rad, München LKB, München
pH-Elektrode Typ 102-M6-S7	Ingold Messtechnik, Steinbach
pH-Meter Typ 763 multicalimatic	Knick, Berlin
Photometer Typ DU-64	Beckman, München
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Pipettierhilfe, Typ accuboy	Tecnomara, Fernwald
Schüttelinkubator Innova 4000	New Brunswick Scientific, Nürtingen
SpeedVac-Konzentrator SVC 100H	Savant, Hicksville

Thermocycler Genius	Thermo-Dux, Wertheim/Main
Thermocycler Techne Genius	Biostep (vorher Techne), Jahnsdorf
Tischvortex Modell Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Tischzentrifugen:	
EBA III	Hettich, Tuttlingen
Typ 5412	Eppendorf, Hamburg
Biofuge Pico	Heraeus, Hanau
Biofuge haemo	Heraeus, Hanau
Transferzelle für Western-Blot:	
Trans-Blot SD Semi-Dry	Bio-Rad, München
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
Ultra-low-freezer -86°C Thermo Scientific Revco Ultima II	Kendro Laboratory Products, Langenselbold
UV-Crosslinker Fluo	Link Vilber Lourmat, Marne la Vallee, Frankreich
UV-Schirm Faust N 90	Konrad Benda, Wiesloch
UV-Vis Spektrophotometer Varian Cary 50 Bio	Varian, Darmstadt
Vakuumölpumpe	Pfeiffer Vakuumtechnik, Wetzlar
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wärmeschrank	Heraeus, Hanau
Wasserbad mit Thermostat Typ PC/4	Julabo, Seelbach
Wasserbadlängsschüttler Typ 1083	GFL, Burgwedel
Wipptisch/Kippschüttler	Biometra, München

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Auslaufpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
BioSpin Disposable Chromatography Columns - sterilized	BioRad, München
Deckgläschen	Labonord, Mönchengladbach
Filter	Schleicher & Schuell, Dassel
Glaswaren	Roth, Karlsruhe
Handschuhe	Schott, Mainz
Microcon YM-30 Mikrokonzentratoren	Hartmann, Heidenheim
Centrifugal Filter Units	Millipore, Schwalbach
Objektträger	
Parafilm	Superfrost Plus Menzel-Gläser, Braunschweig
Pipettenspitzen mit und ohne Filter	American National Can, Greenwich, USA
Polyallomer Ultrazentrifugen Röhrchen 14 x 95 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Porablot NY plus (0,45µm; positiviert)	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäß	Beckman, USA
Reaktionsgefäß	Macherey-Nagel, Düren
	Eppendorf 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml
	Sarstedt, Nümbrecht
	Falcon 15 ml, 50 ml Sarstedt,

Skalpellklingen	Nümbrecht
Sterilfilter CN Filter 50mm	Feather, Köln
Durchmesser/0,2 µm Porengröße	Nalgene über VWR, Ismaning
TransBlot Nitrocellulose Membran (0,45 µm)	BioRad, München

2.1.3 Chemikalien, Enzyme, Kits

Produkt	Hersteller
Agarose LE Seakem	Cambrex Bio Science, USA
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
Bis(sulfosuccinimidyl)suberate BS3	Perbio Science (Pierce), Bonn
CHAPS	GE Healthcare, München
DOTAP	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DMP (Dimethyl Pimelimadate x 2HCl)	Perbio Science (Pierce), Bonn
DSS (Disuccinimidyl Suberat)	Perbio Science (Pierce), Bonn
DTT	GE Healthcare, München
DMRIE-C	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ham's Medium F-10 (Seromed)	Biochrom, Berlin
IPG pH 3-1 (nicht linear)	GE Healthcare, München
Liquemin (Heparin-Natrium)	Roche, Mannheim
MG132	Tocris Bioscience, USA
M-MLV Reverse Transkriptase RNase H minus Point Mutant	Promega, Mannheim
PANScript DNA Polymerase	PAN-Biotech, Aidenbach
PeqGold dNTP-Set 'Long Range'	peqLab, Erlangen
PeqGold RNase A (20 mg/ml)	peqLab, Erlangen
PeqGold TriFast FL Reagenz	peqLab, Erlangen
Pharmalyte 3-11	GE Healthcare, München
Protein A Agarose Fast Flow	(Millipore) Upstate, USA
Random Hexamer Oligos 50 pmol/µl	GE Healthcare, München
RotiQuant	Carl Roth, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase	Promega, Mannheim
ECL advanced detection system	GE Healthcare, München
Anti-Digoxigenin-AP	Roche, Mannheim
Blockierungsreagenz	
CDP-Star	
Dig Easy Hyb	
Digoxigenin-11-dUTP	

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

2.1.4 Puffer, Medien und Lösungen

2.1.4.1 Stammlösungen

EDTA	0,5 M pH 8,0
DTT	2 mM in H ₂ O
Cycloheximid	100mg/ml in DMSO (50mM)
RNaseA	10 mg/ml
PMSF	200 mM in Isopropanol
Aprotinin	10 mg/ml in 10 mM HEPES pH 8,0
Ethidiumbromid	10 mg/ml
BSA (Albumin)	400 µg/ml in H ₂ O
MG 132	10 mM in DMSO (ce=10µM, d.h. 1µl je ml)

2.1.4.2 Erythrozyten

Waschpuffer

Tris-Base	50 mM
NaCl	120 mM
KCl	4 mM
CaCl ₂ x 2H ₂ O	1,5 mM
Glucose	5 mM

F10 Inkubationsmedium

Ham's F10 Medium	pH 7,4 bei 37 °C
Mit Zusatz von: Hepes-NaOH	20 mM

Noradrenalin

10 mM in F10 frisch angesetzt

Transformationslösung

NaHCO ₃	1 g/l
K ₃ [Fe(CN) ₆]	200 mg/l
KCN	50 mg/l

PBS Puffer

NaCl	136 mM
KCl	3 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	10 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM

TMK Lysepuffer	pH 7,4 bei RT, steril filtriert
Tris, pH 7,4	10 mM
MgCl ₂ x 6H ₂ O	5 mM
KCl	100 mM
Triton X-100	1 %
DTT	2 mM (frisch zugeben)

Hepes-TMK Lysepuffer	pH 7,4 bei RT, steril filtriert
Hepes	10 mM
MgCl ₂ x 6H ₂ O	5 mM
KCl	100 mM
Triton X	1 %
DTT	2 mM (frisch zugeben)
PMSF	1 mM (frisch zugeben)
Cycloheximid	100 µg/µl (frisch zugegeben)

2.1.4.3 siRNA Puffer und verwendete Liposomen

5 x siMAX Puffer	pH 7,3 bei RT, steril filtriert
HEPES	30 mM
KCl	100 mM
MgCl ₂	1 mM

Folgende Liposomen (Hersteller siehe 2.1.3) wurden verwendet: DOTAP, Gene Silencer, Lipofectamine, DMRIE-C

2.1.4.4 Ribosomenpellets

Gradientenpuffer	pH 7,4 bei RT
Hepes-KOH	20 mM
KCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM
DTT	2 mM (frisch zugeben)

30% Saccharosekissen (w/w)

Saccharose	30 g
Gradientenpuffer	70 g
DTT	2 mM (frisch zugeben)

10%ige Sachharoselösung (w/w)

Saccharose	10 g
Gradientenpuffer	90 g
DTT	2 mM (frisch zugeben)

20%ige Sachharoselösung (w/w)

Saccharose	20 g
Gradientenpuffer	80 g
DTT	2 mM (frisch zugeben)

35%ige Sachharoselösung (w/w)

Saccharose	35 g
Gradientenpuffer	65 g
DTT	2 mM (frisch zugeben)

Puffer A

pH 7,4 bei RT

Saccharose	250 mM
KCl	25 mM
MgCl ₂	5 mM
Tris-HCl	50 mM

2.1.4.5 SDS-PAGE

SDS Probenpuffer	1 x	2 x	3 x
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	38,3 mM	76,6 mM	115 mM
NaHPO ₄	24,4 mM	48,8 mM	73,2 mM
Glycerin (v/v)	10 %	20 %	30 %
SDS (v/v)	2 %	4 %	6 %
β-Mercaptoethanol(v/v)	0,5 %	1 %	1,5 %
Bromphenolblau(w/v)	0,001 %	0,002 %	0,003 %

SDS-Laupuffer

pH 8,3 bei RT

Tris-HCl-Base	25 mM
Glycin	192 mM
SDS (w/v)	0,1 %

2.1.4.6 Färbungen

Coomassie Färbelösung

Methanol (v/v)	50 %
Coomassie Brilliant Blue (w/v)	0,05 %
Eisessig (v/v)	10 %
H ₂ O	40 %

Coomassie Fixierlösung

Methanol (v/v)	50 %
Eisessig (v/v)	10 %
H ₂ O	40 %

Coomassie Entfärbelösung

Methanol (v/v)	5 %
Eisessig (v/v)	7 %
H ₂ O	88 %

Ponceau S Färbelösung

Ponceau S	2 g/l
Trichloressigsäure	30 g/l
Sulfosalicylessäure	30 g/l

2.1.4.7 Western und Farwestern

Transferpuffer

Methanol (v/v)	20 %
Glycin	0,2 M
Tris-HCl	25 mM

PBST-Puffer

PBS pH 7,4	
Tween 20 (v/v)	0,05 %

Blockierlösung

PBS pH 7,4	
Mit Zusatz von:	
Tween 20 (v/v)	0,05 %
Magermilchpulver (w/v)	3 %

HBB-Puffer

Hepes-KOH pH7,5	25 mM
NaCl	25 mM
MgCl ₂	5 mM
DTT	1 mM (frisch zugeben)
Magermilchpulver (w/v)	5 %

Hybridisierungspuffer

Hepes-KOH pH7,5	25 mM
KCl	75 mM
MgCl ₂	2,5 mM
EDTA	0,1 mM
Nonident (v/v)	0,1 %
DTT	1 mM (frisch zugeben)
Magermilchpulver (w/v)	1 %

2.1.4.8 2D Elektrophorese mit IPG

Reduzierungspuffer	pH 8,5 bei RT
Guanidinhydrochlorid	6 M
Tris-HCl	0,5 M
DTT	10 mM (frisch zugeben)
Alkylierungspuffer	pH 8,5 bei RT
Guanidinhydrochlorid	6 M
Tris-HCl	0,5 M
Jodazetamid	40 mM
2D Standardlysepuffer	
Harnstoff	9 M
CHAPS	2 %
DTT	1 % (frisch zugeben)
Pharmalyte 3-11	0,8 %
Standard Reswelling Puffer	
Harnstoff	8 M
CHAPS	1 %
DTT	20 mM
Pharmalyte 3-11 (v/v)	0,5 %
2D Equilibrierungspuffer	pH 6,8 bei RT
Tris-HCl	50 mM
SDS	2 %
Harnstoff	6 M
Glycerin	30 %
Bromphenolblau	in Spuren
DTT	1% (frisch zugeben)

2.1.4.9 AUT Elektrophorese

AUT-Probenpuffer

Harnstoff	6 M
Essigsäure (v/v)	2,5 %
β- Mercaptoethanol (v/v)	2,5 %

AUT Laufpuffer

Essigsäure	0,9 M
Triton X 100 (w/v)	0,1 %

AUT Equillibrierungspuffer	pH 6,8 bei RT
TRIS-HCl	62,5mM
SDS	2,3 %
Glycerin	10 %
β -Mercaptoethanol(v/v)	5 %
Bromphenolblau	in Spuren

2.1.4.10 Chemischer Crosslink

HBS-Puffer	pH 7,4 bei RT
Hepes	20 mM
NaCl	150 mM
DTT	2 mM (frisch zugeben)

2.1.4.11 UV-Crosslink

Puffer A	pH 7,4 bei RT
Saccharose	250 mM
KCl	25 mM
MgCl ₂	5 mM
Tris-HCl	50 mM

2.1.4.12 Northern Blot

Agarose-Formaldehydgel

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

10 x MOPS	pH 7,0 (nur steril filtrieren)
MOPS-NaOH	200 mM
Natrium-Azetat	50 mM
EDTA	10 mM

Auftragspuffer

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

20 x SSC	pH 7,0 mit 1 N HCl (steril filtriert)
NaCl	3 M
Natrium-Citrat	300 mM

Prähybridisierungslösung

Na ₂ HPO ₄	0,25 mM
EDTA	1 mM

Hybridisierungslösung

Prähybridisierungslösung mit	20 % SDS
------------------------------	----------

Hochsalzpuffer

Na ₂ HPO ₄	20 mM
EDTA	1 mM
SDS	10 %

Maleinsäurepuffer pH 7,5

Maleinsäure	100 mM
NaCl	150 mM

CDP-Star Waschpuffer pH 7,5

Maleinsäure	100 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,3 %

CDP-Star Detektionspuffer pH 9,5

Tris-HCl	100 mM
NaCl	200 mM

2.1.4.13 Agarose-Gelelektrophorese

10 x TBE Puffer

Tris	0,89 M
Borsäure	0,89 M
EDTA	20 mM
Für die Elektrophorese wurde der Puffer 1:20 verdünnt.	

Auftragslösung für DNA

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

2.1.4.14 Molekulargewichtstandards

2.1.4.14.1 Proteinstandards

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

Vor dem Auftrag auf das SDS-Gel wurden die Marker 1:4 mit 1 x SDS-Probenpuffer verdünnt.

2.1.4.14.2 DNA- und RNA-Standards

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

50 Basenpaarleiter (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

2.1.4.15 Oligonukleotide/Primer RT-PCR

Die Primer für die PCR und die DNA-Sequenzierungen wurden alle von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

Für die Auswahl der Primersequenzen wurde das Programm Primer 3 verwendet.

Tabelle 2.1 Oligonukleotide und Primer für die RT-PCR

Primername	DNA Sequenz	Nucleotide
cbGlobin(s)	5'-CAGAGGTTCTTGCGTCC-3'	674–691
cbGlobin(as)	5'-TAGGTGCTCCGTGATCTT-3'	1840–1823
cCAII(s)	5'-GGCGTGAAGTACGATGCAGAG-3'	119–139
cCAII(as)	5'-GGCAGCAGTCCAGTAGGGTC-3'	67–48
tob(s)	5'-GGCATAGCAGCTATGCAGCT-3'	96–115
tob(as)	5'-GATCCTGAGGCAAGTTGCCA-3'	375–356
fos(s)	5'-ACGGCCATCTCCACCAGTC-3'	317–335
fos(as)	5'-GGACAGCTGCTCGACTTGC-3'	520–501
ifr1(s)	5'-TGGGGTCGGAATTGAAAGC-3'	696–717
ifr1(as)	5'-CAGCGTCCATGCTAAGAGTG-3'	980–960

Die Zusätze (s) oder (as) in den Bezeichnungen der Primer beziehen sich auf die Orientierung sense oder antisense zum codierenden Strang der DNA.

Für die reverse Transkription von RNA wurden Random Hexamer Primer pd(N)6 der Firma GE Healthcare (München) verwendet.

2.1.4.16 siRNA Sequenzen

Die verwendete siRNA Sequenz wurde mit Hilfe der siMAX Design-Software von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) designet und auch von dort bezogen.

Tabelle 2.2 siRNA Sequenz.

siRNA Name	mRNA Sequenz	Nucleotide
ifr1-siRNA(s)	5'-UGAAUGAAGUGAAGAAGAA-3'	997–1018

2.1.4.17 Antikörper und rekombinantes IFR1

Tabelle 2.3 Übersicht der verwendeten Antikörper, Verdünnung und Hersteller.

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Rabbit-Anti-IFR1-IgG (Polyklonal, AS 38-373)	1:20000 (1:40000)	Davids Biotechnologie, Regensburg
Rabbit-Anti-tob-IgG (Polyklonal, AS 19-350)	1:5000	Davids Biotechnologie, Regensburg
Rabbit-Anti-fos-c-IgG	1:40000	Santa Cruz Biotechnologie, Santa Cruz, CA, USA
Rabbit-Anti-PABP-IgG	1:50000	R.E. Lloyd, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA
Rabbit-Anti-CAII-IgG	1:50000	Chemicon International, Hampshire, UK
Anti-digoxigenin-AP, Fab fragments		Roche, Mannheim
Rekombinantes IFR1 (AS38-373) 5µg/µl	1 :2000 – 1 :5000	AG Prof. Dr. Baumann (eine Arbeitsgruppe)
Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Goat-Anti-Rabbit-IgG	1:10000	Acris, Hiddenhausen

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit embryonalen Hühner Erythrozyten

2.2.1.1 Bebrütung der Eier

Die aus der Brütterei Süd, Zentralniederlassung der BWE- Brütterei Weser- Ems GmbH & Co. KG in Regenstauf stammenden befruchteten Hühnereier der Rasse *White Leghorn* (*Gallus gallus*) wurden in einem Brutschrank bei einer konstanten Temperatur von 37,5°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60% inkubiert. Die Eier wurden sechsmal am Tag mit Hilfe der integrierten Wendearmatik gewendet. Die Hühnereier wurden bis zum Beginn der Inkubation in einem Kühlschrank bei 10°C aufbewahrt.

2.2.1.2 Gewinnung der embryonalen Hühnererythrozyten

Am Ende der gewünschten Bebrütungsdauer wurden die Eier aus dem Brutschrank genommen und mit einem mit Isopropanol befeuchteten Kleenex abgewischt um Verunreinigungen zu vermeiden. An der stumpfen Seite des Eis wurde die Schale über der Luftkammer mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig aufgeklopft, die Schale entfernt, die darunter liegenden Eimembranen wurden durchtrennt und die obere Hälfte des Eis wurde vorsichtig geöffnet. Dabei wurde die Schale mit der äußeren und innern Eimembran abgelöst ohne dabei größere Gefäße oder den Dottersack zu verletzen. Die Allantoisflüssigkeit wurde größtenteils mit einer Glas Pasteurpipette abgenommen, und extraembryonal wurde das große, venöse Blutgefäß (Allantoisvene) durchtrennt. Das austretende Blut wurde mit der Pasteurpipette in Waschpuffer (pro Ei ca. 1,5ml Waschpuffer) gesammelt und das gewonnene Blut mehrerer Eier gepoolt. Zur Vermeidung der Blutgerinnung wurde ab einer Bebrütungszeit von 12 Tagen ca. 2 I.E. Hepain/ml Waschpuffer zugegeben. Nach dem Sammeln des Blutes, wurde dieses dreimal mit sterilem PBS gewaschen, wobei die Leukozyten verworfen wurden und das PBS so gut wie möglich entfernt wurde. Nach dem Waschen lagen gepackte Erythrozyten mit einem Zytokrit von ca. 80% vor.

2.2.1.3 *In vitro* Inkubation

Die *in vitro* Inkubation der gewonnenen embryonalen Erythrozyten erfolgte im Schüttelwasserbad bei 37°C in 2ml Reaktionsgefäß. Zur ausreichenden Sauerstoffversorgung der Erythrozyten wurden mit einer Kanüle zwei Löcher in die Reaktionsgefäßdeckel gestochen.

1ml Inkubationsansatz setzte sich wie folgt zusammen: Als Flüssigmedium wurde HAM's F10 mit einem Zusatz von 20mM HEPES verwendet, welches auf eine pH-Wert von 7,4 bei 37°C eingestellt wurde. Anschließend wurde 100µl fetales Kälberserum und mit Hilfe des Kapilletors 100µl gewaschenen, dicht gepackten embryonale Hühnererythrozyten zugegeben. Sofern nicht anders beschrieben wurde nach 15 Minuten Inkubationszeit 10µM Noradrenalin je Ansatz zugegeben, der Kontrollansatz (t_0) wurde ohne Noradrenalin inkubiert.

Für die Dichtegradientenzentrifugation wurde nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden 45 Minuten 100µg/ml Cycloheximid zugegeben. Wie aus früheren Inkubationen der Arbeitsgruppe ersichtlich, akkumuliert zu diesem Zeitpunkt das zu untersuchende Protein IFR1. Im anschließend verwendeten Lysepuffer wurde ebenfalls 100µg/ml Cycloheximid zugesetzt.

Nach einer Gesamtinkubationszeit von 4h wurde $\frac{1}{2}$ Volumen des Ansatzvolumens eiskaltes, steriles PBS zugegeben und die Erythrozyten wurden in einer Tischzentrifuge kurz abzentrifugiert (einige Sekunden, 4°C, 14000g). Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Erythrozyten noch zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und die gepackten Zellen wurden bis zur Weiterverarbeitung für die Hämoglobinbestimmung oder den Western Blot in einem Eisblock auf Eis gestellt.

Die Hämoglobinbestimmung erfolgte mit 5µl gepackte Erythrozyten in 1ml Transformationslösung. Für die Herstellung von Ganzzell-Lysat SDS-Proben wurden mit dem Capilettor 20µl gepackte Erythrozyten zu 280µl 1x SDS-Probenpuffer pipettiert und für eine Minute gevortext. Nach einer Inkubation von 5 Minuten auf Eis wurden die Proben bei 40 % Ultraschall für 10 Sekunden beschallt und anschließend in zwei Portionen in flüssigen N₂ gefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.4 Bestimmung der Hämoglobinkonzentration

Die Hämoglobinkonzentration in gepackten Erythrozyten wurde mit Hilfe der Cyanmethämoglobinmethode bestimmt. Durch die stark hypotone Transformationslösung kommt es zu einer Lyse der Erythrozytenmembran und das freigesetzte Hämoglobin wird mit dem Oxidationsmittel Kaliumhexacyanoferrat(III) zu Methämoglobin oxidiert und mit Cyanid in Cyanmethämoglobin umgewandelt. Die Farbintensität des stabilen Cyanmethämoglobin Farbkomplexes ist der Gesamthämoglobinkonzentration in der Probe proportional und wird photometrisch gemessen.

Der Hämoglobininhalt wurde in allen weiteren Versuchen als Bezugsgröße ausgewählt, da Hämoglobin den Hauptanteil der zellulären Proteine von Erythrozyten ausmacht.

Für die photometrische Bestimmung wurden in der Regel 5µl gepackte Erythrozyten oder bei der Verwendung von Hämolsat 10µl bereits lysierte Erythrozyten in 1ml Transformationslösung pipettiert. Die Proben wurden nach sorgfältigem vortexen für 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, so dass die Oxidationsreaktion komplett ablaufen konnte. Mittels einer Tischzentrifuge wurden die verbleibenden Zellfragmente und DNA abzentrifugiert (RT, 10 min, 12000upm). Es erfolgte die Bestimmung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 546nm und die Berechnung der Gesamthämoglobinkonzentration durch Umformung des Lambert-Beer'schen Gesetzes.

$$c_{Hb} [g/l] = \frac{E_{546} \cdot MG_{Hb} \cdot Vf}{\varepsilon \cdot d}$$

c_{Hb} [g/l]	Gesamthämoglobinkonzentration in g pro Liter Erythrozyten
E_{546}	gemessene Extinktion bei 546nm
MG_{Hb}	Molekulargewicht von Hämoglobin (64500g/mol)
ε	Extinktionskoeffizient von Cyanmethämoglobin bei 546nm ($44000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
d	Schichtdicke der Küvett (1cm)
Vf	Verdünnungsfaktor

2.2.1.5 Lyse der embryonalen Hühnererythrozyten

Für die Lyse wurde ein Volumenteil, meist 300 µl, der gepackten, gewaschenen Erythrozyten mit drei Volumenteilen, 900 µl, des Lysepuffers versetzt, und mit der Pipette vorsichtig gemischt. Nach der fünfminütigen Inkubation auf Eis, wurde die aus Lysepuffer und Zellteilen bestehende Suspension in einer auf 4°C vorgekühlten Tischzentrifuge für 10 Minuten bei 10000g zentrifugiert. Das so gewonnene Hämolsat wurde, ohne das entstandene Pellet dabei zu verletzen, abgenommen und in einem sterilen Glasgefäß gesammelt. Zur Überprüfung der Induzierbarkeit des IFR1 Proteins im Western Blot wurden 100µl Hämolsat mit 100µl 1x SDS Probenpuffer versetzt und gut gevortext. Für die Hämoglobinbestimmung wurden 10µl Hämolsat in 1ml Transformationslösung gegeben. Für die spätere Verwendung (siehe 2.2.4) wurde das Hämolsat zu Portionen à 8ml in Plastikreaktionsgefäß en in flüssigen N₂ gefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.1.6 Blautausstrich der embryonalen Hühnererythrozyten

Der Blautausstrich ist eine Methode zur Präparation von Vollblut oder gewaschenen Erythrozyten und dient dem mikroskopischen Nachweis von vorhandenen primitiven und definitiven Erythrozyten oder aber auch von Retikulozyten im embryonalen Hühnerblut.

Es wurden 5 μ l gewaschene Erythrozyten am Rand eines Objektträgers aufgebracht und gleichmäßig mit der Kante eines Zweiten Objektträgers, der im spitzen Winkel (ca. 45°) aufgesetzt wurde, ausgestrichen. Die so ausgedünnten Blutzellen liegen nun vereinzelt und können besser beurteilt werden. Das Präparat wurde an der Luft getrocknet und anschließend fixiert und gefärbt. Dazu wurde der Objektträger waagrecht auf eine Färbebank gelegt und mit der MAY-GRÜNWALD-Lösung überschichtet. Nach 5 Min Einwirkzeit wurden die Ausstriche sorgfältig mit H₂O_{bidest.} abgespült und das überschüssige Wasser wurde abgekippt. Mit der verdünnten GIEMSA-Lösung (1VT GIEMSA Stammlösung plus 19VT H₂O_{bidest.}) wurden die Objektträger für 20 Min gefärbt, schließlich mit H₂O_{bidest.} kräftig abgespült, und die Ausstriche schräg stehend an der Luft getrocknet.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Proteinbestimmung nach M.M. Bradford

Der Proteingehalt der Ribosomenpellets wurde mit der Methode von Bradford (1976) mit Hilfe einer selbst ermittelten Eichgeraden bestimmt. Grundlage des Test ist die Reaktion der basischen, unpolaren Seitenketten von Aminosäuren mit dem Coomassie Brilliant Blue Farbstoff. Dabei kommt es zu einer Zunahme der Absorption bei 595 nm, die photometrisch gemessen werden kann.

Für die Eichgerade wurden aus einer BSA Stammlösung (400 μ g/ml) Verdünnungen im Bereich von 0-100 μ g/ml pipettiert. In einer 96-well Mikrotiterplatte wurden 50 μ l des Standards oder der zu messenden, jeweils vorverdünnten Proben mit 200 μ l des Bradford Reagenz versetzt. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Nach 5 Min Inkubation bei RT wurde die Platte im Mikroplattenlesegerät (Biorad) bei 595nm ausgelesen.

2.2.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine in Polyacrylamidgelen in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts wurde nach der Methode von Lämml (1970) durchgeführt, wobei eine Konzentrierung der Proben durch den Übergang vom niedriger prozentigen

Sammelgel in das höher prozentige, engporigere Trenngel erreicht wird. Durch SDS werden die Proteine denaturiert und über kovalente Bindungen stark negativ geladen, wodurch die Eigenladung der Proteine vernachlässigt werden kann. Es erfolgt die Auftrennung nach der Größe der Proteine, kleinere Proteine wandern daher schneller, als große.

In einer vertikalen Gelelektrophoreseapparatur wurde zuerst das Trenngel gegossen, welches, je nach Verwendungszweck und nachzuweisenden Proteinen, eine andere Prozentigkeit aufweist. Durch die Verwendung von unterschiedlichen Mengen an Acrylamid kann die Porengröße variieren, was sich in der Prozentangabe des Trenngels widerspiegelt (siehe Tabelle 2.4). Nach der Auspolymerisierung wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm eingefügt.

Tabelle 2.4 Zusammensetzung der SDS Gele.

Die Angaben gelten für ein Minigel der Größe 6,5cm x 9,5cm

	Trenngel (8%)	Trenngel (10%)	Trenngel (13%)	Sammelgel (5%)
Acrylamid 30% mit 0,8% Bisacrylamid	2 ml	2,5 ml	3 ml	500µl
1 M Tris/HCl pH 8,8	2,8 ml	2,8 ml	2,8 ml	-
1 M Tris/HCl pH 6,8	-	-	-	375µl
20% SDS	37,5 µl	37,5 µl	37,5 µl	15 µl
H ₂ O Millipore	2,5 ml	2 ml	1,5 ml	1,94ml
Bromphenolblau 4,8 mg/ml	-	-	-	75µl
Amper Sulfat Lsg. 4,5%	150 µl	150 µl	150 µl	90 µl
TEMED	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl

Die Proben wurden mit 1x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 Min. bei 95°C denaturiert, auf RT abgekühlt und kurz anzentrifugiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Anschließend ließ man die Proben bei 12,5mA/Gel in das Sammelgel einwandern, und erhöhte dann die Stromstärke auf 25 mA/Gel für die Auftrennung der Proteine. Die Elektrophorese in 1x SDS Laufpuffer wurde so lange durchgeführt, bis die Bromphenolblaufront gerade in die untere Kammer lief.

2.2.2.3 Coomassie Färbung

Die Grundlage dieser Färbung von Polyacrylamidgelen stellt die unspezifische Bindung des Farbstoffes Coomassie Brillant Blau R250 an Proteine dar, wobei die Nachweisgrenze bei ~0,1 µg/Proteinbande liegt.

Nach der Elektrophorese wurde das SDS-Polyacrylamidgel für 30 Min. in Fixierlösung leicht geschwenkt, und über Nacht bei RT in der Färbelösung inkubiert. Die Entfärbung erfolgte durch Schwenken für 30 Min in Fixierlösung und der anschließenden Inkubation in der Comassie-Entfärbelösung, bis auf dem klaren Hintergrund nur noch die blau gefärbten Proteinbanden zu erkennen waren. Um die Entfärbung zu beenden, wurde der Entfärber durch Wasser ersetzt.

2.2.2.4 Silberfärbung

Die Nachweisgrenze der Silberfärbung liegt bei ~1ng/Proteinbande und ist damit sehr viel sensitiver als die Coomassie Färbung. Um die Proteine in der Gelmatrix zu fixieren, wurde das Polyacrylamidgel für 30 Min in der Fixierlösung bei RT inkubiert, und anschließend für 15 Min in 50% Methanol geschwenkt. Es wurde fünfmal für 5 Min mit $H_2O_{\text{bidest.}}$ gewaschen, anschließend für 60s in 0,02% $Na_2S_2O_3 \times 5 H_2O$ eingelegt und wieder zweimal mit $H_2O_{\text{bidest.}}$ gewaschen. Die Färbung erfolgte mit 0,2% Silbernitratlösung bei 4°C für 25 Minuten. Die Silberreduktion wurde mit 3% Natriumcarbonat in 0,009% (v/v) Formaldehydlösung bis zum gewünschten Entwicklungsgrad durchgeführt. Die Entwicklungsreaktion wurde durch die Inkubation mit 1,4% EDTA Lösung für 10min abgestoppt. Zuletzt wurden die Gele mit $H_2O_{\text{bidest.}}$ gewaschen.

2.2.2.5 Western Blot

Der Western Blot bezeichnet die Übertragung von Proteinen aus einem SDS Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran, wobei die Proteine anschließend über eine Antigen-Antikörper-Reaktion nachgewiesen werden können.

Der Transfer der Proteine erfolgte über eine Semi-Dry Blotting Apparatur, wobei zuerst eine Nitrozellulose-Membran und sechs Whatman-Chromatographie-Papiere auf die Größe des Gels zugeschnitten und für 15 Min. in Transfer Puffer äquilibriert wurden. Anschließend wurden drei Filterpapiere luftblasenfrei übereinander auf die Graphitoberfläche der Apparatur geschichtet und darauf die Nitrozellulose Membran. Das Gel wurde vorsichtig auf die Membran gelegt und mit drei weiteren Whatman-Papieren bedeckt. Der Transfer erfolgte bei 20mA/Gel für 30 Min.

Zur Überprüfung des Proteintransfers und zur Markierung des Molekulargewichtstandards wurde eine reversible Ponceau-S Färbung durchgeführt. Dabei wird die Membran für 10 Min in Ponceau-S leicht schüttelnd inkubiert und mit H_2O_{bidest} dreimal kurz gewaschen. Die so sichtbaren Proteinbanden des Markers wurden mit Bleistift markiert, um später die Größe der Proteine im Western Blot abschätzen zu können.

Um unspezifische Proteinbindungen an die Membran ausschließen zu können, wurde der Blot für 30 Min bei RT schüttelnd mit 3 % Magermilch in PBS blockiert. Die Inkubation mit dem primären (polyklonalen) Antikörper in 3 % Magermilch/PBS erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit H_2O_{bidest} wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper in 3 % Magermilch/PBS für 1,5 Std. bei RT schüttelnd inkubiert. Abschließend wurde dreimal kurz mit H_2O_{bidest} gewaschen, für 5 Min mit PBST und für 15 Min mit PBS, jeweils schüttelnd bei RT. Die Detektion erfolgte nach vier kurzen Waschschritten mit H_2O_{bidest} mit Hilfe des ECL Advance Western Blotting Detection Kit. Dabei wurde die Membran 5 Minuten mit einem 1:1 Gemisch aus Lösung A und B inkubiert und danach mit der Proteinseite nach oben in den Fluor-S Multimager (BioRad) gelegt. Die Aufnahme der Chemiluminiszenz erfolgte für 10 Min. mit Hilfe der gerätespezifischen Software Multi-Analyst PC Version 1.1 (BioRad).

2.2.2.6 Berechnung der IFR1 Proteinkonzentration in Erythrozyten

Die Berechnung der Proteinkonzentration von IFR1 in Erythrozyten wurde ausgehend von den Chemilumineszenz Signalen des Western Blots in Abbildung 3.14 durchgeführt.

292 g Hb sind in 1 l Erythrozyten (siehe Hb-Bestimmung)

Das entspricht $292 \times 10^6 \mu\text{g}$ Hb sind in 1 l Erythrozyten

Hämolsat mit $100 \mu\text{g}$ Hb enthalten $0,045 \mu\text{g}$ IFR1 (laut Western Blot)

Daraus ergibt sich: $292 \times 10^6 \mu\text{g}$ Hb $\times 0,045 \mu\text{g}$ IFR1 / $100 \mu\text{g}$ Hb =
 $= 131400 \mu\text{g}$ IFR1 in 1 l Erythrozyten

Zusammen mit: $131400 \mu\text{g}$ IFR1 in 1 l Erythrozyten
 $48800 \text{ g IFR1 1 l Erythrozyten entspricht 1 M}$

Ergibt sich: $0,1314 \text{ g IFR1} \times 1 \text{ M} / 48800 = 2,7 \mu\text{M}$

2.2.2.7 Far Western

Der Far Western Blot ist eine anerkannte Methode um Protein-Protein Wechselwirkungen nachzuweisen [Pasquali, 2000]. Der Kontakt zwischen den Proteinen ist dabei abhängig von der Proteinkonzentration, der Art der Gegenionen, der Ionenkonzentration, dem Redoxpotential und dem pH-Wert. Alle diese Faktoren können die Proteinbindungen beeinflussen [Howell, 2006]. Im Gegensatz zum Western Blot wird beim Far Western erst ein Protein (kein Antikörper) eingesetzt um Protein-Protein-Wechselwirkungen festzustellen. So können Bindungspartner der zugegebenen Protein Sonde (z.B. rekombinant hergestelltes Protein) oder des geblotteten Proteins identifiziert werden.

Der Kontakt zwischen den Proteinen ist dabei abhängig von der Proteinkonzentration, der Art der Gegenionen, der Ionenkonzentration, dem Redoxpotential und dem pH-Wert. Alle diese Faktoren können die Proteinbindungen beeinflussen [Howell, 2006].

Die durch eine SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden wie beim Western Blot auf eine Nylon Membran geblottet und für 30 Min bei RT in HBB Puffer geschwenkt. Das rekombinante IFR1 wurde 1:1000 mit Hybridisierungspuffer verdünnt, dabei auf eine Konzentration von 5 ng/ μ l gebracht [Pasquali, 2000] und ebenfalls für 30 Min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die vorbehandelte Membran mit dem IFR1 überschichtet und ÜN bei 4 °C hybridisiert.

Alle weiteren Schritte, wie die Inkubation mit dem Erst- und Zweitantikörper, die Waschschrifte sowie die Detektion erfolgen nach dem Protokoll des Western Blots.

2.2.2.8 Proteinsequenzierung mit MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die Matrixunterstützte Laser-Desorption/Ionisation(engl. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization; MALDI) ist eine effektive Methode, Moleküle zu ionisieren. Mit Hilfe der MALDI können auch größere Biopolymere ionisiert werden, wobei diese in einem elektrischen Feld beschleunigt werden und dann anhand ihrer Flugzeit (engl. time of flight; TOF) das Masse/Ladungsverhältnis bestimmt wird. In der Proteinsequenzierung werden trypsinverdaute Fragmente des zu sequenzierenden Proteins mit MALDI-TOF massenspektrometrisch charakterisiert und die Sequenz kann dann über Datenbankabgleiche gefunden werden.

2.2.2.8.1 Proteingewinnung aus SDS-Gelen

Die mit den zu sequenzierenden Proteinen geladenen 2D Gele wurden aus der Gelapparatur entnommen und in Coomassiefärbelösung für 30min unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde das Gel für 3 h in 7 % (v/v) Essigsäure

entfärbt. Zur vollständigen Enfärbung wurde das Gel 1 h in H₂O_{bdest.} und danach über Nacht geschenkt.

Mithilfe eines sauberen Skalpells wurden die ausgewählten Proteinpunkte ausgeschnitten, das jeweilige Gelvolumen durch abmessen mit einem Lineal bestimmt und in kleine Würfel mit 1mm Kantenlänge geschnitten. Durch die Inkubation für jeweils 30min in 50mM NH₄HCO₃, anschließend in 50mM NH₄HCO₃ /25% Acetonitril und zuletzt in 50% Acetonitril wurde SDS sowie andere Verunreinigungen aus dem Gel gelöst. Das Volumen der Extraktionslösungen betrug jeweils das Zweihunderfache des Gelvolumens. Die so gereinigten Gelstücke wurden für 1h lyophilisiert.

2.2.2.8.2 Trypsinverdau

Der Verdau erfolgt mit der spezifischen Endonuklease Trypsin. Dazu wurden die getrockneten Gelstücke mit dem 1,5-fachen des Gelvolumens mit Trypsin in 50mM NH₄HCO₃ versetzt. Die Endkonzentration an Trypsin sollte 2µg/100µl Gelvolumen betragen. Der Verdau der Proteine erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

2.2.2.8.3 Proteinextraktion

Nach dem Verdau wurden die Gelstücke zweimal jeweils für 2h 30min mit 100mM NH₄HCO₃ bei 37°C extrahiert. Zuletzt folgte die Extraktion mit 50mM NH₄HCO₃/50%Acetonitril ebenfalls für 2h30min und 37°C. Alle Überstände wurden vereinigt und gefriergetrocknet. Das so entstandene Pellet wurde in 10µl H₂O_{bdest.} gelöst und erneut lyophilisiert.

Die Sequenzierung wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Rainer Deutzmann und Herrn Eduard Hochmuth, Lehrstuhl für Biochemie I, Universität Regensburg, durchgeführt.

2.2.2.9 Zweidimensionale IPG-Elektrophorese

In der zweidimensionalen Gelelektrophorese mit immobilisierten pH Gradienten werden Proteine sowohl nach ihrem isoelektrischen Punkt als auch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Da dies zwei unabhängige Charakteristika von Proteinen sind, erreicht man, auch bei Einsatz von komplexen Proteingemischen, eine sehr gute Auflösung. In der ersten Dimension erfolgt eine ladungsspezifische Auftrennung der Proteine entlang eines pH Gradienten. Dabei wandern Proteine in einem starken Spannungsfeld, bis sie den pH-Wert erreichen, bei dem ihre Nettoladung genau 0 Q beträgt. Dies wird als Isoelektrische Focussierung bezeichnet. In der zweiten Dimension erfolgt eine Auftrennung nach dem Molekulargewicht in einer SDS-PAGE. Die klassische zweidimensionale

Gelelektrophorese nach O'Farrell (1975) mit Trägerampholyten hat jedoch den Nachteil, dass sie sehr schwer reproduzierbar ist. Erst die Einführung der immobilisierten pH Gradienten durch Bjellqvist et al. 1982 führte zu einer ausreichenden Reproduzierbarkeit.

2.2.2.9.1 Alkylierung der Ribosomenpellets

Soweit im Text nicht anders vermerkt wurden alle Proben nach dem Protokoll von J.E. Celis [Cell Biology, Academic Press, 1998] für die 2D-Elektrophorese vorbereitet. Dies beinhaltet die Extraktion der in der ersten Dimension störenden Nukleinsäuren, die dauerhafte Reduktion der Disulfidbrücken durch Alkylierung sowie das Entfernen störender Salze durch Dialyse. Das Ausgangsmaterial war das in Puffer A gelöste Pellet nach der zweiten Ultrazentrifugation. 1000µg Protein wurden zu einem Endvolumen von ca. 50µl mit Puffer A verdünnt. Es wurden 12,5µl Magnesiumazetat und nach sorgfältigem resuspendieren 125µl Eisessig zugegeben und die Lösung für 1h auf Eis inkubiert. Daraufhin folgte eine Zentrifugation bei 4°C und 12000rpm für 10min. Der Überstand wurde abgenommen und das RNA Pellet in 62,5µl 0,1M Magnesiumazetat und 125µl Eisessig aufgenommen, 10min auf Eis gelassen und anschließend wie oben erneut zentrifugiert. Die beiden Überstände wurden vereint und zu gleichen Teilen, auf zwei Gefäße aufgeteilt. Die Fällung der Proteine erfolgte durch Zugabe der fünffachen Menge an kaltem Azeton. Vor der Zentrifugation wurden die Proben für 2h bei -80°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine bei 10000rpm und 4°C 12min gefällt. Das Pellet wurde daraufhin für ca. 5min in einem Speedvac Konzentratoren getrocknet.

Das nun RNA freie Proteinpellet wurde in so viel Reduzierungspuffer aufgenommen, dass die Proteinkonzentration 10µg/µl betrug. Um die Reoxidation zu vermeiden, wurde die 1,5h dauernde Inkubation bei RT unter Stickstoff durchgeführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Alkylierungspuffer im Verhältnis von 8,7µl Alkylierungspuffer/100µl Reduzierungspuffer. Die Alkylierung wurde ebenfalls unter Stickstoff bei RT für 30min durchgeführt.

Die Dialyseschläuche wurden auf eine geeignete Länge zugeschnitten und anschließend nach Angabe des Herstellers vorbereitet. Hierfür wurden die Schläuche zuerst in 250ml 2% NaHCO₃/1mM EDTA Lösung für 10min gekocht. Anschließend wurden die Schläuche gut mit H₂O_{bidest.} gespült und in 1mM EDTA Lösung für 10min gekocht. Die Aufbewahrung der Schläuche erfolgt in 1mM EDTA Lösung bei 4°C. Die eigentliche Dialyse der alkylierten Proben erfolgte gegen das 5000-fache Volumen an 1M Essigsäure unter Rühren bei 4°C über Nacht. Die Proteine konnten in 1M Essigsäure bei -80°C gelagert werden.

2.2.2.9.2 Vorbereitung der IPG Streifen

Die kommerziellen IPG Streifen müssen vor der Verwendung zuerst rehydriert werden. Hierzu wurden 600 μ l Reswelling Puffer in eine Bahn des Reswelling Trays pipettiert und anschließend den Streifen mit dem Gel nach unten auf den Puffer gelegt. Um den Streifen luftdicht zu inkubieren, wurde der Streifen mit 3ml Mineralöl überschichtet. Das Quellen des Streifens erfolgt über Nacht für ca. 16h.

2.2.2.9.3 Denaturierung der Probe in Lysepuffer

Die alkylierten und dialysierten Proben wurden in einem Speedvac Konzentrator getrocknet. Das Pellet konnte daraufhin in Standardlysepuffer aufgenommen werden, so dass eine Endkonzentration an Proteinen von ca. 10 μ g/ μ l erreicht wurde. Die Denaturierung der Proteine erfolgte über Nacht bei RT.

2.2.5.4 Erste Dimension

Der gequollene Streifen wurde aus dem Tray genommen und für eine Sekunde in H₂O_{bidest.} getaucht, um überschüssigen Reswellingpuffer zu entfernen. Anschließend wurde der Streifen zwischen zwei befeuchtete Whatmanfilterpapiere gelegt, um restliches Wasser und Reswellingpuffer aufzusaugen. Der Streifen wurde daraufhin in der richtigen Orientierung in das Schiffchen gelegt und mit 1,3ml Mineralöl überschichtet. An der Kathode und Anode wurde ein feuchtes Whatmanpapier (ca. 1cm x 0,5cm) auf dem Streifen platziert und die Kontakte über diesen Filterpapieren angebracht. Die Probe wurde ca. 2cm vor der Anode mit Hilfe des Cuploader auf den Streifen aufgetragen und mit 50 μ l Öl überschichtet. Das Schiffchen wurde nun im IPGphor wie vorgesehen Platziert.

Soweit nicht anders vermerkt wurde im IPGphor folgendes Programm gefahren, bei einem Stromlimit vom 50 μ A/Streifen.

Optimiertes Programm für die IEF:

Programm	Spannung	Zeit
Step and Hold	50V	16h
Step and Hold	150V	1h
Step and Hold	300V	1,5h
Step and Hold	500V	1,5h
Step and Hold	1000V	1h
Gradient	1000V-8000V	0,5h
Step and Hold	8000V bis 50kVh erreicht waren	

Nach der ersten Dimension konnten die Streifen, soweit nicht sofort verarbeitet, bei -80°C gelagert werden.

2.2.2.9.4 Equilibrierung des Streifens mit SDS

Um die Proteine nach der ersten Dimension mit SDS zu beladen musste der Streifen equilibriert werden. Hierzu wurde der Streifen zuerst 10min in 2D-Waschpuffer + 1% DTT geschwenkt und anschließend noch einmal 10min in 2D-Waschpuffer ohne DTT gewaschen.

2.2.2.9.5 Zweite Dimension

Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgte in einem 13%igen Gel. Jedoch wurde das 5% Sammelgel nur bis ca. 0,5cm unterhalb des Randes eingefüllt und mit Butanol überschichtet. Da keine Taschen nötig waren, wurde das Sammelgel ohne Kamm gegossen. Nach der Equilibrierung des Streifens wurde dieser mit einem Skalpell in jeweils 7,5cm lange Streifen geschnitten, wobei im sauren pH Bereich zusätzlich 1,5cm abgeschnitten wurden. Jedes 7,5cm Stück wurde nun auf eines der 13% Gele aufgelegt und mit 0,5% Agarosein 125mM Tris-HCl pH 6,8 und 0,1%(v/v) SDS eingebettet. Nachdem die Agarose fest war, wurden die Gele in die Kammer eingespannt. Die Gele liefen zuerst bei 12,5mA/Gel für 1h und dann bei 25mA/Gel, bis das Bromphenolblau vollständig ausgelaufen war. Dies dauerte zwischen 2,5h und 3,5h.

2.2.2.10 Zweidimensionale Elektrophorese mit AUT-PAGE Acid-Urea-Triton X-100

Die Acid-Urea-Triton X-100 Polyacrylamidgelelektrophorese ist in der Untersuchung der stark basischen Histone sehr beliebt und ermöglicht es Proteine nach ihrem Verhältnis von Ladung zur Molekulargröße aufzutrennen. Vor allem für die Trennung von Histonen wurde diese Methode in der Literatur verwendet. So kann mit der AUT eine hochauflösende Trennung von stark basischen Proteinen erreicht werden.

Die Proteine werden in einem sauren Puffer mit einem pH von ca. 4,5 gelöst und alle Proteine mit einem PKI höher als 4,5 wandern im Gel zur Kathode. Je höher hierbei die positive Ladung im Verhältnis zur Molekulargröße ist desto schneller und damit weiter werden die Proteine wandern.

In dieser Arbeit wurde die AUT-Elektrophorese als erste Dimension in einer 2D Gelelektrophorese verwendet.

2.2.2.10.1 Gießen der AUT-Gele

Die Gelapparaturen wurden unter fließendem $H_2O_{\text{bidest.}}$ gereinigt und wie unter 2.2.2.2 beschrieben zusammengebaut. Das 15%ige Trengel wurde nach folgendem Schema gegossen (siehe Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5 Zusammensetzung der AUT-Gele

	Trenngel	Sammelgel
Substanz (Endkonz)/ % des Gels	15%	5%
Harnstoff (8M)	3,6g	1,2g
30% Arcylamid/0,8%Bisacrylamid (15%v/v)	3,75ml	420µl
Eisessig p.a (5% v/v)	375µl	125µl
Triton X 100 10% (6mM)	281µl	94µl
H2O Millipore	ad 7,5ml	ad 2,5ml
4,5% Ammoniumpersulfat	200µl	150µl
TEMED	35µl	35µl

Diese Angaben beziehen sich auf jeweils ein Gel. Wobei jeder Gelsandwich bis ca. einen Zentimeter unterhalb des Kamms gefüllt wurde. Das Gel wurde mit Butanol überschichtet und zur Polymerisation für ca. 1h bei RT unter direkter Lichteinstrahlung (Handelsübliche Glühbirne mit 60W) stehen gelassen.

Der Kamm wurde eingedrückt und die Polymerisation erfolgte ebenfalls bei RT unter direkter Lichteinstrahlung (siehe oben) für ca. 1h.

2.2.2.10.2 Probenvorbereitung

Die Proben wurden wie oben beschrieben alkyliert und dialysiert. Anschließend wurde die Essigsäure in einem Speedvac Konzentrator abdestilliert und der Rückstand in AUT-Probenpuffer aufgenommen. Die Endkonzentration an Proteinen sollte 10µg/µl betragen.

2.2.2.10.3 Vorlauf und Probelauf der AUT-Gele

Das Gel wurde in die Gelapparatur eingespannt und die Kammern mit AUT-Laupuffer gefüllt. Anschließend wurde das Gel bei umgekehrter Polarität und 250V für 2h bei RT gereinigt. An diesen Vorlauf schloss sich der eigentliche Probenlauf an. Hierfür wurde jeweils 50µg Protein in die Tasche pipettiert und das Gel für 4h, ebenfalls bei umgekehrter Polarität und 200V bei RT laufen gelassen.

2.2.2.10.4 Equilibrierung und zweite Dimension der AUT-Gele

Nach dem Lauf wurde die gewünschte Spur aus dem Gel ausgeschnitten. Die Umpufferung erfolgte in AUT-Equilibrierungspuffer für 20min bei RT und unter sanftem schwenken.

Die zweite Dimension wurde wie unter 2.2.2.2 beschrieben durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte hier in 13%igen SDS-Gelen.

2.2.3 Arbeiten mit Ribonucleinsäuren

2.2.3.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Erythrozyten erfolgte mit dem PeqGold TriFast FL Reagenz. Die Extraktion erfolgte laut Anleitung.

Für die Homogenisierung wurden 50 µl gepackte Erythrozyten mit 200 µl H₂O verdünnt und mit 750 µl peqGoldTriFast FL versetzt und sorgfältig gevortext. Zur besseren Phasentrennung wurde die Probe 5 Min bei RT stehen gelassen, und anschließend 200 µl Chloroform p.a. zugegeben. Nach 30 Sek vortexten und der folgenden Inkubation von 3-10 Min bei RT wurde für 5 Min bei 12000 x g die Lösung in zwei Phasen getrennt. Von der oberen, wässrigen Phase, die die RNA enthält, wurden maximal 500 µl abgenommen und in einen neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß, in welches zuvor Isopropanol vorgelegt wurde, pipettiert. Anschließend wurden 15 Min bei 4 °C inkubiert und für 5 Min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die RNA setzt sich als Präzipitat am Boden des Cups ab. Der Überstand wurde verworfen und das RNA Pellet wurde zweimal in 1 ml 75%igem EtOH durch kurzes vortexten und zentrifugieren für 8 Min bei 7500 x g und 4 °C gewaschen. Nach dem sorgfältigen Entfernen des Überstands wurde das Pellet bei 45 °C und 1100upm im Thermomixer luftgetrocknet und anschließend in 10 µl H₂O aufgenommen. Zur besseren Löslichkeit wurde das Pellet erst 10 Sek gut gevortext und anschließend je 3-mal für 90 Sek auf Eis und 90 Sek auf 65 °C gestellt. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

Für eine Konzentrationsbestimmung wurde 1 µl der RNA in 79 µl H₂O verdünnt und die photometrisch die Absorption bei 260nm gemessen, dabei entspricht eine OD 260 von 1,0 einem RNA-Gehalt von 40µg/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.

Zur Kontrolle wurde noch ein 0,8%iges TBE-Agarosegel gefahren. Dazu wurden für ein kleines Gel 0,32g Agarose mit 40 ml 1 x TBE-Puffer aufgekocht, kurz abgekühlt und 0,8 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben. Zu 0,5 µg der aufzutragenden RNA Probe wurde 1 µl Auftragslösung pipettiert und mit RNase-freiem H₂O auf ein Endvolumen von 10 µl aufgefüllt. Nach kurzem Vortexen, abzentrifugieren, erhitzen auf 65 °C für 5 Min, dem Abkühlen auf Eis, nochmaligem Abzentrifugieren erfolgte der Gelauftrag und der Gellauf wurde bei 80 V für 45 Min durchgeführt. Das Gel wurde zum Schluss unter UV-Licht fotografiert.

2.2.3.2 Northern Blot

Mit dem Northern Blot kann mittels einer Gelelektrophorese aufgetrennte RNA auf eine Membran geblottet werden und durch die Hybridisierung mit komplementären Gensonden erfolgt eine spezifische Markierung von RNA-Sequenzen.

Die isolierte RNA wird in einem 1 % Agarosegel mit 1 % Formaldehyd aufgetrennt. Dazu wurden 0,6 g Agarose mit 6 ml 10 x MOPS und 51 ml steriles H₂O Millipore in einem Erlenmeyerkölbchen in einem Mikrowellengerät aufgekocht und für ein paar Minuten auf ca. 55 °C abgekühlt. Es wurden 1,62 ml 37 % Formaldehydlösung zugegeben und das noch flüssige Gel in eine Gelkammer gegossen und gewartet bis das Gel auspolymerisiert.

Von der isolierten RNA aus 2.2.3.1 wurden 10 µg in einer SpeedVac Zentrifuge im Vakuum bis nahe der Trockne lyophilisiert, anschließend mit 6 µl Auftragspuffer versetzt und vor dem Auftrag für 10 Min bei 65 °C erhitzt. Die Proben wurden zusammen mit 1 µl Digoxigenin-markierter RNA Standard, der mit 6 µl Auftragspuffer verdünnt wurde, aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 50 V für 150 Min in 1 x MOPS Puffer durchgeführt.

Im Anschluss wurde das Gel für 30 Min mit Ethidiumbromid inkubiert, dabei wurden 10 µl Ethidiumbromid-Stammlösung in 200 ml 0,5 x TBE-Puffer pipettiert. Nach der Färbung wurde für 30 Min mit 200 ml 0,5 x TBE-Puffer entfärbt und unter UV-Licht fotografiert.

Um die RNA vom Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran zu übertragen, wurde ein Kapillarblot aufgebaut. Dabei wurde eine Wanne mit 10 x SSC-Lösung gefüllt und über eine Erhöhung in der Mitte wurde Whatman Chromatographiepapier so gelegt, dass es auf beiden Seite in die Pufferlösung eintaucht. Darauf wurden nacheinander, ein in 10 x SSC getränktes, ein Schwammtuch und ein weiteres Whatman Papier, welches etwas größer als das Gel und die Membran ist, gestapelt. Nach der 10-minütigen Äquilibrierung in 10 x SSC wurden erst das Gel und dann die Membran luftblasenfrei aufgelegt. Damit kein Kurzschluss entstehen kann, und der Puffer an der Membran vorbei gesaugt werden kann, wird der Bereich um die Membran mit Frischhaltefolie abgedichtet. Zum Abschluss werden zwei feuchte Filterpapiere auf der Membran positioniert und ein ca. 10 cm hoher Papierhandtuch Stapel, der mit einer Glasplatte und einem Gewicht von ca. 0,5 kg beschwert wird. Durch Diffusion der Flüssigkeit in Richtung der trockenen Papierhandtücher wird die RNA vom Gel auf die Membran transferiert. Der Kapillarblot wurde nach 16-20 h vorsichtig abgebaut, wobei die Taschen auf der Membran mit Bleistift markiert wurden und die Membran wird für 10 Min in 2 x SSC gewaschen. Nach dem Trocknen durch auflegen auf Whatmann Papier, wurden beide Seiten der Membran 30 Sek mit dem UV-Crosslinker bestrahlt

und für 2h bei 80 °C im Trockenschrank gebacken. Der so getrocknete Blot kann bei RT im Dunkeln mehrere Monate aufbewahrt werden.

Die Hybridisierung zum Nachweis der RNA auf der Membran erfolgte mit einer Digoxigenin markierten cDNA-Sonde (siehe 2.2.3.5). Diese wurde fünf Minuten bei 94 °C denaturiert und sofort zum Abkühlen auf Eis gestellt.

Die Membran wurde in den Roller Ofen in einer Rollerfasche (150 mm x 35 mm) gegeben erst für 1 h bei 50 °C in Prähybridisierungslösung und anschließend ÜN bei 50°C in Hybridisierungslösung inkubiert. Es wurde 3 x 20 Min bei 50 °C in Waschpuffer gewaschen.

Zum Nachweis der Dig-markierten RNA wurden folgenden Waschschritte bei RT ausgeführt:

5 Min	Hochsalzpuffer mit Tween
1 h	Hochsalz/Tween + 5 % Blocking Lösung
30 Min	Hochsalz/Tween/Blocking + AntiDig-Antikörper (1:20000)
4 x 10 Min	Hochsalz/Tween
5 Min	Detektionspuffer

Die Detektion erfolgte mit 5 µl CDP-Star in 495µl Detektionspuffer. Um eine bessere Verteilung des chemilumineszenten Substrats zu erreichen, wurde die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen und nach fünf Minuten wurde die Chemilumineszenz auf den Membranen mit einem Bio-Rad Multi-Imager System aufgezeichnet.

Prähybridisierungslösung:	20 ml Dig Easy Hyb (vorgewärmt)
	6 ml Lösung + 300 µl Blockinglösung
Hybridisierungslösung	6 ml Lösung + 300 µl Blockinglösung + 15 µl

2.2.3.3 Reverse Transkription (cDNA Synthese)

Bei der reversen Transkription von RNA in cDNA handelt es sich um einen Nachweis der Genexpression von spezifischen Genen in Geweben oder Zellen. Für den Ansatz wurden 5 µg der Gesamt RNA in einem 10 µl Ansatz eingesetzt.

RNA template	4 µl
Random Hexamer Primer (50 pmol/µl)	1 µl

Wurden im Thermocycler für 10 Min auf 60 °C erhitzt, kurz auf Eis gestellt, anzentrifugiert und für 15 Min bei RT inkubiert.

Anschließend wurden die folgenden Komponenten zusammen pipettiert, gemischt und dann zum Ansatz gegeben:

dNTPs (je 10 mM)	0,5 µl
5 x RT Puffer	2 µl
H2OMillipore sterilfiltriert und autoklaviert	5 µl
MMLV RT (H-) (200 U/µl)	0,5 µl

Im Thermocycler wurde der Ansatz für 60 Min bei 42 °C und im Anschluss für 15 Min bei 70 °C inkubiert, auf Eis gestellt, kurz anzentrifugiert und für die Verwendung als Vorlage in der PCR 1:5 mit H2O verdünnt. Zur Aufbewahrung wurde die cDNA bei 4 °C im Kühlschrank oder bei -80 °C deponiert.

2.2.3.4 Polymerasekettenreaktion („quantitative“ PCR)

Für die PCR mit spezifischen Primern von IFR1, TOB, FOS und CAII wurde die zur ursprünglichen, aus embryonalen Erythrozyten gewonnenen RNA komplementäre cDNA verwendet. Vor der RNA Isolierung wurden die Erythrozyten für 4 h mit Noradrenalin inkubiert, um so die erhaltene mRNA Menge zu erhöhen.

PCR zum Nachweis von 18s und 28s rRNA

Folgender 40 µl Ansatz wurde für die PCR verwendet, dabei wurden die in Tabelle 2.1 aufgeführten Primerpaare pipettiert.

cDNA template	2 µl
H2OMillipore	8 µl
Sense-Primer (s) (100 pmol/µl)	0,1 µl
Antisense-Primer (as) (100 pmol/µl)	0,1 µl
H2O	32,1
10 x NH4-PCR-Puffer	5 µl
MgCl2 (50 mM)	1,5 µl
dNTPs (je 10 mM)	1 µl
PanScript (5 U/µl)	0,2 µl

Durchgeführt wurde das PCR Programm:

94 °C	2 Min 30 Sek
56 °C	1 Min
72 °C	1 Min
94 °C	1 Min
56 °C	1 Min
72 °C	1 Min

Anschließend wurden je 9 µl PCR Produkt zu 1 µl Auftragspuffer gegeben und auf ein 2%iges Agarosegel mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid geladen. Der Standard wurde ganz rechts aufgetragen. Das Gel wurde unter UV-Licht fotografiert (Bioprint).

2.2.3.5 PCR zur 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:

	Kontrolle	Sonde
cDNA Template aus RT-PCR	2 µl	2 µl
Primer „sonde1(s)“ (10 pmol/µl)	0,5 µl	0,5 µl
Primer „sonde1(as)“ (10 pmol/µl)	0,5 µl	0,5 µl
H2O (Millipore, autoklaviert und sterilfiltriert)	11 µl	9 µl
10 x NH4-Reaktionspuffer	2,5 µl	2,5 µl
MgCl2-Lösung (5 mM)	7,5 µl	7,5 µl
Dig-dNTP-Mix (0,7 mM Dig-dUTP; 1,3 mM dTTP; je 2 mM dATP, dCTP, dGTP)		2,5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl	
PanScript DNA Polymerase (0,625 U/µl)	0,5 µl	0,5 µl
Gesamt	25 µl	25 µl

PCR Programm:

94 °C 2 min 30 s

57 °C 1 min

72 °C 1 min

94 °C 1 min

57 °C 1 min 35 Zyklen

72 °C 1 min

94 °C 1 min

57 °C 1 min

72 °C 10 min

15 °C ∞

Zur Überprüfung wurde je 1 μ l der Kontrolle oder der Sonde mit 3,5 μ l H₂O und 0,5 μ l Auftragspuffer versehen und auf einem 2%igen Agarosegel mit 0,2 μ g/ml Ethidiumbromid aufgetragen. Die Sonde wurde mit 75 μ l H₂O verdünnt, in zu fünf Portionen à 20 μ l aufgeteilt und bei -80 °C eingefroren.

2.2.3.6 Chemischer Crosslink

Der chemische Crosslink stellt eine Möglichkeit dar, die Assoziation von IFR1 mit anderen Proteinen oder mRNA zu untersuchen. Dafür können verschiedene Crosslinker verwendet werden.

2.2.3.6.1 Probenvorbereitung

Der chemische Crosslink wurde mit einem Polysomenpellet nach einer zweiten Ultrazentrifugation durchgeführt, wobei das Pellet mit Gradientenpuffer auf die gewünschte Konzentration von 0,2 μ g/ μ l und das gewünschte Endvolumen von 200 μ l verdünnt wurde. Sowohl die Crosslinkproben als auch die Kontrolle wurden in einem gemeinsamen Ansatz pipettiert und erst vor dem eigentlichen Crosslink getrennt.

2.2.3.6.2 Chemischer Crosslink mit DSS und DMP

Für die chemischen Crosslinks wurde zum einen der wasserunlösliche, ungeladene, membranpermeable, homobifunktionelle N-Hydroxysuccinimide Ester (= NHS Ester) DSS (= Disuccinimidyl Suberat) verwendet. Er reagiert mit Primären Aminogruppen (-NH₂) in Puffern mit dem pH Wert von 7 bis 9, und bildet dabei stabile Amid Bindungen aus. Ziele der NHS Ester sind die Primären Amine in der Seitenkette von Lysin in Proteinen oder am N-Terminus von jedem Polypeptid. Zum anderen wurden die Crosslink Versuche mit DMP, einem wasserlöslichen, membranpermeablen, homobifunktionalem Imidoester durchgeführt. Seine funktionelle Gruppe, ein Imidoester, acetyliert spezifisch Primären Amine (-NH₂) und hat eine sehr geringe Kreuzreakтивität zu anderen nukleophilen Gruppen in Proteinen [Hand und Jencks, 1962; Mattson, 1993]. Zudem beeinflusst das Endprodukt der Imidoamid Reaktion nicht die Ladung der Proteine, ihre native Konformation oder die Aktivität des Proteins.

Das verdünnte Polysomenpellet mit einer Endkonzentration von 0,2 μ g/ μ l Gesamtprotein wurde in vier Ansätze à 200 μ l aufgeteilt und mit je 20 μ l (1/10 des Gesamtvolumens) 1mM, 2,5mM, 5mM DSS in DMSO bzw. mit 20 μ l 1mM, 2,5mM und 5mM DMP in HBS-Puffer versetzt und für 30 Min bei RT inkubiert. Als Kontrolle wurden 20 μ l DMSO bzw. 20 μ l HBS-Puffer mit dem verdünnten Polysomenpellet inkubiert. Der Crosslink wurde mit 11 μ l (1/20 des Gesamtvolumens) 1M Tris-HCl pH 7,5 unter Inkubation für 15 Min auf Eis, abgestoppt.

2.2.3.6.3 *Detection of Crosslinks via Western Blot*

Um den Crosslink im Western Blot nachweisen zu können, wurden die Crosslinkproben und Kontrollen mit Aceton gefällt. Dazu wurde zu den Proben je 4 Volumenteile eiskaltes Aceton p.a pipettiert und das Protein ÜN bei -20°C gefällt. Anschließend wurden die Proben aufgetaut, gevortext und für 10 Min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Pellets luftgetrocknet und in 30 µl 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die DMSO Kontrolle wurde in 60µl 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen, um eine höhere Verdünnung zu erhalten, da die Signale der Kontrolle bei der Detektion sonst die Signale des Crosslinks überstrahlen würden. Für die SDS-PAGE wurden dann je 10 µl je Crosslink/Kontrolle pro Spur auf ein 8% Polyacrylamidgel geladen. Die SDS-PAGE, der Western Blot sowie die Detektion wurden wie unter 2.2.2.5 beschrieben durchgeführt. Der Transfer der Proteine lief für 1h bei 20mA/Gel.

2.2.3.7 UV Crosslink von Nukleinsäuren und IFR1

Durch den Einsatz von ultraviolettem Licht der Wellenlänge 253nm können photochemische Crosslinks zwischen Proteinen und RNA induziert werden. Die so reaktivierten Heterozyklen der Basen können eine kovalente Bindung mit benachbarten Proteinen oder Nukleinsäuren eingehen [Meisenheimer und Koch, 1997] Bei der Verwendung eines nativen Protein-RNA-Komplexes können mit dieser Technik Interaktionen zwischen Proteinen und RNA charakterisiert werden [Haynes, 1999].

2.2.3.7.1 Probenvorbereitung

Der UV Crosslink wurde mit dem Pellet nach einer zweiten Ultrazentrifugation durchgeführt, wobei das Pellet mit Puffer A auf die gewünschte Konzentration und das gewünschte Endvolumen verdünnt wurde. Sowohl die Crosslinkproben als auch die Kontrollen wurden in einem gemeinsamen Ansatz pipettiert und erst vor dem eigentlichem Crosslink getrennt.

2.2.3.7.2 UV Crosslink

Ein gekühlter Metallblock wurde mit Parafilm überzogen und mit dem Boden eines Cups kleine Vertiefungen in den Parafilm gemacht. Jeweils 15µl sowohl der zu Crosslink Proben als auch der Kontrollen wurden in die Vertiefungen pipettiert. Der Metallblock mit den Crosslinkproben wurde in einem Crosslinker der Firma STRADA in einem Abstand von ca. 8cm von der Lichtquelle aufgestellt, und für 15min mit UV-Licht der Wellenlänge 253nm bestrahlt. Der Kontrollblock wurde für 15min neben den

Crosslinker gestellt, ohne bestrahlt zu werden. Nach 15min wurden alle Crosslinkproben und alle Kontrollen vom Parafilm eingesammelt und vereinigt.

2.2.3.7.3 Detektion des Crosslinks über Western Blot

Crosslink und Kontrolle wurden mit 3x SDS-Probenpuffer im Verhältnis 2:1 versetzt und anschließend auf ein 8% Polyacrylamidgel aufgetragen. Um zu verhindern, dass das in diesen Mengen aufgetragene IFR1 alle anderen Signale überstrahlt, wurde nach der SDS-PAGE und dem Western Blot (1h bei 20mA/Gel) die Membran oberhalb der 45 kD Markerbande waagrecht zerschnitten. Die so erhaltenen beiden Membranteile wurden getrennt voneinander im Multi-Imager analysiert.

2.2.3.8 Silencing von mRNA mittels siRNA

RNA interference ist ein effektives Werkzeug um die Genexpression in verschiedenen Organismen (Pflanzen, Insekten und Nematoden) und in der Zellkultur von Säugerzellen zu inhibieren. Durch das Einbringen von siRNAs in Zellkulturzellen kann eine bestimmte mRNA spezifisch in ihrer Menge reduziert werden. Es wurde herausgefunden, dass kurze dsRNA (weniger als 30 Nukleotide), bezeichnet als small interfering RNAs (si RNA), Gen spezifisches Silencing in Säugerzellen hervorrufen kann [Caplen, 2001].

Mit dem von der MWG-Biotech AG kostenlosen siRNA Such Programm (siRNAdesign) wurden insgesamt 51 verschiedene siRNAs für die *Gallus gallus ifr1* mRNA designt. In dieser Dissertation wurde nur eine synthetisierte siRNA in den Versuchen eingesetzt, die einerseits aus dem mittleren Teil der mRNA stammt und zudem eine recht hohen Übereinstimmung mit der IFR1 Sequenz hat, also gute Voraussetzungen für eine erste Transfektion darstellte.

In Vorversuchen wurde die Effektivität der siRNA in Abhängigkeit vom verwendeten Transfektionsreagenz, vom Medium und bestimmten Inkubationsbedingungen ausgetestet. Es stellte sich heraus, dass mit DMRIE-C eine Transfektion in Tag 14 Erythrozyten erreicht werden konnte. Alle anderen Transfektionsreagenzien brachten nur ein sehr geringes oder gar kein silencing.

Aus diesem Grund wurde für die isolierten NoA-induzierten Tag 14 Erythrozyten auch die Anleitung für Suspensionszellen optimiert. So wurden Tag14 Erythrozyten in Waschpuffer pH 7,4 gesammelt und mit PBS dreimal gewaschen. Laut Gebrauchsanweisung wurden die Liposomen 1:40 in 0,5ml Ham's F10 Medium pH 7,2 vorverdünnt und anschließend die siRNA im Verhältnis 1µg siRNA zu 12 µl Liposomen oder eben. Der Zytokrit sollte bei der Transfektion 2% betragen, deshalb wurden 10µl

gepackte Erythrozyten dazu pipettiert. Das Liposomen/Erythrozyten Gemisch mit siRNA wurde bei 37°C für 2 Stunden mittelstark geschüttelt. Nach der Zugabe von 10% FCS wurde der gesamte Ansatz für eine weitere Stunde bei 37°C und mittelstarkem Schütteln inkubiert. Abschließend wurde 10µM NoA zugegeben und für weitere 4 Stunden bei 37°C mittelstark schüttelnd inkubieren. Die transfizierten Erythrozyten wurden zweimal in PBS gewaschen. Von den so erhaltenen Proben wurde der Hämoglobin gehalt bestimmt und SDS-Proben für den Westernblot wurden wie in Material und Methoden beschrieben hergestellt. Im 10 %igen SDS-Gel wurden 50µg Hb pro Spur aufgetragen.

2.2.4 Ultrazentrifugation

2.2.4.1 30% Saccharosekissen

Für die Herstellung eines Polysomenpellets mittels eines 30%igen Saccharosekissens wurden 4 ml 30%ige Saccharoselösung in ein Beckman Ultrazentrifugenröhren eingefüllt und 8ml des aufgetauten Hämolsats (siehe 2.2.1.5) vorsichtig darüber geschichtet. Im TST 41.14 Ausschwingrotor wurden die Hämolsate für 16h bei 30000 upm (120000 x g) und 4 °C in der Kontron Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Polysomenpellet wurde zweimal kurz mit Gradientenpuffer gewaschen und anschließend in 400 µl Gradientenpuffer aufgenommen. Der Gesamtproteingehalt wurde nach der Proteinbestimmung nach Bradford bestimmt.

2.2.4.2 Dichtegradientenzentrifugation mit Saccharose (kontinuierlichen Saccharosegradienten)

Bei der Dichtegradientenzentrifugation handelt es sich um ein physikalisches Trennverfahren, wobei gelöste Makromoleküle mittels einer Ultrazentrifuge anhand ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit aufgetrennt werden. Bei der Trennung sedimentieren die unterschiedlich dichten Moleküle (Makromolekül / Protein / Ribosom-Komplex) solange wie ihre Dichte größer ist, als die Dichte des Lösungsmittels und umso schneller, je größer der Dichteunterschied ist.

Zum Giessen des 10-35%igen linearen Saccharosegradienten wurden 5 ml der 35%igen Saccharoselösung in einem Ultrazentrifugenröhren vorgelegt und kurz in flüssigem Stickstoff gefroren. Darauf wurden 4 ml der 20%igen Lösung pipettiert, ebenfalls kurz gefroren und mit 4 ml der 10%igen Lösung vorsichtig überschichtet. Das Röhren wurde mit Parafilm überschichtet und bei -20 °C stehend gelagert. Bei

Bedarf wurde der Gradient 30 Min stehend aufgetaut und anschließend für 3 h bei RT horizontal auf einer waagrechten Fläche abgelegt. Der Gradient wurde aufgestellt und 500 µl wurden von oben abgenommen. Nach dem Beladen des Gradienten mit dem Polysomenpellet (entsprechend 2500µg Gesamtprotein) ohne weitere Behandlung des Pellets (= Kontrolle), wurden die Zentrifugenbecher austariert und in einem TST 41.14 Ausschwingrotor für 1 h 25 Min bei 40000 upm (120000 x g) und 4 °C, ohne Bremse, zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die Abnahme des Gradienten. Für die Fraktionen 1-10 wurden mit einer Pipette von oben jeweils 500 µl vorsichtig abgenommen und für die Fraktionen 11-16 je 1 ml. Die Abnahme erfolgte auf Eis in 1,5 ml Cups. Nach dem kurzen vortexen und anzentrifugieren wurden je Fraktion 2 x 50 µl direkt für die RNA-Isolierung und die Acetonfällung abgenommen. Zudem wurden 100 µl für die RNA- und die Saccharosekonzentrationsbestimmung separiert.

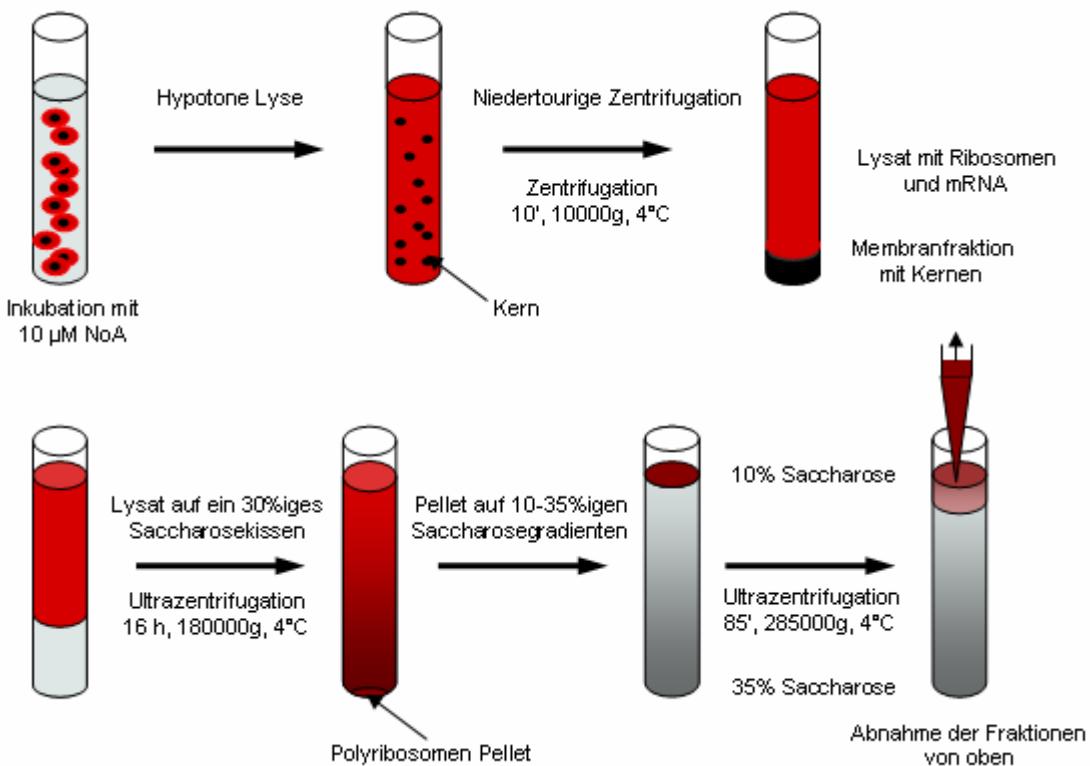


Abbildung 2.1 Schema der Low-speed Zentrifugation und der anschließenden Ultrazentrifugation zur Gewinnung des Polysomenpellets.

2.2.4.3 Abweichende Saccharosegradienten für die Interaktionsstudien

Für die Behandlung mit EDTA wurde den verschiedenen Saccharoselösungen 20 mM EDTA zugesetzt, das Polysomenpellet wurde vor dem Auftrag auf den Gradienten auf eine Konzentration von 20 mM EDTA gebracht und bei 4 °C für 20 Min inkubiert.

RNAseA wurde zu einem Polysomenpellet in einer Endkonzentration von 100 µg/ml pipettiert und zusammen für 15 Min bei 4 °C inkubiert, bevor es auf den unveränderten Gradienten aufgebracht wurde.

Bei der Kombination von RNAseA und EDTA Behandlung, wurde das Polysomenpellet erst mit 100µg/µl RNAseA behandelt und dann 20 mM EDTA zugegeben. Die Inkubationen mit RNAseA und EDTA erfolgen wie oben beschrieben. Das behandelte Polysomenpellet wurde auf einen EDTA-Gradienten geladen.

Für die Studien zur Salzsensitivität wurde eine Polysomenprobe mit 4M KCl-Lösung auf eine Konzentration von 0,5 M KCl und 0,9 M KCl gebracht, 10 Min bei 4 °C inkubiert und auf einen Gradienten geladen, der die gleiche Konzentration von KCl Salz enthielt.

2.2.4.4 Proteinfällung mit Aceton

Die gesammelten Fraktionen wurden für die SDS-PAGE mittels Acetonfällung aufbereitet. Dazu wurden für 0,5 M KCl-, EDTA-, EDTA-RNAse- und Kontroll-Gradienten je 50 µl Fraktion mit 200µl H₂O_{bidest.} verdünnt (für den 0,9 M KCl-Gradient 25 µl Fraktion + 225 µl H₂O_{bidest.}), mit 1 ml eiskaltem Aceton p.a. versetzt, gevortext und für 2 h bei -80 °C oder ÜN bei -20 °C gefällt. Für die weitere Verarbeitung wurden die Proben aufgetaut, gevortext und für 10 Min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Pellets luftgetrocknet und anschließend in 25 µl (12 µl bei 0,9 M KCl) 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Für die SDS-PAGE wurden dann je 10 µl je Fraktion, pro Spur geladen.

2.2.4.5 Saccharosekonzentrationsbestimmung mit dem Refraktometer

Das Abbe-Refraktometer ist ein optisches Messgerät zur Bestimmung des Brechungsindexes von Flüssigkeiten. Um die Saccharosekonzentration der einzelnen Fraktionen zu bestimmen, wurden je 80 µl der Fraktion auf das aufgeklappte Doppelprisma aufgebracht und das Prisma verschlossen. Im rechten Okular wurde die Grenzfläche zwischen dem hellen und dem dunklen Teil des Gesichtsfeldes auf die Mitte des Fadenkreuzes gedreht und durch Drehen des Kompensators am Tubus des Okulars scharf gestellt. Im linken Okular (Ablesemikroskop) kann nun die optische Dichte in % abgelesen werden.

2.2.4.6 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-Gefäß angesetzt. Das Gesamtvolumen betrug 15 µl.

2.2.5 Software und Internetdienste

Der Text und die Tabellen wurden mit den Programmen Word und Excel für Windows, Version 2003 (Microsoft) auf einem Personal Computer erstellt. Die Diagramme wurden mit Power Point für Windows Version 2003 (Microsoft) oder mit Excel für Windows Version 2003 erstellt. Die Auswertung der Multi Imager Daten erfolgte unter Verwendung der Bio Rad Multi-Analyst Software Version 1.1. Für die Literatursuchen wurde das PubMed Suchprogramm benutzt. Die Erstellung des Literaturverzeichnisses erfolgte mit dem Programm Endnote 8.0 für Windows (Thomson Reuters, Research Information Systems Inc., Carlsbad, USA). Für DNA-Sequenzuntersuchungen wurde das Programm Generunner (Hastings Software Inc.) verwendet.

2.2.6 Statistik

Sämtliche Ergebnisse der in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen von Western Blots, RT-PCR und Far Western wurden, sofern nicht anders angegeben, dreimal wiederholt. In den Abbildungen ist nur ein Beispiel gezeigt. Signifikanzberechnungen zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des Student's unpaired t-test durchgeführt. Ein p-Wert von <0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet und in den jeweiligen Graphen mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Regulation von IFR1 und TOB in Abhängigkeit vom Entwicklungstag

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ab welchen Entwicklungstagen des Hühnerembryos die Synthese der Proteine IFR1 und TOB unter der Stimulation mit Noradrenalin (NoA) induzierbar sind. Im Weiteren wurde die Stabilität und Induzierbarkeit, sowie die Lokalisierung von IFR1 und TOB in mittleren und späten Tagen der Embryonalentwicklung untersucht, um Anhaltspunkte für den Einfluss dieser Proteine auf die terminalen Differenzierung zu finden.

3.1.1 Expression von IFR1 und TOB in primitiven und frühen definitiven Erythrozyten

Aus früheren Untersuchungen in primitiven Erythrozyten ist bekannt, dass sowohl die *fos*, *ifr1* und *tob* mRNA, als auch das FOS Protein durch NoA induziert werden können [Dragon, 2002]. Es lag deshalb nahe, die Proteinexpression von IFR1 und TOB im Vergleich zu FOS in primitiven Erythrozyten genauer zu untersuchen, um eine mögliche Funktion der Proteine während der Differenzierung zu klären.

Der Northern Blot in Abbildung 3.1 zeigt, dass die Genexpression von *ifr1* und *tob*, sowie für *fos* (für *fos* wurde die mRNA Expression 2002 von Dragon et al. bereits gezeigt) mit NoA in primitiven Tag 5 Erythrozyten induziert werden kann.

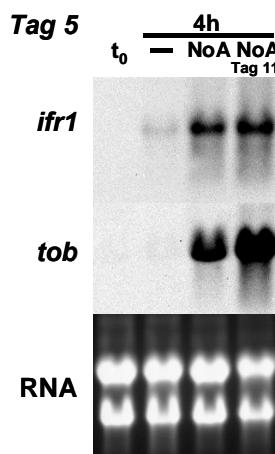


Abbildung 3.1 NoA induzierte Expression in primitiven Erythrozyten.

Tag 5 und Tag 11 Erythrozyten wurden für 4 Stunden mit 10 µM NoA inkubiert und die Genexpression wurde im Northern Blot (n=3) bestimmt (Auftrag 10µg RNA pro Spur, t₀ uninduzierte Erythrozyten).

In den frühen primitiven Stadien kommt es nach Stimulation der Erythrozyten mit 10 μ M NoA für 4 Stunden, nur zur Translation von FOS [Dragon, 2002], welches im Western Blot als 55 kD Proteinbande auftaucht, während die Translation von IFR1 und TOB unterdrückt ist (siehe Western Blot Abbildung 3.2 Tag 5 und 7).

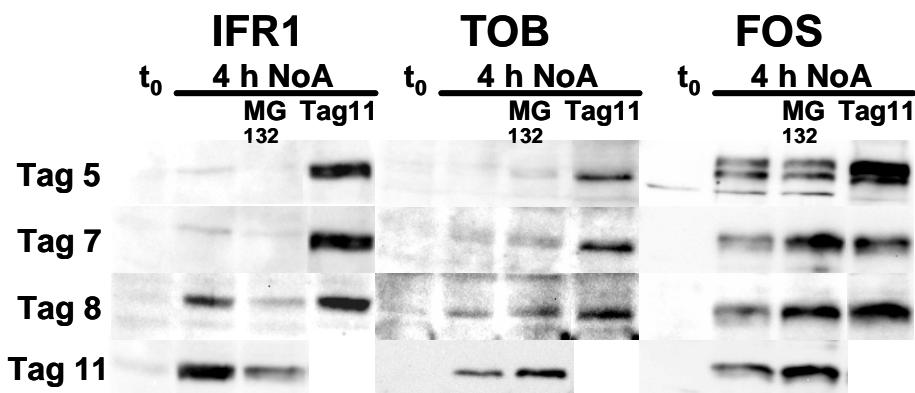


Abbildung 3.2 NoA induzierte Expression in primitiven, frühen und späten definitiven Erythrozyten.

Tag 5 bis Tag 11 Erythrozyten wurden für 4 Stunden mit 10 μ M NoA (+/- MG 132) inkubiert und die Proteinexpression wurde im Western Blot ($n=3$) bestimmt (100 μ g Hb pro Spur aus Ganzzell-Lysat, t_0 Ganzzell-Lysat aus uninduzierte Erythrozyten, Tag 11 als direkter Vergleich).

Es könnte sich dabei um einen Mechanismus der unreifen erythroiden Zellen handeln, der die mRNA in einem inaktiven Status hält, da die translatierten Proteine möglicherweise auf die Reifung der erythroiden Zellen einen hemmenden Einfluss haben könnten.

Der Proteasomen-Inhibitor MG 132 führt zu einer Inaktivierung der multikatalytischen Protease und es kommt dadurch in den meisten Zellen zu einem Anstieg der Proteinkonzentration. Durch die Hemmung des Proteinabbaus können mögliche Interaktionen der Proteine untereinander bestimmt werden. In Gegenwart von MG132 lässt sich die Expression von IFR1 und TOB in primitiven Erythrozyten nicht steigern, FOS ist weiterhin induziert. Da sich IFR1 und TOB werden in den Erythrozyten nicht translatiert, da sie sich bei Zugabe von MG132 nicht anhäufen.

Erst ab Tag 8 können in den Ganzzell-Lysaten IFR1 als 48,8 kD, TOB als 36,0 kD im Western Blot nachgewiesen werden (Abbildung 3.2). Durch die Zugabe von MG132 zeigt TOB ein leicht verstärktes Western Blot Signal, da es ohne MG132 durch Proteasomen [Sasajima, 2002] wieder abgebaut wird. Im Gegensatz dazu wird das IFR1 Signal schwächer. Dies lässt darauf schließen, dass die Transkription oder die Translation von IFR1 durch andere Proteine, wie z.B. TOB, die nicht mehr über das Proteasom abgebaut werden, gehemmt oder abgebaut wird.

3.1.2 Noradrenalin induziert IFR1 und TOB in Tag 11 Erythrozyten

Dragon et al. konnten bereits 2002 in Tag 11 Erythrozyten des Hühnerembryos nachweisen, dass sowohl die mRNAs von *fos*, *ifr1* und *tob*, als auch die Expression von FOS mit NoA *in vitro* induziert werden können. Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit die zeitabhängige Expression (über 4 Stunden) der Proteine IFR1 und TOB in Tag 11 Erythrozyten, in Abhängigkeit von NoA, untersucht werden.

Nach Stimulation von Tag 11 Erythrozyten mit 10 μ M NoA, über einen Zeitraum von 15 bis 240 Minuten, konnten in den Ganzzell-Lysaten IFR1, TOB und FOS im Western Blot nachgewiesen werden (Abbildung 3.3). Als Ladungskontrolle wurde das PolyA-bindende Protein PABP (71 kD) gewählt, das in Erythrozyten aller Entwicklungstage gleich stark exprimiert wird. Nach 30 Minuten Inkubation mit NoA konnten die ersten TOB Signale detektiert werden, die bei 2 Stunden ihr Maximum aufwiesen und bei 4 Stunden bereits wieder abfielen. Ebenso steigt FOS nach 60 Minuten auf ein Maximum bei 4 Stunden an [Dragon, 2002]. Im Gegensatz dazu ist IFR1 bereits gering konstitutiv exprimiert und steigt ab einer Inkubationszeit von 2 Stunden an. Die Induktion von IFR1, FOS und TOB kann, wie erwartet, durch den β -adrenergischen Rezeptorantagonist Propranolol blockiert werden.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Proteine von *tob*, *ifr1* und *fos* zeitlich versetzt exprimiert werden und nach unterschiedlich langer Inkubation mit NoA, ihre maximale Expression erreichen. Die erhöhte Proteinexpression ist demnach Ursache einer erhöhten mRNA-Expression [Dragon, 2002].

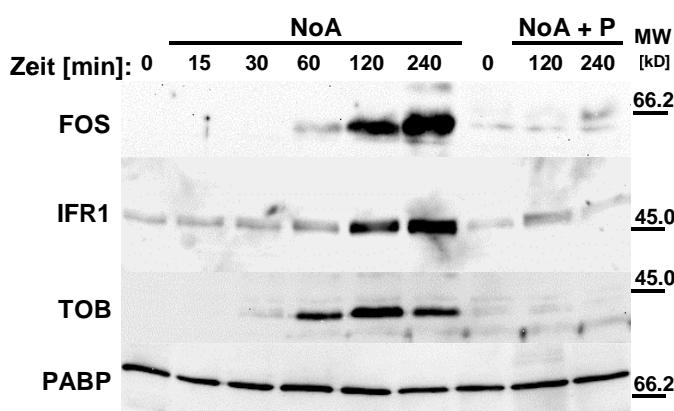


Abbildung 3.3 Proteinexpression von IFR1 und TOB in Tag 11 Erythrozyten.

Vor (0 Min) und zu verschiedenen Zeitpunkten (15 – 240 Min) der Inkubation mit 10 μ M NoA +/- 10 μ M Propranolol. Im Western Blot (n=3) wurden 100 μ g Hb pro Spur aus Ganzzell-Lysat aufgetragen.

Neben NoA können die Proteine IFR1, TOB und FOS auch durch den Adenosin A₂ Rezeptor-Agonisten CPCa oder durch die direkte Stimulierung der Adenylylcyclase mit Forskolin induziert werden (Abbildung 3.4). Beide führen wie NoA zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration und regulieren die Genexpression von *ifr1*, *fos* und *tob*. Mit CPCa und Forskolin kann diese ebenfalls gesteigert werden [Dragon, 2002].

Im Folgenden wurde getestet, ob die Induktion von IFR1, TOB und FOS in Tag 11 Erythrozyten von der Aktivierung der Proteinkinase A abhängig sind (Abbildung 3.4). Dazu wurde der PKA-spezifischen Inhibitors H89 zusammen mit NoA inkubiert. Da cAMP in vielen Fällen in der Lage ist die Genexpression durch Proteinkinase A-abhängige Phosphorylierung von CREB-like Transkriptionsfaktoren zu aktivieren (siehe Einleitung Abbildung 1.3) [De Cesare, 1999; Shaywitz und Greenberg, 1999], könnte dies ein Anhaltspunkt dafür sein, dass die Regulierung von *ifr1*, *fos* und *tob* Gene über eine CREB-abhängige Aktivierung der Transkription abläuft [Maas, 2003].

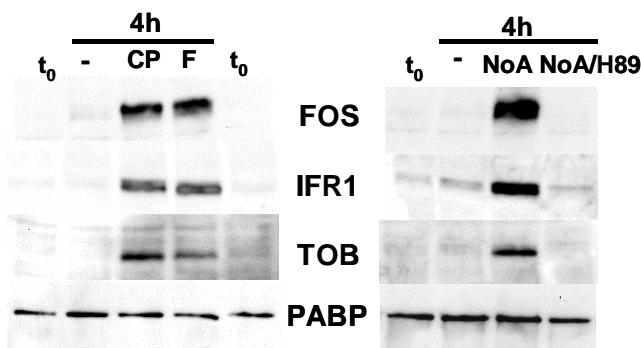


Abbildung 3.4 Western Blot Analyse der Induktion von IFR1 und TOB von Tag 11 Erythrozyten.

Inkubation für 4 Stunden mit 10μM CPCa (CP), 100 μM Forskolin (F) oder mit 10 μM NoA/- 10 μM H89 (n=3). (t₀) Ganzzell-Lysat vor der Inkubation. Auftrag 100μg Hb pro Spur aus Ganzzell-Lysat.

3.1.3 Der Einfluss des Proteasomen-Inhibitors MG132 auf IFR1 und TOB in Tag 11 Erythrozyten

Um mögliche Interaktionen von IFR1 und TOB zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit durch Zugabe des Proteasomen-Inhibitors MG 132 zu NoA induzierten Tag 11 Erythrozyten der Proteinabbau gehemmt.

In einem ersten Versuch wurden Tag 11 Erythrozyten mit 10 μM NoA +/- MG132 für 16 Stunden inkubiert und die Proteinexpression im Western Blot nachgewiesen (Abbildung 3.5 A).

In der Anwesenheit des Proteasom Inhibitors MG132 nimmt das IFR1 Protein bei 16h Inkubation mit NoA signifikant ab (Abbildung 3.6). Das zum Vergleich mit aufgetragene CAII nimmt ebenfalls ab. Zur gleichen Zeit steigt der Gehalt an TOB Protein signifikant

Ergebnisse

an (Abbildung 3.6), so dass es möglich sein könnte, dass TOB die Expression von IFR1 inhibiert. Ohne MG132 gibt es weniger TOB Protein, als in der 4 Stunden NoA Inkubations-Kontrolle, da es nach 16-stündiger Inkubation bereits über das Proteasom abgebaut wird [Sasajima, 2002]. IFR1 ist, genau wie CAII, nicht vom Abbau betroffen, sondern akkumuliert über die 16-stündige NoA Stimulierung. Beides sind langlebige Proteine, die 24 Stunden unter NoA Stimulierung exprimiert werden.

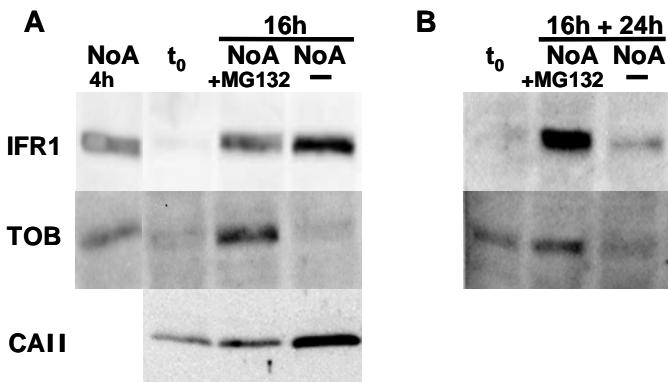


Abbildung 3.5 Western Blot Analyse (n=3) der Induktion von IFR1 und TOB von Tag 11 Erythrozyten +/- 10µM MG132.

(A) Inkubation der Erythrozyten für 16 Stunden mit 10µM NoA +/- 10µM MG132. t₀ Ganzzell-Lysat aus uninduzierten Erythrozyten. Expressionskontrolle 4 Stunden mit 10µM NoA.
(B) Inkubation für 16h mit 10µM NoA und folgende 24h Inkubation mit 10µM NoA +/- 10µM MG132.

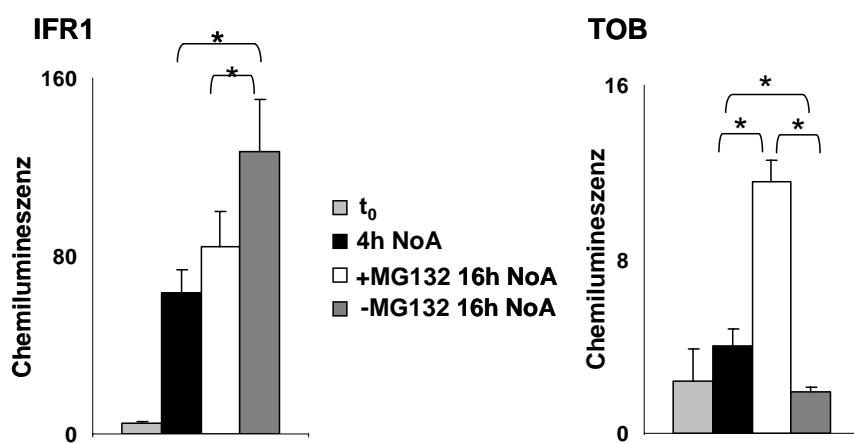


Abbildung 3.6 Graphische Darstellung der Western Blot Signale von IFR1 und TOB aus der Abbildung 3.5 A.

(Für die schwächeren TOB Signale wurde hier ein anderer Maßstab verwendet) n=3, * Signifikanznachweis t-Test.

Um zu zeigen, dass die Expression von IFR1 mit TOB zusammen hängt, wurden im zweiten Teil der Versuchsreihe Tag 11 Erythrozyten 16 Stunden mit NoA vorinkubiert und anschließend für 24 Stunden mit 10µM NoA +/- MG 132 behandelt (Abbildung 3.5 B).

Ergebnisse

Nach der Vorinkubation über 16 Stunden mit NoA ist wenig TOB in der Zelle vorhanden, da es über die Proteasomen abgebaut wird (Abbildung 3.5 A, 16h NoA). IFR1 akkumuliert in den Erythrozyten. Durch die anschließende 24-stündige Inkubation mit MG132, kommt es zu einem Anstieg der Proteinexpression von IFR1 und TOB. Durch die Inhibition des Proteasoms kann das bis dahin gebildete Protein von IFR1 und TOB akkumulieren. Allerdings kann die geringe Menge von TOB IFR1 nicht inhibieren, welches sich über die insgesamt 40 Stunden angesammelt hat.

TOB wird bereits nach 12 Stunden NoA Inkubation abgebaut, IFR1 wird nach einer Gesamtinkubationszeit von 40 Stunden ebenfalls abgebaut (Abbildung 3.11). Deshalb führt die Inkubation ohne MG132 zu einem Abfall beider Signale im Western Blot.

3.1.4 Expression von IFR1 und TOB in definitiven Erythrozyten

17 bis 19 Tage alter Hühnerembryos

Aufgrund der Ergebnisse aus 3.1.1 die eine mRNA Expression von *ifr1*, *tob* und *fos*, allerdings keine Proteinexpression für IFR1 und TOB in NoA-induzierten primitiven Erythrozyten ergaben, wurde die Induzierbarkeit der Proteinexpression von IFR1, TOB und FOS in den späten Tagen der Erythrozytendifferenzierung untersucht.

Je nach Entwicklungsstand unterscheiden sich die definitiven Erythrozyten in ihrer Morphologie (siehe Einleitung Abbildung 1.2) [Bruns und Ingram, 1973].

Wie in Abbildung 3.7 zu sehen, erfolgt bei einer Stimulierung mit 10 μ M NoA für 4 Stunden bei allen späten Entwicklungstagen von Tag 17 bis 19 eine Induktion von IFR1, TOB und FOS in den Erythrozyten. Als Vergleich diente das Ganzzell-Lysat von Tag 11 Erythrozyten, PABP diente als Ladungskontrolle.

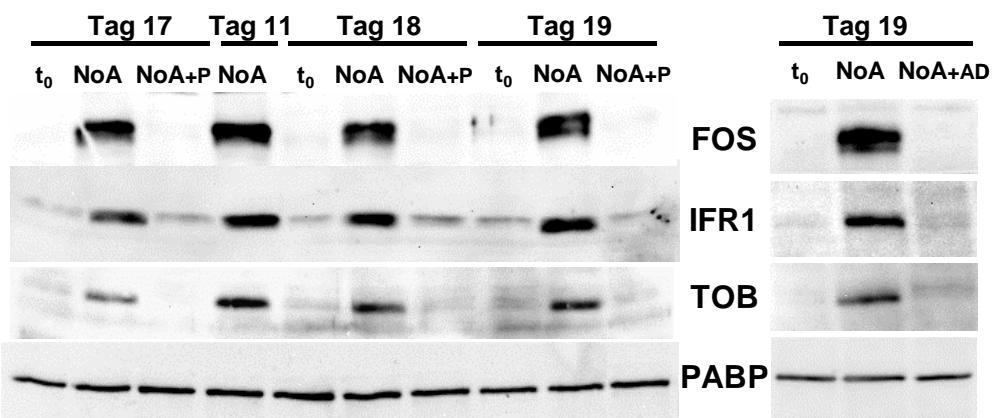


Abbildung 3.7 NoA-induzierte Proteinexpression von Tag 17 bis 19 und Tag 11 Erythrozyten.

Die Erythrozyten wurden für 4 h mit NoA behandelt, +/- Propranolol (P) oder +/- Actinomycin D (AD). Auftrag im Western Blot (n=3) je Spur 100 μ g Hb Ganzzell-Lysat.

Auch in den späten Tagen (Tag 17 bis Tag 19) der Embryoentwicklung ist eine Induktion der Proteinexpression in den definitiven Erythrozyten mit NoA immer noch möglich und ist auch nicht durch das unterschiedliche Entwicklungsstadium beeinflusst. Bei Stimulation der Erythrozyten mit NoA und der gleichzeitigen Zugabe von 10 μ M Propranolol, einem nicht selektiver Blocker der beiden β 1- und β 2-adrenergen Rezeptoren, wird die Proteinexpression von IFR1, TOB und FOS gehemmt. Damit wird die cAMP-abhängige Expression dieser drei Proteine in definitiven Erythrozyten bestätigt. Dragon et al konnten 2002 bereits zeigen, dass die mRNA Expression der drei Gene cAMP-abhängig ist. PABP wird von Propranolol nicht beeinflusst, da es nicht cAMP-abhängig induziert wird.

In Tag 19 Erythrozyten die mit NoA stimuliert wurden und zusätzlich mit 10 μ M Actinomycin D behandelt wurden, konnte ebenfalls eine Hemmung der Proteinexpression von IFR1, TOB und FOS festgestellt werden. PABP wird schon früher transkribiert und translatiert, weshalb Actinomycin D keinen Einfluss auf seine Expression hat.

Das interkalierende Antibiotikum Actinomycin D, welches die DNA-abhängige RNA-Polymerase blockiert, unterdrückt die Transkription der Gene in Tag 19 Erythrozyten. Die Möglichkeit in dieser späten Phase der Differenzierung noch Einfluss auf die Transkription von *ifr1*, *tob* und *fos* zu nehmen, könnte darauf hinweisen, dass sie unter den letzten Genen sind, die transkribiert und reguliert werden, bevor der Kern während der abschließenden erythroiden Reifung inaktiviert wird. Die Bedeutung kann dadurch untermauert werden, dass die Carboanhydrase II, in der terminalen Differenzierung der Erythrozyten auch cAMP abhängig induziert werden kann [Dragon und Baumann, 2003].

3.1.5 Untersuchung der Stabilität von IFR1 und TOB in Tag 11 und Tag 17 Erythrozyten

Wie in 3.1.4 festgestellt, kann selbst in sehr späten Stadien der Erythrozytendifferenzierung die IFR1- und TOB-Expression mit NoA stimuliert werden. Um die Dauer der NoA-Induzierbarkeit und die Stabilität von IFR1 und TOB sowohl auf Transkriptions-, als auch auf Translations-Ebene zu untersuchen, wurden Erythrozyten des 11. Entwicklungstages mit und ohne 10 μ M NoA inkubiert und über einen Zeitraum von 24h die mRNA und die Proteinexpression bestimmt. Für die IFR1 Proteinexpression sollte zudem geklärt werden, ob sich die Induzierbarkeit mit NoA über 72 h von Tag 11 zu Tag 17 Erythrozyten unterscheidet.

Die RT-PCR wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt, dabei wurde neben *ifr1* und *tob* auch die mRNA von *fos* und β -*globin* amplifiziert. β -*globin*

Ergebnisse

wurde in Tag 11 Erythrozyten durch die Stimulierung mit NoA nicht beeinflusst, die Genexpression ist gleich bleibend [Dragon, 2002] und dient hier als Kontrolle der RT-PCR (Abbildung 3.8). Für *fos*, *ifr1* und *tob* ergeben sich jeweils unterschiedliche Maxima, wie in den Graphen der Abbildung 3.9 zu sehen ist. So erreicht *fos* bereits bei 2 Stunden NoA Inkubation ein Maximum, während *ifr1* von 4 bis 12 Stunden ein Plateau erreicht und *tob* zwischen 4 bis 8 Stunden die stärksten Signale in der RT-PCR aufweist (Abbildung 3.8 und Graph Abbildung 3.9).

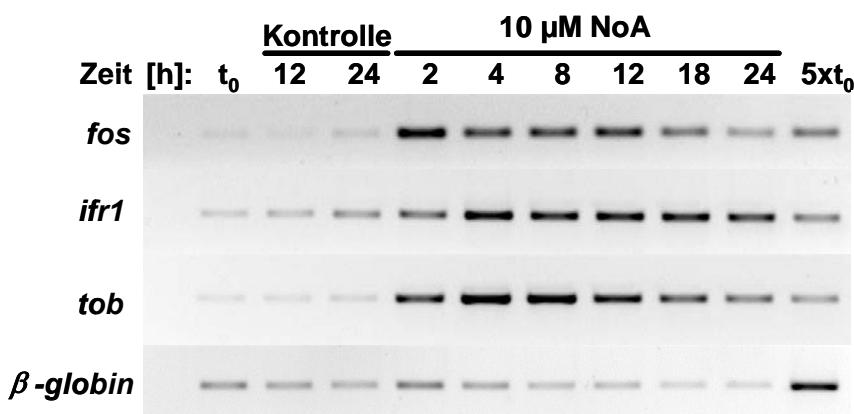


Abbildung 3.8 PCR Analyse ($n=4$) der cAMP-abhängige Genexpression von *ifr1*, *fos*, *tob* und β -globin in definitiven Erythrozyten von Tag 11.

Inkubation ohne (t_0) oder für 2 bis 24 Stunden mit $10 \mu\text{M}$ NoA oder für 12 und 24 Stunden ohne NoA als Kontrolle. Gleiche Mengen an cDNA wurden mit spezifischen Primer durch PCR amplifiziert (für t_0 auch die 5-fache Menge, $5xt_0$).

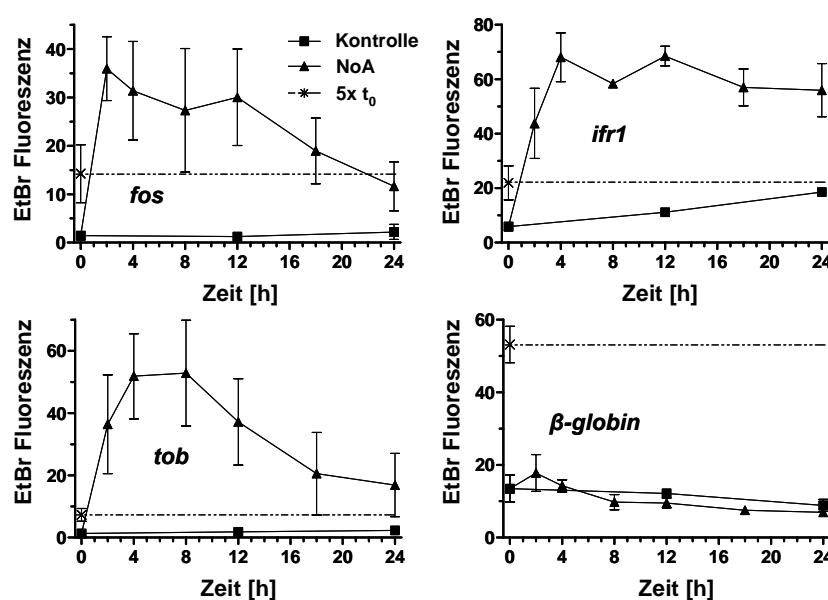


Abbildung 3.9 Auswertung der Ethidium Bromid (EtBr) Fluoreszenz der aufgetragenen PCR Produkte von *fos*, *ifr1*, *tob* und β -globin aus Abbildung 3.8 in Abhängigkeit von der Zeit in Stunden [h].

Ergebnisse

Im Vergleich zur mRNA sind im Western Blot (Abbildung 3.10) die Proteinexpressionen von FOS, IFR1 (Tag 11 und Tag 17) und TOB zu sehen. PABP dient als Ladungskontrolle, da es in Erythrozyten zu jeder Zeit gleich stark induziert ist. So folgt der Zeitverlauf des FOS Proteins dem Anstieg der *fos* mRNA Expression und bildet bei 2 Stunden ein Maximum (siehe Abbildung 3.8 und Abbildung 3.10), wie auch von Dragon et al 2002 bereits gezeigt werden konnte. Das IFR1 Protein wird fast parallel zur Bildung seiner mRNA translatiert (4 bis 12 Stunden) und erreicht, sowohl bei Tag 11, als auch bei Tag 17, zwischen 8 bis 12 Stunden ein Plateau. TOB erreicht sein Maximum bereits nach 2 Stunden NoA Inkubation, während seine mRNA nach 4 Stunden maximal transkribiert wird, es kommt zu einer Verschiebung der Proteinexpression. Die Kontrolle der TOB-Expression erfolgt post-translational auf Ebene der Proteine und nicht auf Ebene der mRNA.

Das TOB Protein geht der IFR1 Proteinexpression als kurzer Impuls voraus. Die beiden stabilen Proteine, IFR1 und FOS die über 18 Stunden hinweg akkumulieren, werden erst langsam abgebaut.

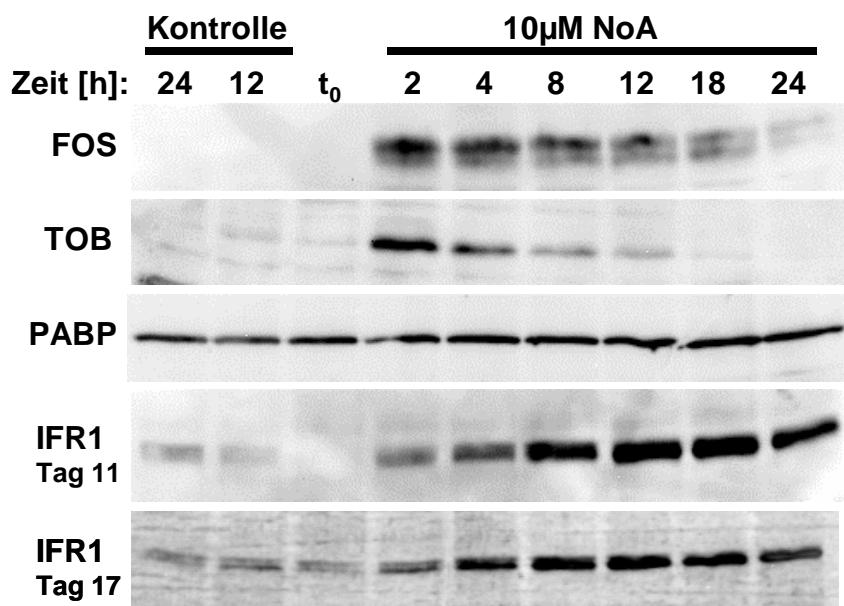


Abbildung 3.10 Western Blot Analyse (n=3) von Ganzzell-Lysaten mit unterschiedlich langen Induktionszeiten

cAMP-abhängige Expression der Erythrozyten von Tag 11 und Tag 17 (nur für IFR1) +/- 10 μM NoA über einen Zeitraum von (2 bis 24 h). Auftrag 100 μg Hb pro Spur.

Für IFR1 wurde die NoA-Induzierbarkeit und die Stabilitätsuntersuchungen in Tag 11 und Tag 17 Erythrozyten über 96 Stunden fortgeführt, da IFR1 nach 24-stündiger NoA Inkubation immer noch exprimiert wird. Dazu wurden Tag 11 bzw. Tag 17 Erythrozyten für 6 bis 96 Stunden mit 10 μM NoA stimuliert und die Proteinexpression im Western Blot nachgewiesen.

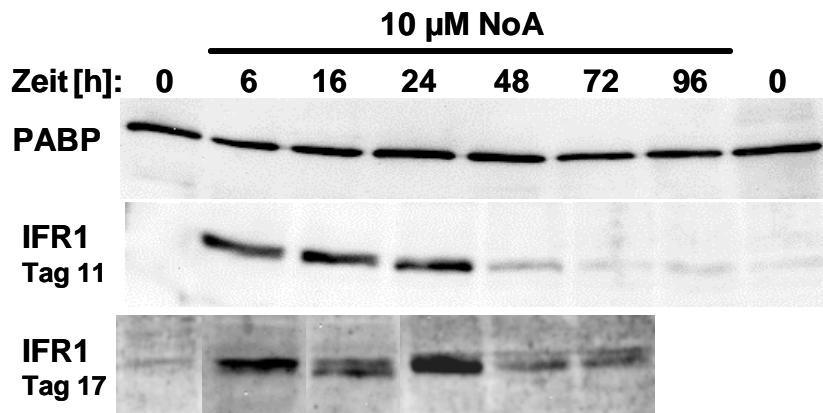


Abbildung 3.11 Stabilitätsnachweis von IFR1 in Tag 11 und Tag 17 Erythrozyten.

Dargestellt ist die Proteinexpression im Western Blot ($n=3$) unter permanenter NoA-Stimulierung ($10 \mu\text{M}$) von 6 Stunden bis zu 4 Tagen. Auftrag $100 \mu\text{g}$ Hb pro Spur. 0 entspricht den uninkubierten Erythrozyten.

Der Vergleich von Tag 11 und Tag 17 Erythrozyten in Abbildung 3.11 zeigt, einen gleich bleibenden Proteingehalt des IFR1 Proteins bis zu 24 Stunden permanenter NoA Stimulierung. Ab einer Inkubation von 48 Stunden mit NoA wird IFR1 trotz der Stimulation abgebaut. IFR1 ist sowohl in definitiven Erythrozyten des 11. und 17. Entwicklungstages ein stabil exprimierte Protein, welches in der terminalen Differenzierung der Erythrozyten in Hühnerembryos eine wichtige Rolle zu spielen scheint.

3.1.6 Intrazelluläre Verteilung von IFR1 und TOB in Tag 11 und Tag 17 Erythrozyten

In nicht-erythroiden Zellen wurde für TOB [Jia, 2007] und für IFR1 [Vietor, 2002] ein Vorkommen sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus beobachtet. Um die Lokalisierung von IFR1 und TOB in definitiven Erythrozyten zu bestimmen, wurden die Tag 11 Erythrozyten über 16 Stunden mit $10 \mu\text{M}$ NoA stimuliert und anschließend, wie in Material und Methoden beschrieben, lysiert um das unfractionierte Hämolsat in Zytosol und Membran aufzutrennen. Zusammen mit dem Ganzzell-Lysat der Erythrozyten wurden die Proben auf IFR1 und TOB im Western Blot getestet. FOS das als Transkriptionsfaktor im Kern vorkommt, wurde nach 2 Stunden NoA Stimulierung im Membranpellet gefunden, während TOB auch nach 6 Stunden Inkubationszeit in der zytosolischen Fraktion nachgewiesen wurde. Da TOB ein sehr kurzlebiges Protein ist (siehe 3.1.2) und nach 4 Stunden bereits wieder abgebaut wird, sind die Banden im Western Blot sehr schwach und es gibt keine Daten für die 16 Stunden Inkubation mit NoA, da kein TOB Protein mehr nachweisbar ist.

Ergebnisse

Für IFR1 wurde festgestellt, dass es sich nach 2 Stunden Inkubation in der zytosolischen Fraktion befindet, allerdings wandert ein Teil des Proteins nach 16-stündiger Inkubation mit NoA in das Membranpellet.

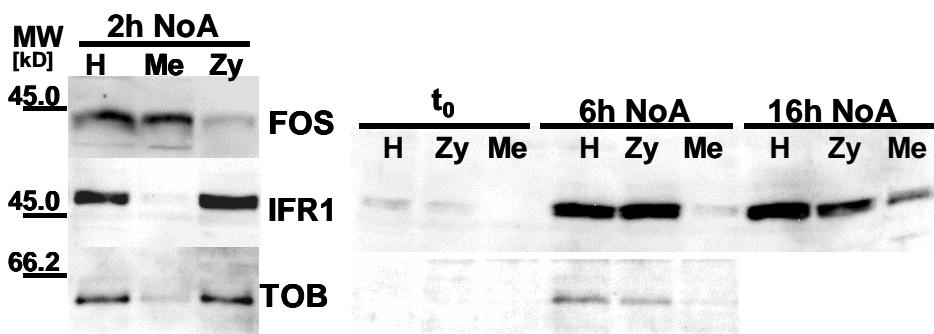


Abbildung 3.12 Stimulierung von Tag 11 Erythrozyten für 2, 6 und 16 Stunden mit 10µM NoA.

Die Proteine (entsprechend 100µg Hb pro Spur) wurden als Ganzzell-Lysat (H), Membranpellet (Me) und als zytosolische Fraktion (Zy) im Western Blot (n=4) aufgetragen.

Um eine Aussage darüber treffen zu können, wo IFR1 in Erythrozyten der späten Entwicklungsstadien des Hühnerembryos lokalisiert ist, wurden auch Tag 17 Erythrozyten in einem Zeitraum von 16 Stunden mit NoA stimuliert. Da der Schwerpunkt der Arbeit auf der Induzierbarkeit, der Lokalisierung und Expression von IFR1 liegt, wurde der Western Blot der Lokalisierungsstudien für Tag 17 nur für IFR1 durchgeführt.

Die definitiven Tag 17 Erythrozyten wurden für 4, 8 und 16 Stunden mit 10µM NoA stimuliert und anschließend, wie in Material und Methoden beschrieben, lysiert um das unfraktionierte Hämolsat in Zytosol und Membran aufzutrennen.

Im Western Blot wurden dann die Ganzzell-Lysate im Vergleich zu Zytosol und Membran aufgetragen und analysiert.

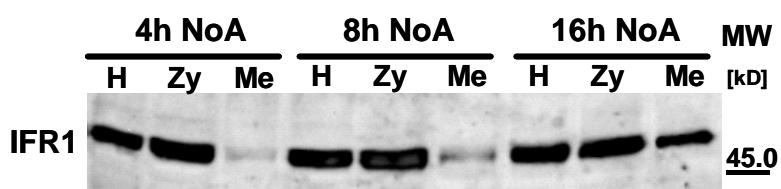


Abbildung 3.13 Stimulierung von Tag 17 Erythrozyten für 4, 8 und 16 Stunden mit 10µM NoA.

Die Proteine (entsprechend 100µg Hb pro Spur) wurden als Ganzzell-Lysat (H), Membran (Me) und Zytosol (Zy) im Western Blot (n=3) aufgetragen.

Dabei wurde festgestellt, dass IFR1 nach 4h Inkubation mit NoA fast ausschließlich im Zytosol vorkommt, allerdings verschiebt sich ein geringer Anteil nach 8h NoA

Stimulierung ins Membranpellet, nach 16-stündiger Inkubation mit NoA ist in beiden Fraktionen ungefähr gleich viel IFR1 Protein zu finden.

Die Verteilung von IFR1 auf Membranpellet und Zytosol ist in Tag 11 und Tag 17 Erythrozyten abhängig vom Zeitfenster der NoA Stimulierung, in dem IFR1 analysiert wird.

3.1.7 Konzentrationsbestimmung von IFR1 Protein in Tag 11 Erythrozyten

Da IFR1 in definitiven Erythrozyten stabil exprimiert wird (siehe 3.1.4), stellte sich die Frage, ob die Konzentration von IFR1 in Erythrozyten des 11. Entwicklungstages bestimmt werden kann. Die Konzentrationsbestimmung ist wichtig, um eine Abschätzung für die Menge an IFR1 in den Erythrozyten machen zu können.

IFR1 wurde über 20 Stunden mit NoA inkubiert um eine ausreichend große Menge an Protein für den Western Blot zur Verfügung zu haben. Im Western Blot wurde je zweimal Ganzzell-Lysat, das 50 und 100 µg Hämoglobin entsprach, aufgetragen.

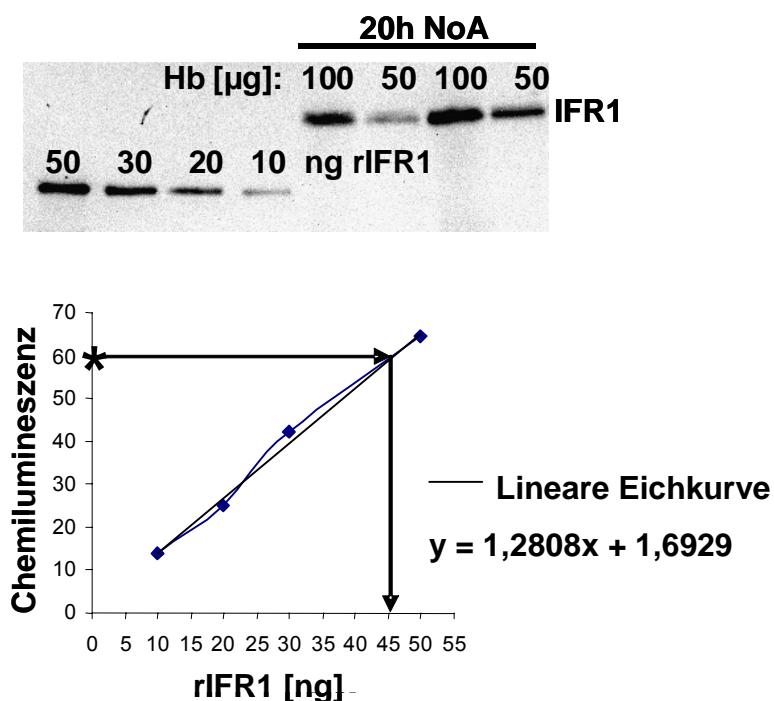


Abbildung 3.14 Quantifizierung des IFR1 Gehalts in Ganzzell-Lysat nach 20-stündiger Inkubation mit 10µM NoA.

Zur Berechnung des Proteingehalts wurde das Westernsignal von 10-50ng rekombinantern IFR1 (rIFR1) verwendet um eine lineare Eichkurve zu erstellen(n=4). *-Markierung entspricht dem IFR1-Western Blot Signal von 100µg Hb.

Für die Kalibrierung wurden 10 bis 50 ng rekombinantes IFR1 aufgetragen und eine lineare Eichkurve anhand der Western Blot Signale (Chemilumineszenz) erstellt. Im Vergleich ergab sich, dass das IFR1-Signal des Ganzzell-Lysats [100µg Hb] einer

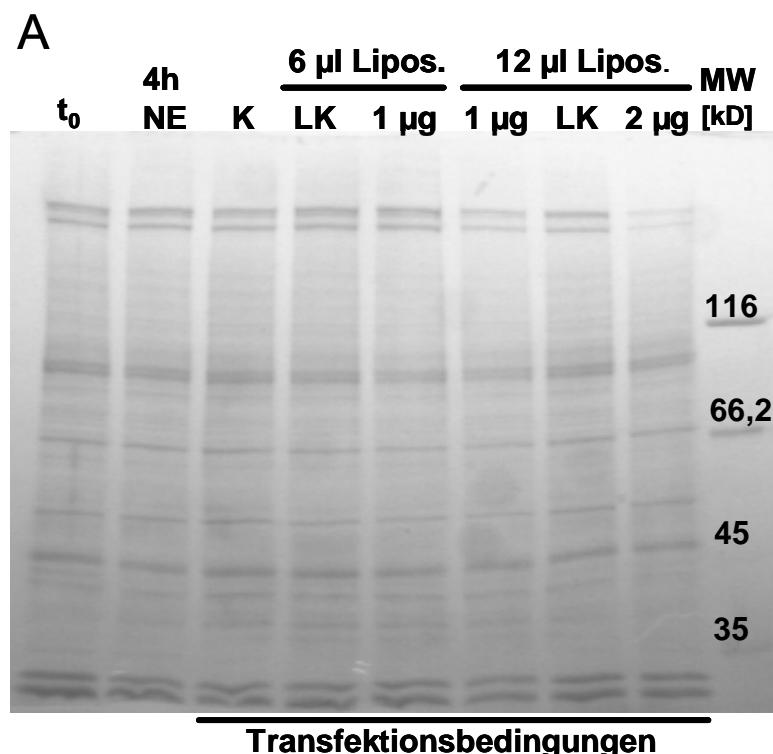
Menge von ~ 45 ng rekombinantem IFR1 entspricht. Mit Hilfe des Molekulargewichts von IFR1 von 48.800 g/mol und der Hämoglobinkonzentration von Tag 11 Erythrozyten von 292 g Hb/l wurde eine mittlere IFR1-Konzentration von 2,7 µM berechnet (siehe 2.2.2.6).

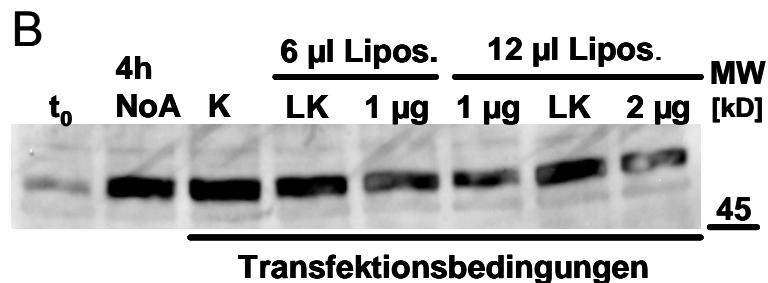
3.2 Silencing von IFR1 in Tag 14 Erythrozyten

Durch das Einbringen von siRNA (*small interfering RNA*) mittels Transfektion sollte in den Erythrozyten die IFR1 mRNA spezifisch in ihrer Menge reduziert werden. Die sich aus dieser Manipulation ergebenden Änderungen des Phänotyps der Zellen könnten dann der Funktion des für die jeweilige mRNA kodierenden Gens zugeordnet werden.

Wir wissen bereits, dass 12-24 Stunden nach Stimulierung durch cAMP die Induktion einiger cAMP-abhängiger Gene zum Stillstand (*caII*, *ifr1*) kommt und einige Gene herunterreguliert (*hsp70*, *fos*, *tob*, *p5n-I*) werden. Durch die Ausschaltung von IFR1 mittels RNA interference könnten diese Gene daraufhin untersucht werden, ob ihr mRNA-Level stabilisiert wird und ob die Transkriptionsrate im Kern erhöht ist.

Da die Transfektion von Erythrozyten aus Hühnerembryos noch nicht beschrieben wurde, wurde dafür ein Protokoll wie in Material und Methoden (siehe 2.2.3.8) beschriebenen erarbeitet.





Transfektionsbedingungen

Abbildung 3.15 RNAi mit ifr1 siRNA in Tag 14 Erythrozyten.

Abbildung A: Proteingel des Western Blots zur Darstellung des gleichmäßigen Proteinauftrags.
Abbildung B: Western Blot mit IFR1 Antikörper. t₀ uninkubierte Erythrozyten, 4h NoA Wert als Kontrolle des Western Blots. Die Kontrolle K wurde wie die transfizierten Proben behandelt, allerdings ohne Liposomen oder siRNA Zugabe, Liposomenkontrolle LK jeweils mit 6 bzw. 12 μl Liposomen, und die mit 1 bzw. 2 μg ifr1 siRNA transfizierten Proben. Auftrag je Spur 50μg Hb im Western Blot (n=3).

Für die Kontrolle ohne Liposomen/siRNA wurden Erythrozyten von Tag 14 verwendet, die unter denselben Bedingungen inkubiert wurden wie die nur mit Liposomen behandelten Kontroll-Erythrozyten und die mit siRNA transfizierten Erythrozyten. Die Western Blot Banden (Abbildung 3.15 B) wurden anschließend analysiert und ausgewertet, wobei die höchste Chemilumineszenz der Kontrolle gleich 100 % gesetzt wurde. Zum Nachweis des gleichmäßigen Proteinauftrags wird das Proteingel in Abbildung 3.16 B gezeigt.

Bei der Inkubation mit DMRIE-C (= Kontrolle mit Liposomen) kam es immer zu einer signifikanten Hämolyse der Erythrozyten (vgl. Graph Abbildung 3.16). Die Zugabe von 6μl Liposomen brachte einen um bis zu 15 % niedrigeren Wert bei der Chemilumineszenz im Western Blot, bei 12 μl Liposomen kam es sogar zu 31,7 % weniger starkem Signal (siehe Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1 Mittelwerte, Standardabweichung und *silencing* der einzelnen transfizierten Proben und der Kontrollen.

Dargestellt in % Chemilumineszenz, bezogen auf die Kontrolle ohne Liposomen / siRNA (100%). * Liposomen wirken auf die Erythrozyten hämolytisch, was bei der Kontrolle ohne Liposomen nicht der Fall ist.

	MW [%]	STABW [%]	Silencing [%]:	Relatives Silencing [%]
Kontrolle ohne Liposomen/siRNA	100,0			
Kontrolle 6μl Liposomen	84,8	3,8	*15,2	
1μg ifr1 siRNA / 6μl Lipos	57,2	7,5	42,8	27,6%
Kontrolle 12μl Liposomen	68,3	3,2	*31,7	
1μg ifr1 siRNA / 12μl Lipos	25,8	8,2	74,2	42,5 %
2μg ifr1 siRNA / 12μl Lipos	29,4	7,1	70,6	38,9 %

Bei der Verwendung von 12 μl Liposomen mit 1μg ifr1 siRNA das *silencing* mit 74,2 % am höchsten. Mit der gleichen Liposomen Menge und 2μg ifr1 siRNA konnte nur ein *silencing* von 70,6 % erreicht werden, bei der Verwendung von 6 μl DMRIE-C mit 1μg

ifr1 siRNA sind es nur 42,8%. Davon ausgehend, dass auch bei der Transfektion mit dem siRNA/Liposomen Gemisch, die Liposomen durch ihre Hämolyse der Erythrozyten eine Art „silencing“ von 15,2 bzw. 31,7 % hervorrufen, sollten die relativen silencing Werte ermittelt werden, indem die silencing Werte mit den Hämolyse Werten korrigiert werden. Die %-Werte für das silencing sind in Tabelle 3.1 zusammengefaßt.

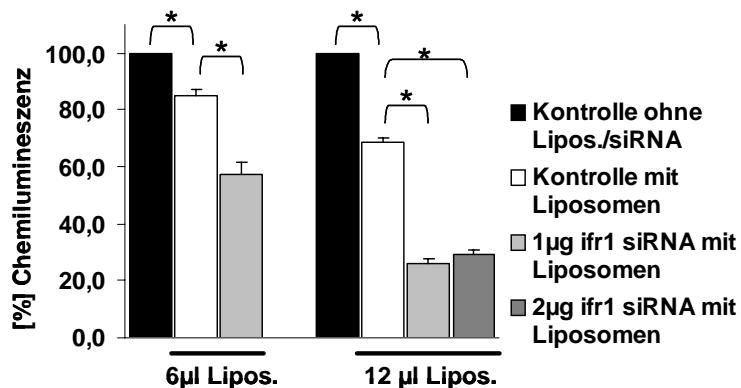


Abbildung 3.16 Tag 14 Erythrozyten wurden transfiziert mit 6 µl Liposomen und 1 µg ifr1 siRNA oder mit 12 µl Liposomen und 1 µg oder 2 µg ifr1 siRNA.

Als Kontrolle wurden die Erythrozyten ohne DMRIE-C / ifr1 siRNA, und nur mit DMRIE-C behandelt. Die Inkubationszeiten waren bei allen Versuchen gleich. Auftrag im Western Blot 50 µg Hb (n=3).

Trotz der Hämolyse der 12 µl DMRIE-C Liposomen wurde das beste *silencing* mit 12 µl DMRIE-C zusammen mit 1 µg ifr1 siRNA erreicht (siehe Abbildung 3.16).

Das IFR1 Protein erreicht nach der Stimulierung der Erythrozyten mit NoA nach ca. 4-6h einen Expressions-Höhepunkt, d.h. das Protein nimmt bis zu diesem Zeitpunkt zu, im Vergleich zu nicht stimulierten Erythrozyten. Die Stimulierung mit NoA führt also zu mehr Protein im Western Blot und damit ist das Silencing besser erkennbar. Die mittels Transformation eingeschleuste ifr1 siRNA erfüllt also die Aufgabe und die neu gebildete *ifr1* mRNA wird zerstört, es kommt also zu einem Abfall des IFR1 Proteins, da weniger *ifr1* mRNA translatiert werden kann. Allerdings reichten die erzielten silencing Raten nicht aus, um die *ifr1* mRNA und damit seine Proteinexpression ganz auszuschalten. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Versuche mit siRNA durchgeführt.

3.3 Interaktionsstudien von IFR1 und TOB mit Polysomen

Wie in 3.1.6 festgestellt, ist TOB ein zytosolisches Protein, welches durch seine Bindung an PABP [Albrecht, 2004; Okochi, 2005], oder den Ccr4/Caf1 Komplex an Polysomen binden könnte. Demnach könnte TOB eine entscheidende Rolle in der Translation der terminalen Differenzierung in Hühnererythrozyten spielen. Für IFR1 konnte nachgewiesen werden, dass ein Teil innerhalb von 16 Stunden vom Zytosol in den Kern wandert 3.1.6 und in einer Konzentration von 2,7 µM pro Erythrozyten vorkommt (siehe 3.1.7).

Eine Möglichkeit, die Assoziation von IFR1 oder TOB mit anderen Proteinen oder mRNA zu untersuchen stellt die Ultrazentrifugation von Polysomenpellets durch linearen Saccharosegradienten dar.

Durch die Fraktionierung von Erythrozyten und der anschließenden Saccharosegradientenzentrifugation können Interaktionen zwischen Proteinen mit Polyribosomen oder der wachsenden Polypeptidkette nachgewiesen werden. Es sollte festgestellt werden ob TOB mit PABP Molekülen, die an Polysomen gebunden sind, interagiert und wo das teilweise zytosolische IFR1 Protein bei der Translation lokalisiert sein könnte.

Für die Interaktionsstudien von IFR1 und TOB mit Polysomen oder der transkribierten mRNA wurde das Hämolsat der Erythrozyten von Tag 14 (oder Tag 11) oder das Polysomenpellet, welches aus dem Hämolsat gewonnen wurde, in verschiedenen Versuche mit einem linearem Saccharosegradienten von 10 % bis 35% oder 43 % Saccharose aufgetrennt.

3.3.1 IFR1 Expression in Ganzzell-Lysat und Hämolsat von Erythrozyten verschiedener Entwicklungstage

Für die Studien der Ermittlung von potentiellen Bindungspartnern für IFR1 mittels Crosslink, Saccharosedichtegradientenzentrifugation und IEF-2D-/AUT2D-Elektrophorese, sollte genügend IFR1 Protein in Form von Polysomenpellets zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund wurden an den Entwicklungstagen 11, 14 und 18 Erythrozyten entnommen und für 4 Stunden mit 10µM NoA inkubiert. Das gewonnene Ganzzell-Lysat und Hämolsat (wie in Material und Methoden beschrieben) wurde im Western Blot auf ihren Proteingehalt getestet.

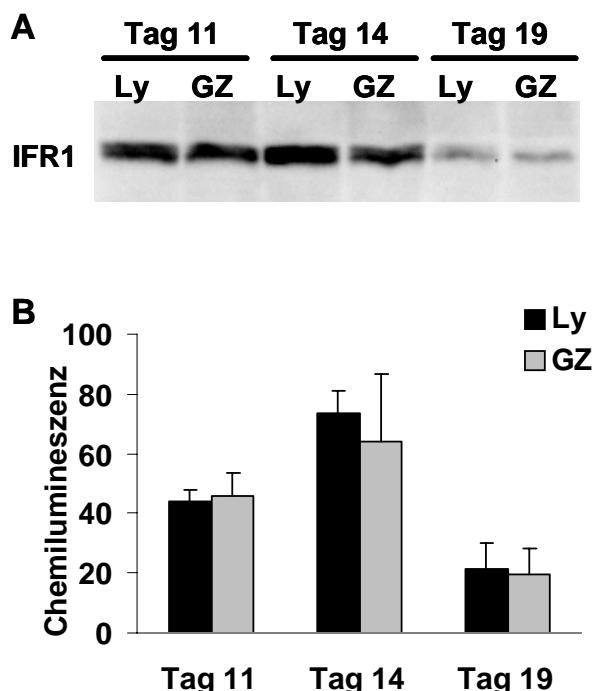


Abbildung 3.17 Tag 11, 14 und 19 Erythrozyten wurden mit 10 μ M NoA für 4 Stunden induziert.

(A) Bestimmung der Protein Expression im Western Blot (Auftrag: Hämolsat = Ly und Ganzzell-Lysat aus dicht gepackten Erythrozyten = GZ je 100 μ g Hb) und (B) durch Bestimmung der Chemilumineszenz der ausgewerteten Banden (Western Blot n=3, keine Signifikanz).

Die Proteinexpression von IFR1 ist in Erythrozyten an Tag 14 sowohl im Ganzzell-Lysat als auch im Hämolsat am höchsten. Sowohl in Tag 11, als auch in Tag 19 ist weniger IFR1 zu detektieren. Für weitere Versuche wurden deshalb das Hämolsat und die Ganzzellextrakte von Tag 14 Erythrozyten verwendet.

3.3.2 Saccharosegradientenzentrifugation mit Hämolsat

Durch die Ultrazentrifugation von Hämolsat über einen linearen Saccharosegradienten sollte nachgewiesen werden, in welchen Fraktionen IFR1 und TOB lokalisiert sind.

Wie in Material und Methoden beschrieben wurden Erythrozyten, die zuvor 4 Stunden mit NoA inkubiert wurden, mit Hilfe eines linearen Saccharosegradienten durch Ultrazentrifugation kontinuierlich aufgetrennt und die so erhaltenen Fraktionen wurden analysiert. Im Western Blot wurde neben TOB auch PABP und IFR1 ausgetestet, zudem wurde die rRNA (= Ribosomen) und die RNAs von CAII und β -Globin im Northern nachgewiesen.

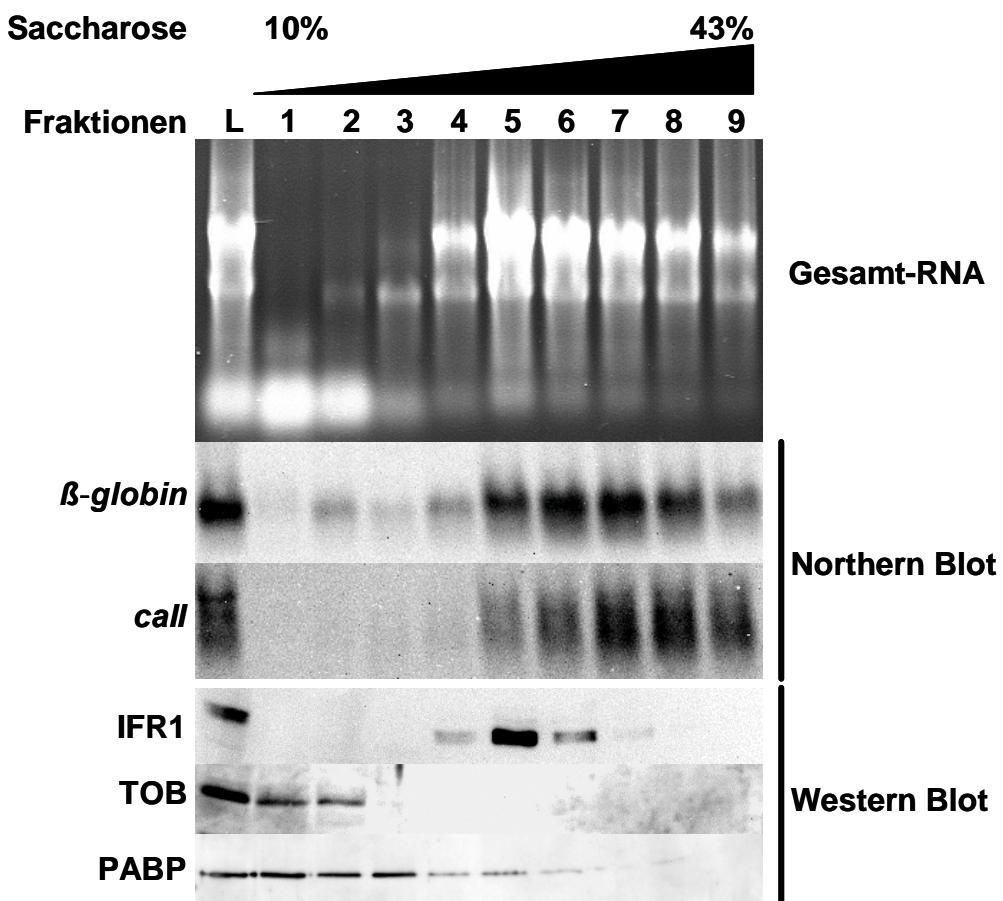


Abbildung 3.18 Polysomen Fraktionierung von definitiven Erythrozyten.

Analyse der Polysomen von Erythrozyten nach der Inkubation für 4 h mit 10 μ M NoA. Hämolsat (L), Fraktion 1 (10% Saccharose) bis Fraktion 9 (43% Saccharose). Western Blot mit 100 μ l Fraktion Acetongefällt (n=3), Gesamt-RNA mit 50 μ l Fraktion in Trifast (n=2), Northernblot mit 10 μ g RNA (n=3).

Wie in der obigen Abbildung 3.18 zu sehen ist, ist die mRNA von *caII* und β -*globin* in den Fraktionen 5 bis 9 nachweisbar, die in der Gesamt RNA die ribosomalen Fraktionen darstellen. In den Fraktionen 1 bis 4 ist die mRNA Menge sehr gering (β -*globin*) und oder gar nicht nachzuweisen (*caII*). Anders verhält sich TOB und der größte Teil von PABP, die beide im Western Blot in den ersten Fraktionen (TOB in Fraktion 1 und 2, PABP in den Fraktionen 1 bis 4), detektiert wurden. In Fraktion 1 und 2 des Gradienten sind die löslichen, zytosolischen Proteine lokalisiert. TOB interagiert nicht mit den ribosomalen Fraktionen und wurde deshalb in den folgenden Untersuchungen nicht mit einbezogen. IFR1 konnte im Western Blot in den Fraktionen 4 bis 7 nachgewiesen werden, kolokalisiert mit den ribosomalen Fraktionen der Gesamt-RNA. Aus diesem Grund wurden weitere Versuche mit Saccharosegradienten durchgeführt, mit dem Ziel mögliche Interaktionen von IFR1 mit den Polyribosomen zu charakterisieren.

3.3.3 IFR1 Akkumulation im Polysomenpellet

Um sicher zu stellen, dass kein IFR1 bei der Präparation verloren geht, wurde nach den verschiedenen Zentrifugationen immer eine Probe entnommen und anschließend im Western Blot auf IFR1 getestet. PABP diente dabei als Ladungskontrolle, da es bei der gesamten Inkubation konstant exprimiert wird.

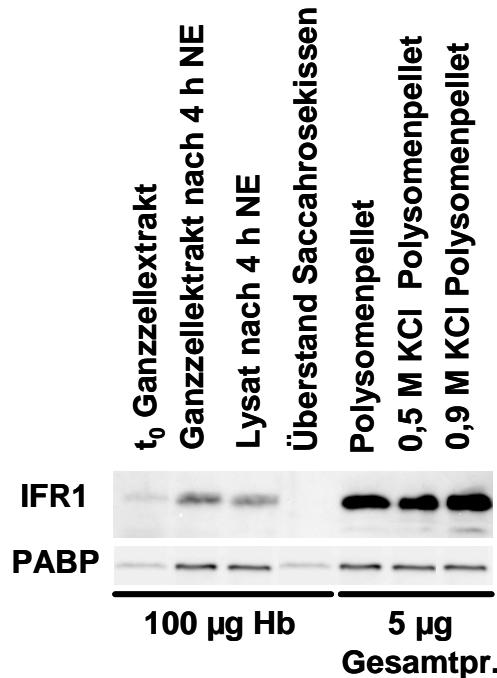


Abbildung 3.19 Western Blot (n=3) zur Überprüfung der IFR1 Akkumulation in Tag 14 Erythrozyten nach 4h NoA Inkubation.

Nach verschiedenen Zentrifugationsschritten und verschiedenen Vorbehandlungen mit 0,5 oder 0,9 M KCl wurden 100 µg Hb oder 5 µg Gesamtprotein im Western Blot aufgetragen. t₀ uninkubierte Erythrozyten.

In Abbildung 3.19 ist zu erkennen, dass IFR1 über die Ultrazentrifugation durch ein 30%iges Saccharosekissen gut akkumuliert werden kann. Im Ganzzellextrakt t₀ der uninkubierten, gepackten Tag 14 Erythrozyten, ist IFR1 und PABP nur sehr schwach exprimiert, nach der NoA-Inkubation ist das IFR1 Signal wieder stärker. Auch im Hämolsat ist das IFR1 Signal ähnlich hoch wie im Ganzzellextrakt. Nach der Zentrifugation über das 30%ige Saccharosekissen wurde eine Probe aus dem Überstand entnommen. Im Western Blot ist kein IFR1 mehr zu sehen, dafür hat sich die Proteinmenge im Polysomenpellet angereichert. Wird das Polysomenpellet mit 0,5 oder 0,9 M KCl behandelt, und erneut über ein 30%iges Saccharosekissen, mit 0,5 M oder 0,9 M KCl, zentrifugiert, so ändert sich nichts am IFR1 Proteingehalt.

3.3.4 Polysomenpräparation mit einem kontinuierlichen Saccharosegradienten

In 3.3.2 konnte bereits gezeigt werden, dass IFR1 mit den ribosomalen Fraktionen kolokalisiert ist. Um die Interaktion von IFR1 mit Ribosomen genauer charakterisieren zu können, wurde die Anreicherung von Polysomen in einem Pellet und die biochemischen Analysen optimiert [Ji, 2003].

Die Anreicherung von Polysomen erfolgte, wie in Material und Methoden beschrieben, aus Tag 14 Erythrozyten die 4 Stunden mit NoA inkubiert wurden. Nach der Lyse der Erythrozyten wurde das Hämolsat über ein Saccharosekissen zentrifugiert und das so erhaltene Polysomenpellet wurde wie folgt behandelt:

1. nicht vorbehandelt (Kontrolle)
2. mit 0,5 M KCl vorbehandelt (Entfernung polysomengebundener Proteine)
3. mit 0,9 M KCl (Entfernung intrinsischer, ribosomaler Proteine)
4. mit 20 mM EDTA (Dissoziation der 80s Ribosomen in die Untereinheiten)
5. mit 10pg/ μ l RnaseA (Hydrolyse der mRNA und teilweise der rRNA)
6. mit 20 mM EDTA und 10pg/ μ l RnaseA (kompletter Abbau der RNA)

3.3.4.1 Kontroll-Gradient

Zur Bestätigung der Kolokalisation von IFR1 mit den ribosomalen Fraktionen in 3.3.2 wurde ein Kontroll-Gradient gefahren. In Abbildung 3.20 ist zu erkennen, dass IFR1 im Western Blot in den Fraktionen 8 bis 16 detektierbar ist, wobei ab Fraktion 12 der Gehalt an IFR1 langsam abnimmt. In diesen Fraktionen ist die 18s und 28s rRNA nachzuweisen, sowie die 5,8s/5s und kleinere RNAs, die im Polysomenprofil bei 254 nm mit dem 60s/80s Peak übereinstimmen.

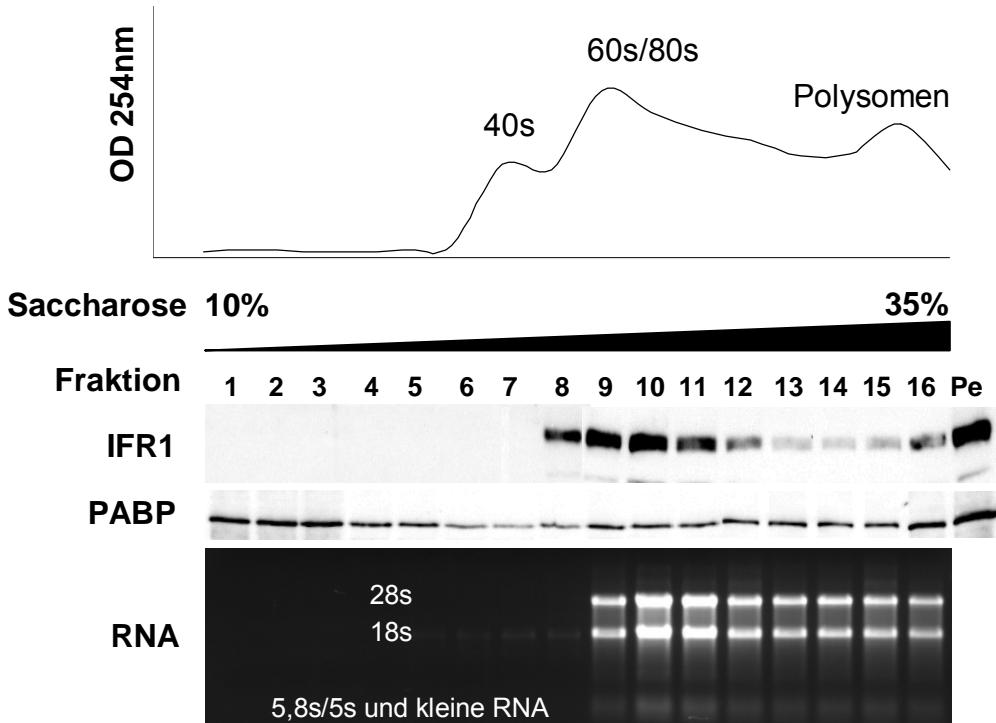


Abbildung 3.20 Kontroll-Gradient: Unbehandelte Polysomenpräparation von Tag 14 Erythrozyten nach 4 h NoA (10 µM) Inkubation.

Die Polysomen wurden nach der UZ durch einen 10 – 35 %igen Saccharosegradienten fraktioniert und die Fraktionen wurden im Western Blot auf IFR1 und PABP, auf ihre rRNA und ihr RNA-Profil bei einer OD von 254 nm untersucht. Unbehandeltes Polysomenpellet Pe (10 µg Gesamtprotein) als Positivkontrolle.

Das RNA Profil zeigt deutlich den Peak der 40s Untereinheit, der auch mit der rRNA Präparation zusammen fällt (Fraktionen 5 bis 8). Die 60s Untereinheiten sind im Profil nicht zu erkennen. Ab Fraktion 9 fällt der 60s mit dem 80s Peak zusammen, in der rRNA sind hier die 28s und die 18s Banden zu erkennen. In den letzten Fraktionen sind Polysomen n-ter Ordnung im Profil zu erkennen. PABP kommt in allen Fraktionen ungefähr gleichmäßig verteilt vor.

3.3.4.2 0,5 M KCl-Gradient

Bei der Behandlung des Polysomenpellets mit 0,5 M KCl kann getestet werden, wie groß die Bindungsaffinität von IFR1 an die Polysomen ist. Mit 0,5 M KCl können an Ribosomen assoziierte Translationsfaktoren, Aminoacyl-tRNA Synthetasen und einige

Ergebnisse

Proteinkinasen entfernt werden, intrinsische, ribosomale Proteine sind davon nicht betroffen [Spirin, 1990].

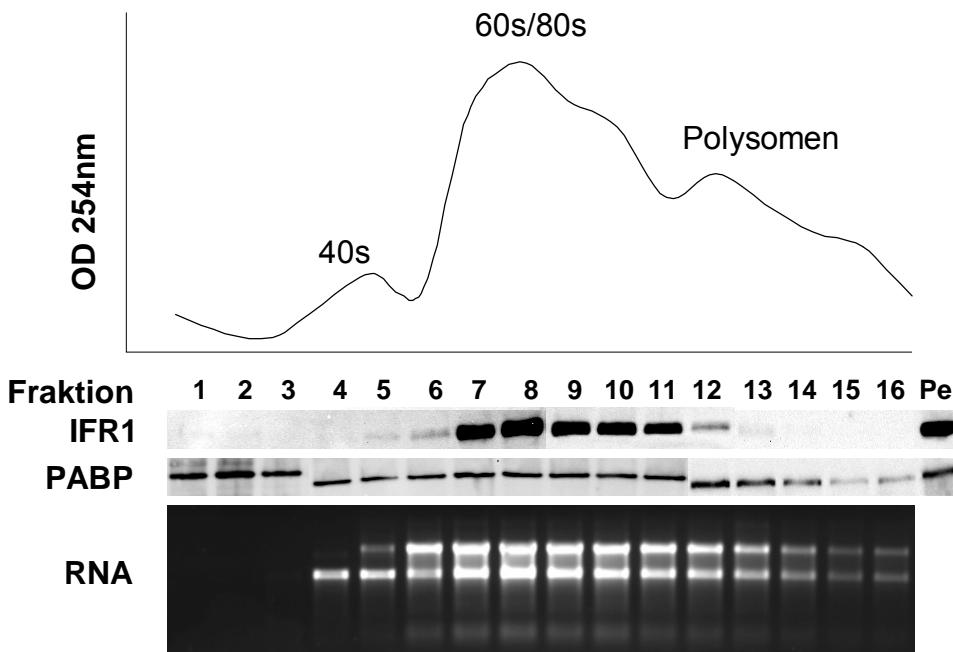


Abbildung 3.21 0,5 M KCl Gradient: Mit 0,5 M KCl behandelte Polysomenpräparation von Tag 14 Erythrozyten nach 4 h NoA (10 µM) Inkubation.

Die Polysomen wurden nach der UZ durch einen 10 – 35 %igen Saccharosegradienten mit 0,5 M KCl, fraktioniert und die Fraktionen wurden im Western Blot auf IFR1 und PABP, auf ihre rRNA und ihr RNA-Profil bei einer OD von 254 nm untersucht. Unbehandeltes Polysomenpellet Pe (10 µg Gesamtprotein) als Positivkontrolle.

Auch im 0,5M KCl-Gradient ist IFR1 mit den ribosomalen Fraktionen kolokalisiert und kann nicht von den Polysomen dissoziiert werden. Allerdings verschiebt sich das IFR1 Signal im Western Blot, im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 3.20) nach links in die Fraktionen 6 bis 12. In diesen Fraktionen ist die 18s und 28s rRNA nachzuweisen, die im Polysomenprofil mit dem 60s/80s Peak übereinstimmt.

Das OD 254 nm Profil zeigt ebenfalls eine leichte Verschiebung nach links, der Peak der 40s Untereinheit erscheint schon in Fraktion 4 und stimmt mit dem Ethidiumbromidgel der rRNA überein. Die rRNA kann bis in die letzten Fraktionen nachgewiesen werden, d.h. auch hier tauchen Polysomen auf. Ab Fraktion 7 steigt das Profil wieder an und zeigt eine Zunahme der 60s/80s als Peak an. Das PABP Western Blot Signal lässt nur in den letzten beiden Fraktionen (15 und 16) leicht nach, verteilt sich aber ansonsten wieder konstant über alle Fraktionen.

Das Vorkommen von IFR1 in den ribosomalen Fraktionen unter diesen Konditionen lässt auf eine hohe Bindungsaffinität von IFR1 schließen. Um herauszufinden, wie stark IFR1 an die Ribosomen gebunden ist, kann die Salzkonzentration noch erhöht werden.

3.3.4.3 0,9 M KCl-Gradient

Um die Stärke der Bindung von IFR1 an die ribosomalen Fraktionen zu testen, wurde das Polysomenpellet mit 0,9 M KCl behandelt. Mit 0,9 M KCl können alle löslichen Proteinsynthesefaktoren und einige intrinsische, ribosomale Proteine entfernt werden [Sherton und Wool, 1972].

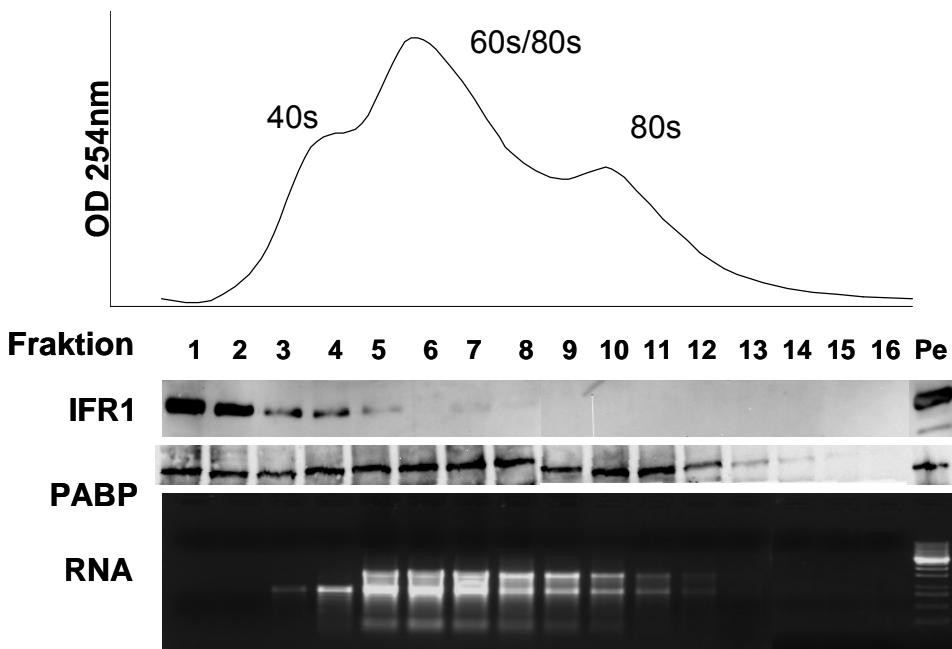


Abbildung 3.22 0,9 M KCl Gradient: Mit 0,9 M KCl behandelte Polysomenpräparation von Tag 14 Erythrozyten nach 4 h NoA (10 µM) Inkubation.

Die Polysomen wurden nach der UZ durch einen 10 – 35 %igen Saccharosegradienten mit 0,9 M KCl, fraktioniert und die Fraktionen wurden im Western Blot auf IFR1 und PABP, auf ihre rRNA und ihr RNA-Profil bei der OD 254 nm untersucht. Unbehandeltes Polysomenpellet Pe (10 µg Gesamtprotein) als Positivkontrolle.

Durch die Behandlung mit 0,9 M KCl kann der Großteil von IFR1 von den Ribosomen gelöst werden und korreliert nicht mehr mit der rRNA Präparation der 40s und 60s Untereinheit (Abbildung 3.22). IFR1 wird im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 3.20) nach links in die Fraktionen 1 und 2 verschoben. Dort sind die löslichen Proteine im Gradienten lokalisiert (Vergleiche hierzu Abbildung 3.18: TOB kommt in den ersten Fraktionen vor, während IFR1 in den ribosomalen Fraktionen auftaucht). Auch das RNA Profil ist im Vergleich zur Kontrolle nach links verschoben. Die rRNA ist im Ethidiumbromidgel nur bis Fraktion 12 nachzuweisen, auch das Profil nimmt hier deutlich ab, was darauf hindeuten könnte, dass Polysomen zu Monosomen (entspricht einzelnen 80s Ribosomenkomplexen) wurden und damit in den hinteren Fraktionen keine Ribosomen mehr vorkommen. Dafür spricht auch, dass PABP ab Fraktion 13 stark abnimmt, in der letzten Fraktion gar nicht mehr detektiert wird. Dies steht im Gegensatz zur Behandlung mit 0,5 M KCl, da hier sowohl PABP als auch die rRNA bis in die letzte Fraktion vorkommt.

Ergebnisse

Mit 0,9 M KCl kann IFR1 im Western Blot in die ersten Fraktionen verschoben werden und wird damit zum löslichen Protein, das nicht mehr an Ribosomen bindet.

3.3.4.4 EDTA-Gradient

Die Behandlung mit 20 mM EDTA zeigt, ob Mg^{2+} -Ionen einen Effekt auf die Stabilität des gesuchten Proteins und des Ribosomenkomplexes haben [Ji, 2003]. Die Mg^{2+} -Ionen stabilisieren die rRNA Strukturen höherer Ordnung, die als Bindungsstellen für einige ribosomale Proteine dienen. Sie stabilisieren intermolekulare Kontakte zwischen den ribosomalen Proteinen und der rRNA [Klein, 2004]. Da die Bildung und Aufrechterhaltung von 80s Ribosomen Mg^{2+} -Ionen benötigt, können Polyribosomen durch die Zugabe von EDTA gespalten werden, d.h. der Anteil an freien 40s und 60s Untereinheiten nimmt zu.

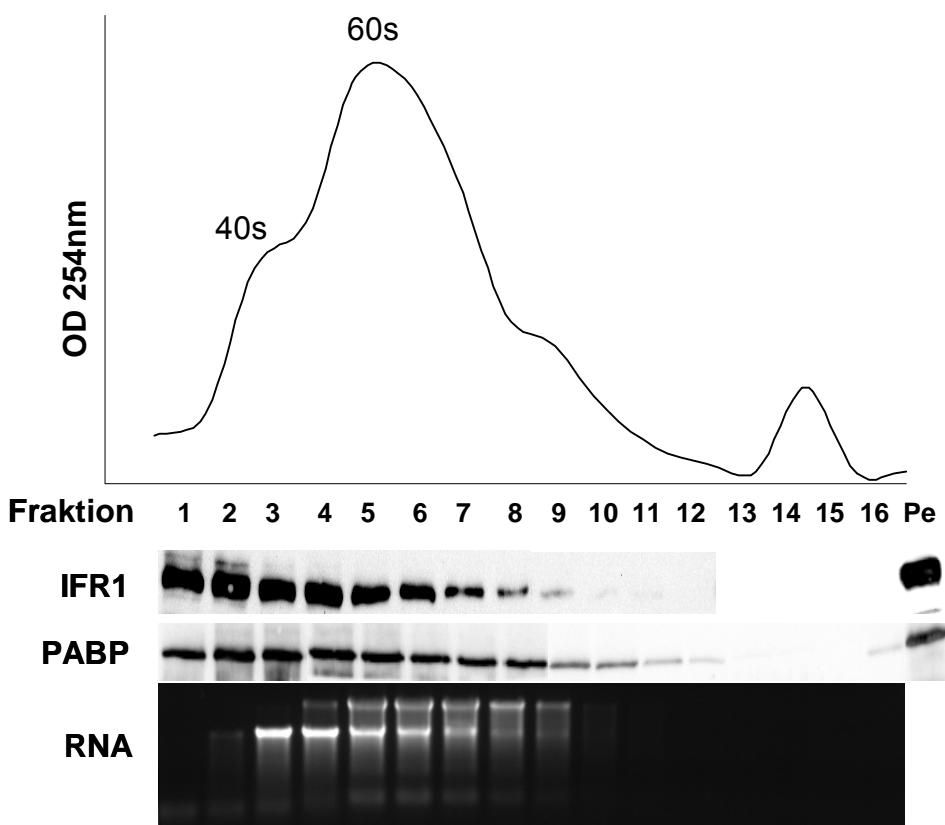


Abbildung 3.23 EDTA Gradient: Mit 20 mM EDTA behandelte Polysomenpräparation von Tag 14 Erythrozyten nach 4 h NoA (10 μ M) Inkubation.

Die Polysomen wurden nach der UZ durch einen 10 – 35 %igen Saccharosegradienten mit 0,9 M KCl, fraktioniert und die Fraktionen wurden im Western Blot auf IFR1 und PABP, auf ihre rRNA und ihr RNA-Profil bei einer OD von 254 nm untersucht. Unbehandeltes Polysomenpellet Pe (10 μ g Gesamtprotein) als Positivkontrolle.

Durch die Behandlung des Polysomenpellets mit 20 mM EDTA, wird IFR1 im Gradienten nach links in den löslichen Protein Pool verschoben, ein Teil bleibt aber weiterhin bis Fraktion 8 nachweisbar und ist immer noch mit den die 18s und 28s rRNA enthaltenden Fraktionen assoziiert.

Im OD 254 nm Profil ist zu erkennen, dass sich das Profil im Vergleich zur Kontrolle in Abbildung 3.20 stark nach links verschoben hat und die 40s Untereinheiten eine Schulter im Profil ergibt, während die 60s Untereinheiten einen ausgeprägten Peak bilden. Die 80s ribosomalen Komplexe sind nur andeutungsweise in Fraktion 8 zu sehen. Die 18s rRNA ist im Ethidiumbromidgel in den Fraktionen 3 und 4 deutlich zu erkennen. Die 28s rRNA wird in Fraktion 4 nachgewiesen. Auch PABP wird bei der Behandlung mit EDTA nach links verschoben, kann aber bis in Fraktion 12 im Western Blot nachgewiesen werden. Trotz der Dissoziation der 80s Ribosomen in ihre 40s und 60s Untereinheit, konnte nicht geklärt werden, ob IFR1 an die 40s oder 60s Untereinheit bindet.

3.3.4.5 RNaseA-Gradient

Mit niedrigen Konzentrationen von RNaseA (10pg/ μ l) kann die mRNA zwischen Ribosomen verdaut werden und es kommt zu einer Anhäufung von „80s“ Monosomen, die ursprünglichen aus den Monomeren und den 80s Ribosomen aus den verdauten Polysomen stammen [Ji, 2003].

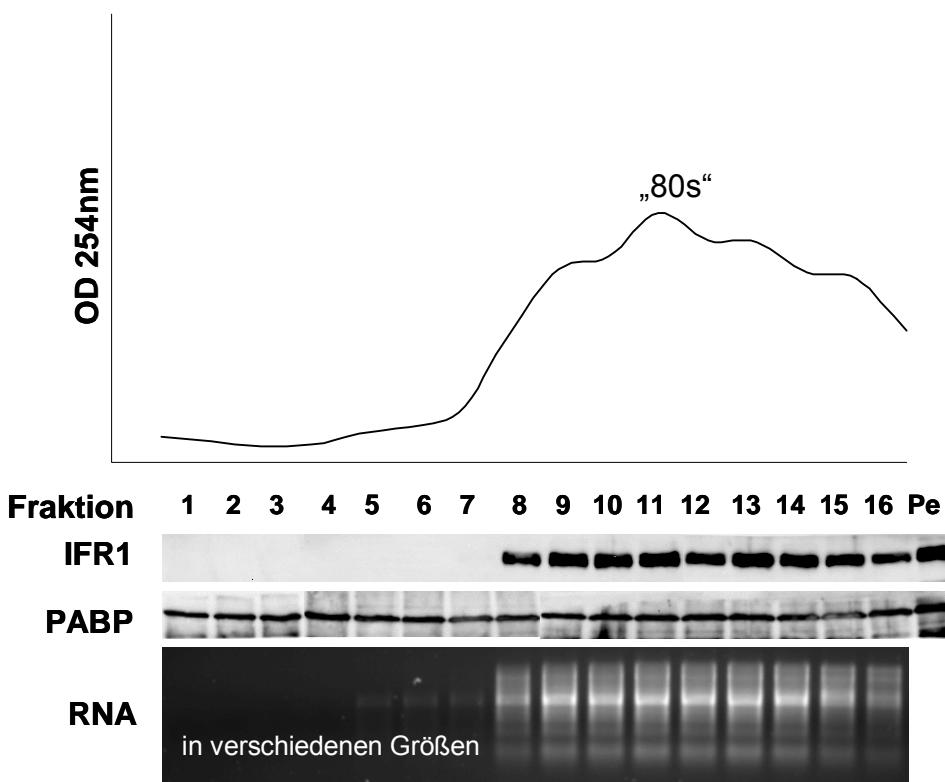


Abbildung 3.24 RNaseA Gradient: Mit 10 pg/ μ l RNaseA behandelte Polysomenpräparation von Tag 14 Erythrozyten nach 4 h NoA (10 μ M) Inkubation.

Die Polysomen wurden nach der UZ durch einen 10 – 35 %igen Saccharosegradienten fraktioniert und die Fraktionen wurden im Western Blot auf IFR1 und PABP, auf ihre rRNA und ihr RNA-Profil bei einer OD von 254 nm untersucht. Unbehandeltes Polysomenpellet Pe (10 μ g Gesamtprotein) als Positivkontrolle.

Ergebnisse

Das Polysomenprofil verschiebt sich zu den „80s“ Monosomen, im RNA Gel sind verschiedene Größen an RNA zu sehen, was daran liegt, dass die RNA durch die RNaseA schon leicht abgebaut wurde (Abbildung 3.24). Das Western Blot Signal von IFR1 bleibt in den Fraktionen 8 bis 16 (siehe Kontroll-Gradient Abbildung 3.20). PABP verteilt sich über alle Fraktionen, wie im Western Blot zu sehen ist. Trotz der Behandlung mit RNaseA kosalimentiert IFR1 mit den 80s Monosomen, was bedeutet, dass IFR1 mit den translatierenden Ribosomen assoziiert ist und das die mRNA für diese Interaktion nicht notwendig ist. Die Assoziation von IFR1 mit den Ribosomen ist nicht RNA abhängig.

3.3.4.6 20 mM EDTA und 100 ng/ μ l RNaseA

Mit hohen Konzentrationen von RNaseA (100ng/ μ l) kann mRNA und rRNA verdaut werden. Durch die Behandlung mit 20 mM EDTA werden die Ribosomen in ihre 40s und 60s Untereinheiten dissoziert. Es kommt zu einem kompletten Abbau der RNA.

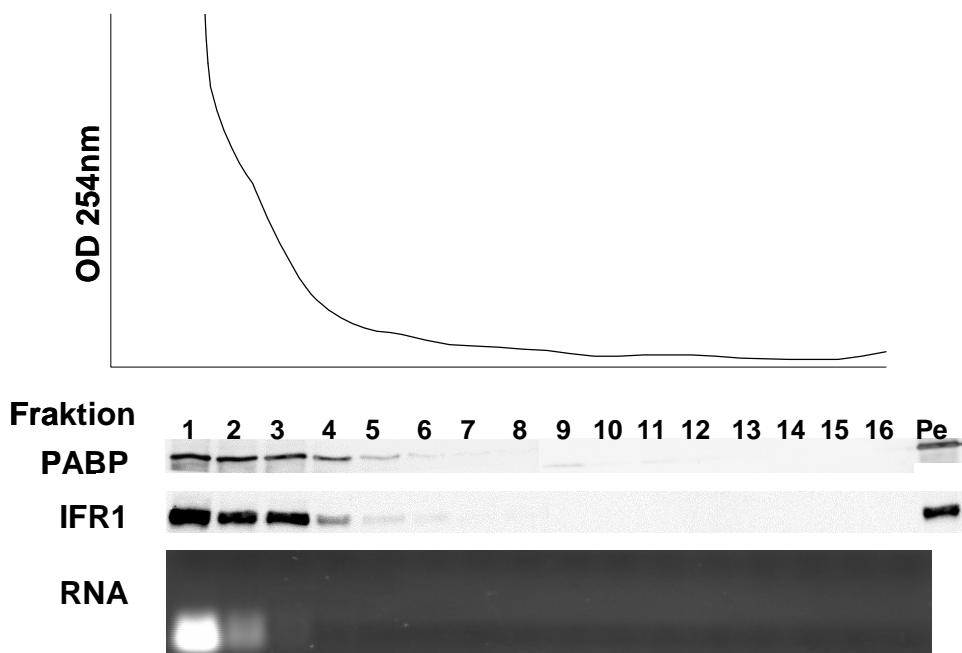


Abbildung 3.25: RNAseA-EDTA Gradient.

Mit 100 ng/ μ l RNaseA und 20 mM EDTA behandelte Polysomenpräparation von Tag 14 Erythrozyten nach 4 h NoA (10 μ M) Inkubation.

Die abgebaute RNA kann im Ethidiumbromidgel in der ersten Fraktion nachgewiesen werden (Abbildung 3.25). Im Polysomenprofil können keine Ribosomen oder Untereinheiten mehr nachgewiesen werden. IFR1 ist von den abgebauten Ribsomen dissoziiert und im Western Blot nach links in die Fraktionen 1 bis 5 (siehe Kontroll-Gradient Abbildung 3.20) verschoben. IFR1 kann nur mit intakten Ribosomen oder Untereinheiten assoziiert sein.

3.4 Crosslink

Die in den Interaktionsstudien erzielten Ergebnisse weisen darauf hin, dass es für IFR1 bestimmte Bindungspartner während der terminalen Differenzierung geben muss. Eine andere Möglichkeit, die Assoziation von IFR1 mit anderen Proteinen oder mRNA zu untersuchen stellt die Methode des Crosslinks dar.

Die vorangegangenen Expressionsstudien zeigen, dass *ifr1* mit zu den letzten Genen in der terminalen Differenzierung zählt, die über cAMP-induziert werden können und deren Protein damit eine noch nicht erkannte Aufgabe übernimmt. Um die Funktion von IFR1 zu charakterisieren, sollten mögliche Bindungspartner von IFR1 identifiziert werden. In einem Polysomenpellet ist IFR1 über einen Western Blot nachzuweisen. Mit einem chemischen oder UV-Licht induzierten Crosslink, sollte eine spezifische Vernetzung von Proteinen oder Nukleinsäuren mit IFR1 aufgedeckt werden.

3.4.1 Chemischer Crosslink mit dem Imidoester DMP (Dimethyl Pimelimidat•2HCl)

Im folgenden Versuch sollte IFR1 durch den Crosslinker DMP mit anderen Proteinen verbunden werden und es sollte ein *shift* der IFR1 Western Blot Bande in höhermolekulare Bereiche erfolgen.

Das zweimal über ein 30%iges Saccharosekissen aufgereinigte Polysomenpellet wurde mit 1 mM, 2,5 mM und 5 mM DMP behandelt. Eine Vorbehandlung des Polysomenpellets mit 0,5 M KCl sollte zeigen, ob die Entfernung von an Ribosomen assoziierten Proteinen, eine Auswirkung auf die Effizienz des Crosslinks haben könnte. Es wurden jeweils 20 µg Gesamtprotein je Spur aufgetragen.

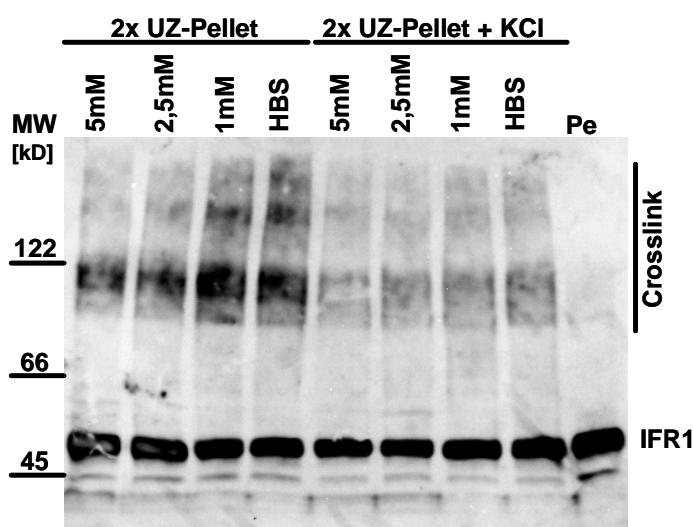


Abbildung 3.26 Western Blot (n=3) eines Chemischen Crosslink mit 1 bis 5 mM DMP und IFR1 Antikörper. HBS und unbehandeltes Polysomenpellet (Pe, 10 µg) als Kontrolle.

Bei beiden Polysomenpellets ist die 48 kD IFR1 Bande deutlich erkennbar, die Intensität des Chemilumineszenz Signals entspricht der in der Kontrolle aufgetragenen 10 µg Gesamtprotein in der äußersten rechten Spur (Pe). In den HBS-Puffer Kontrollen beider Polysomenpellets tritt ein *smear* auf. Das heißt, dass der HBS-Puffer, der zur Lösung des DMP Pulvers verwendet wird, ohne den Crosslinker auch zu unspezifischen Vernetzungen mit IFR1 führt. Aus diesem Grund wurde in folgenden Versuchen ein anderer chemischer Crosslinker verwendet.

3.4.2 Chemischer Crosslink mit Hilfe von NHS Estern

Untersucht wurden, wie schon bei den Crosslink Versuchen zuvor, ein zweimal über ein 30%iges Saccharosekissen aufgereinigtes Polysomenpellet und ein einfach gereinigtes Pellet, welches vor dem Auftrag auf das zweite 30%ige Saccharosekissen, mit 0,5 mM KCl vorbehandelt wurde. Wie in Abbildung 3.27 A zu sehen, zeigt der Western Blot in allen Proben bei 48 kD die IFR1 Bande, allerdings nehmen bei beiden gecrosslinkten Polysomenpellets die Western Blot Signale von 1 mM zu 5 mM DSS Behandlung stark ab. In der DMSO Kontrolle des Western Blots sind keine unspezifischen Wechselwirkungen mit IFR1 zu sehen, da in beiden Fällen kein *smear* zu erkennen ist und das Signal unverändert stark bleibt. Das Coomassie gefärbte SDS-Gel (Abbildung 3.27 B) zeigt in der DMSO Kontrolle keinen *smear*, sondern vereinzelt Banden, während in den mit DSS behandelten Proben im Gel vermehrt ein *smear* zu erkennen ist. Im obersten Teil des Gels ist zudem mehr Protein sichtbar, eventuell handelt es sich hierbei um durch den Crosslink vernetzte Proteine, die aufgrund ihrer Größe nicht mehr ins Gel einwandern konnten.

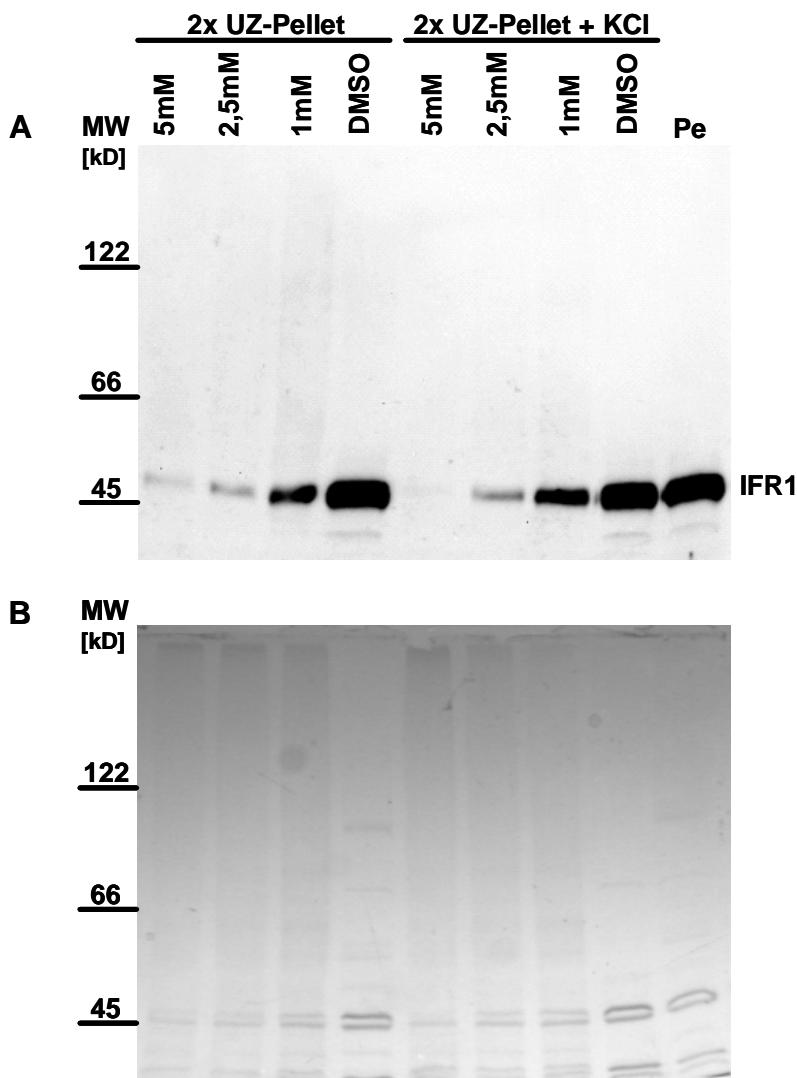


Abbildung 3.27 (A) Western Blot ($n=3$) und **(B)** SDS-Gel von einem chemischen Crosslink mit DSS in verschiedenen Konzentrationen (1 bis 5 mM) und DMSO als Kontrolle. Polysomenpellet ohne Vorbehandlung (= 2x UZ Pellet) und Polysomenpellet mit 0,5 M KCl vorbehandelt (= 2x UZ Pellet + KCl). Polysomenpellet (Pe) als Positivkontrolle Auftrag 10 μ g Gesamtprotein.

Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen dem 2x UZ Pellet und dem mit 0,5 M KCl vorbehandelten Pellet. Dies bedeutet, dass die Behandlung mit KCl keinen Einfluss auf den Crosslink hat und damit auch keine Bindungspartner von IFR1 mit der Behandlung wegfallen. IFR1 scheint also nicht mit leicht assoziierten ribosomalen Proteinen in Wechselwirkung zu stehen.

In Abbildung 3.28 ist die Abnahme des Chemilumineszenz Signals graphisch dargestellt. Zwischen der Behandlung mit 1 mM DSS und 2,5 mM DSS fällt das Chemilumineszenz Signal signifikant ab, eine Erhöhung der DSS Konzentration auf 5 mM bringt nur wenig Signalreduktion.

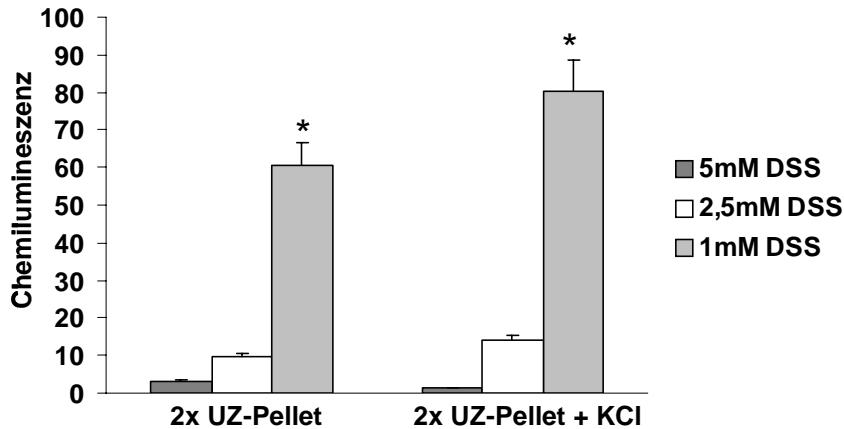


Abbildung 3.28 Graphik der Western Blot Signale aus Abbildung 3.27.

(A) des chemischen Crosslinks mit DSS in verschiedenen Konzentrationen (1 bis 5 mM). Polysomenpellet ohne Vorbehandlung (= 2x UZ Pellet) und Polysomenpellet mit 0,5 M KCl vorbehandelt (= 2x UZ Pellet + KCl).

Durch die Verringerung des IFR1 Signals im Western Blot kann gezeigt werden, dass IFR1 mit anderen Proteinen vernetzt werden kann, allerdings ist nicht ganz klar, wo das vernetzte IFR1 wieder zu finden ist. Einzige Erklärung hierfür wäre, dass IFR1 durch den Crosslink mit anderen Proteinen so groß wird, dass es nicht mehr ins Gel einlaufen kann und sich damit im oberen Teil, also im Sammelgel, anhäuft. Dies würde auch den leichten *smear* im Western Blot selber erklären.

Der chemische Crosslink konnte nur einen Ansatz für eventuelle Bindungspartner von IFR1 liefern. Aus diesem Grund wurden weitere Versuche mit dem UV-Crosslink durchgeführt.

3.4.3 UV-Crosslink von RNA und Proteinen

Mit Hilfe von ultraviolettem Licht der Wellenlänge 253 nm können die Heterozyklen von Basen, also auch von in RNA und Proteinen vorkommenden Basen, spezifisch angeregt werden und mit benachbarten Molekülen kovalente Bindungen ausbilden. Durch die UV Bestrahlung eines Polysomenpellets könnte sich darin vorhandenes IFR1 kovalent mit Nukleinsäuren verbinden. Im Western Blot würde sich dies durch einen *shift* der IFR1 Bande nach oben, zu einem höheren Molekulargewicht äußern.

3.4.3.1 Quantitativer UV-Crosslink

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob der UV-Crosslink funktioniert, wurde eine UV-Licht bestrahlte im Vergleich zu einer nicht bestrahlten Polysomenpelletprobe im Western Blot quantitativ analysiert.

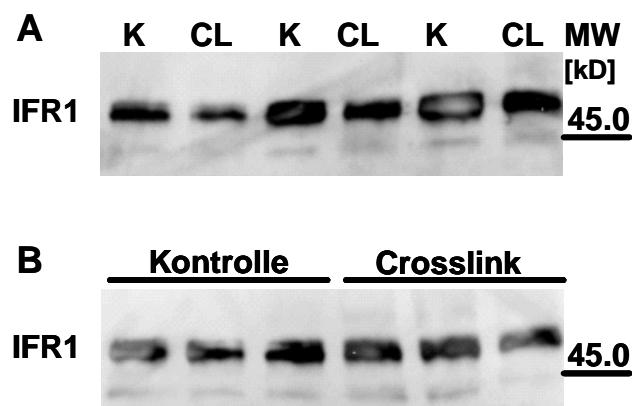


Abbildung 3.29 Western Blot mit IFR1 Antikörper. Quantitative Crosslinks.
Kontrolle K ohne Bestrahlung, Crosslink CL mit 253 nm UV Licht bestrahlt. Auftrag je 10 µg Gesamtprotein pro Spur.

In Abbildung 3.29 A wurde die Kontrolle K und die UV bestrahlte Polysomenpelletprobe abwechselnd aufgetragen, in Abbildung 3.29 B erst dreimal die Kontrolle, dann dreimal die Crosslink Proben, um einen direkten Vergleich der Western Blot Signale zu erhalten. Die UV Crosslink Proben zeigen ein niedrigeres IFR1 Signal als die Kontrollen. Der geringe Unterschied der Signale bewegt sich innerhalb der Standardabweichung und ist für eine genaue quantitative Bestimmung nicht ausreichend. Wie bereits publiziert ist der Anteil eines Crosslinks zwischen RNA und Proteinen oft so gering, dass unser Nachweisverfahren, der Western Blot, nicht sensitiv genug ist, um so kleine Änderungen im Molekulargewicht oder in der Reduktion von Banden, nachzuweisen. Aus diesem Grund wurde der UV Crosslink in folgenden Versuchen qualitativ ausgewertet.

3.4.3.2 Qualitativer UV-Crosslink

Da die quantitative Bestimmung des UV-Crosslinks nicht signifikant war, sollte die Zunahme des Molekulargewichts durch die entstehenden Vernetzungen qualitativ beurteilt werden. Durch die Verwendung von mehr Protein im Ausgangsmaterial sollte erreicht werden, dass höhermolekulare Signale im Western Blot besser detektierbar werden, unter anderem durch die Entstehung eines diffusen, sich über die Spur ziehenden *smears*.

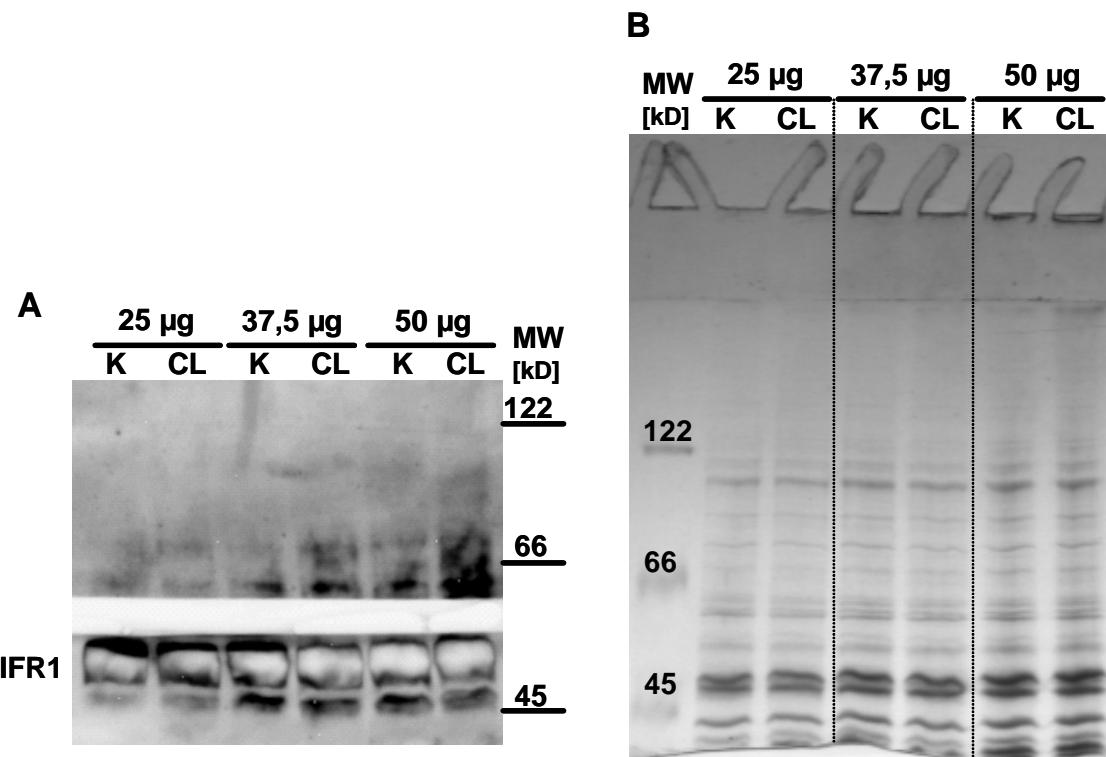


Abbildung 3.30 A Western Blot ($n=3$) mit IFR1 Antikörper eines qualitativen Crosslink. **B** Coomassie gefärbtes SDS-Gel.

Aufgetragen wurden die jeweils in den Spuren angegebenen Mengen Proteins von einem Polysomenpellet.

Im Versuch wurden UV Licht behandelte und nicht behandelte Polysomenpelletproben mit 25 µg, 37,5 µg und 50 µg Gesamtproteininhalt auf ein SDS-Gel geladen (Abbildung 3.30 A). Im unteren Teil ist das starke IFR1 Signal zu erkennen, welches aufgrund der Überstrahlung keine quantitative Aussage zulässt. Auf Höhe des 66 kD Markers ist ein *smear* nachzuweisen der erst ab 37,5 µg eingesetzter Proteinmenge ein leichter *smear* erkennen lässt. Ein gut sichtbarer Unterschied in der Intensität des *smears* zeigt sich bei 50 µg Proteinauftrag. Da der Antikörper gegen IFR1 hier bindet, kann davon ausgegangen werden, dass sich in diesen Spuren IFR1 kovalent an Nukleinsäuren gebunden hat und somit diese diffusen, höhermolekularen Signale auftauchen.

Mit dem Poly-A-binding-protein (PABP), welches an das poly-A Ende der mRNA bindet [Munroe und Jacobson 1990], sollte geklärt werden, ob IFR1 direkt an RNA bindet. Nach dem UV-Crosslink und dem anschließenden Proteintransfer (Auftrag je Spur 37,5 µg Gesamtprotein), wurde der untere Teil der Membran mit dem starken IFR1 Signal bei ca. 48 kD abgeschnitten und verworfen. Die restliche Membran wurde in der Mitte senkrecht auseinander geschnitten und je eine Hälfte mit IFR1 Antikörper oder PABP Antikörper inkubiert. In Abbildung 3.31 (links) wurde der IFR1 Antikörper verwendet und es ist ein leichter *smear* zu sehen, der bei der vernetzten Probe deutlich stärker ist, als bei der Kontrolle. Der Western Blot mit dem PABP Antikörper (Abbildung 3.31

Ergebnisse

rechts) zeigt bei der Crosslinkprobe ein starkes Signal, dass sich fast über die ganze Spur in den höhermolekularen Bereich, bis über 122 kD, zieht.

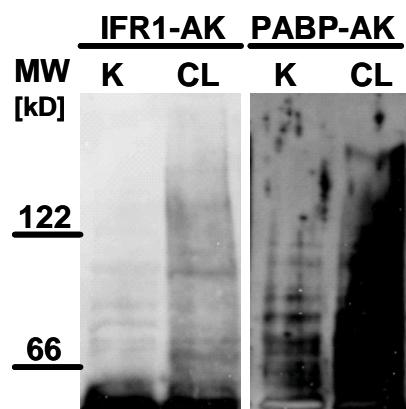


Abbildung 3.31 Western Blots ($n=2$) im direkten Vergleich eines UV-Crosslink mit IFR1 und PABP Antikörper. Auftrag je Spur 37,5 µg polysomale Proteine.

Der Western Blot zeigt nach dem UV-Licht induzierten Crosslink, dass IFR1 RNA-Bindungspartner hat, allerdings sind die Bindungen nicht so deutlich wie bei dem RNA-bindenden Protein PABP. Um eventuelle Bindungspartner zu identifizieren müssen weiter Versuche durchgeführt werden.

3.5 Identifizierung potentieller Bindungspartner von IFR1 mit Far Western Blots von IEF-2D- und AUT-Gelelektrophorese und MALDI-TOF

Durch die Suche von Interaktionspartnern von IFR1 im Polysomenpellet, wurde durch die Saccharosegradienten (siehe 3.3) gezeigt, dass IFR1 mit den ribosomalen Fraktionen assoziiert ist. Die folgenden Versuche sollten mögliche Bindungspartner von IFR1 identifizieren.

3.5.1 Identifizierung von IFR1-Wechselwirkungen durch Far Western Blots

Um Bindungspartner von IFR1 im Polysomenpellet zu identifizieren sollten mit Hilfe des Far Western Blots Protein-Protein-Wechselwirkungen nachgewiesen werden.

3.5.1.1 Far Western Blot der 2D-Gele nach der IEF

Um zu testen, ob IFR1 mit anderen Proteinen in Wechselwirkung treten kann, sollte mit Hilfe der IEF eine wesentlich bessere Auftrennung der einzelnen Proteine aus einer Polysomenpräparation erfolgen. Für die Analyse von Proteinproben mit der MADLI-TOF Massenspektrometrie ist eine gute Auftrennung Voraussetzung für eine Bestimmung. Die IEF und der Far Western erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben.

Nach der ersten IEF mit IPG-strips von pH 3-11 und dem ersten Far Western wurde festgestellt, dass sich hauptsächlich im letzten Drittel des strips, also im basischen pH Bereich, Proteine aus der Polysomenpräparation anreichern. Im ersten, sauren bis neutralen Drittel konnte ein sehr starkes Signal detektiert werden, welches IFR1 zu zuordnen ist. IFR1 hat einen berechneten pl von 6,8 (errechnet mit www.expasy.org) und das erste Drittel des IPG-strips entspricht einem pH Bereich von 3-7 (Daten nicht gezeigt).

In Abbildung 3.32 A und B, ist nur noch ein Teil des letzten Drittels des im SDS-Gel aufgetrennten IPG-strips abgebildet, in dem sich die basischen Proteine angesammelt haben. Es konnten in mehreren Wiederholungen ($n=8$) des Far Western Blots insgesamt 12 verschiedene Signale je einem Protein spot zugeordnet werden. Die am häufigsten vorkommenden und reproduzierbarsten spots waren die so nummerierten Proteine 1 bis 3. Diese ausgewählten Proteine wurden im MALDI-TOF analysiert (siehe 3.5.2.1).

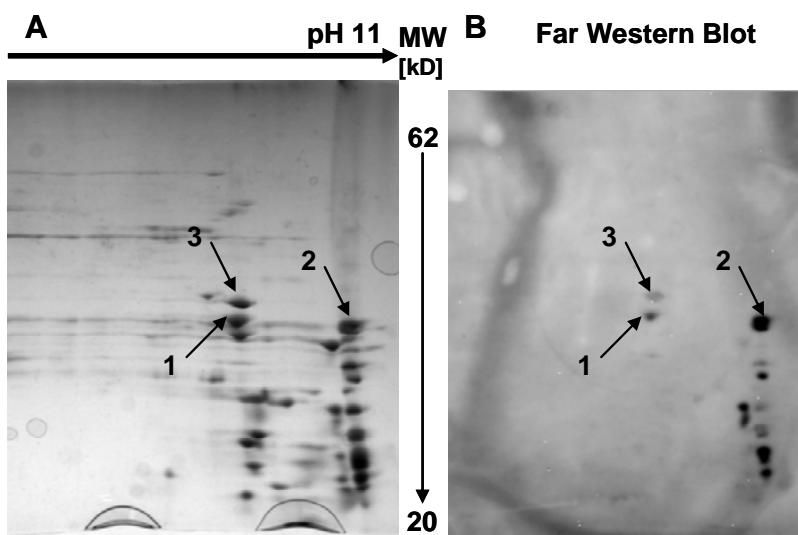


Abbildung 3.32 (A) IEF-Gel und der dazugehörige IFR1 Far Western (B).

Die Zahlen bezeichnen Far Western Signale (B), die nicht eindeutig einem Protein spot im Gel (A) zuordnen lassen. Es wurden nur Proteine ausgewählt, die in mehreren Wiederholungen ($n = 4$) reproduzierbar zu zuordnen waren. Auftrag: 300 µg Polysomale Proteine.

3.5.1.2 Far Western Blot der 2D-Gele nach der AUT-Elektrophorese

Um eine bessere Auftrennung der Proteine die mit IFR1 im Far Western wechselwirken können aus der Polysomenpräparation zu erhalten, wurde die Acid-Urea-Triton-X Gelelektrophorese (AUT) verwendet, eine weitere Möglichkeit Proteine in der ersten Dimension in Abhängigkeit ihrer Ladung zu trennen.

Die AUT-Elektrophorese und der Far Western wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt.

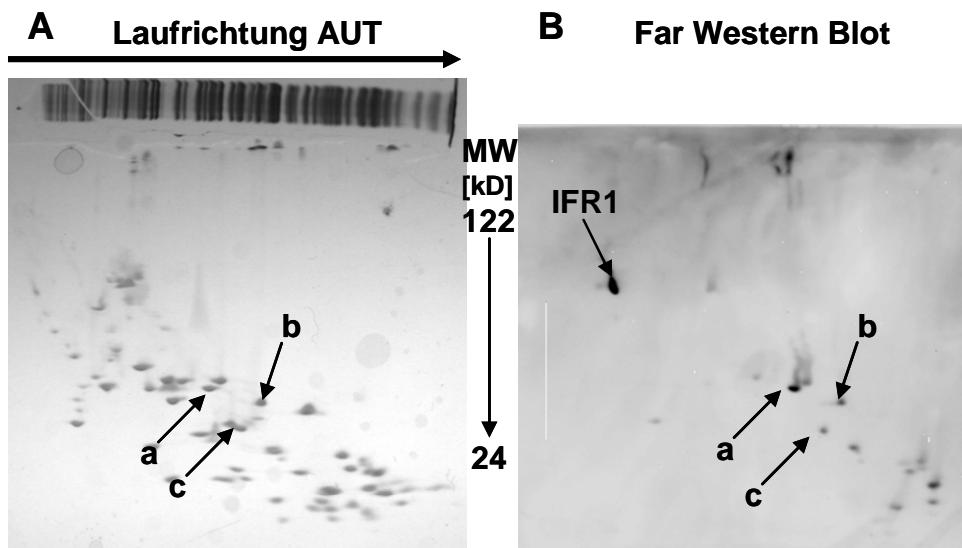


Abbildung 3.33 IFR1 Far Western Blot eines AUT-2D-Geles.

Die Far Western Blot Signale (B) und die entsprechenden Protein spots auf dem Gel (A) sind jeweils Buchstaben zugeordnet worden. Es sind nur Proteine angegeben, die eindeutig zuzuordnen sind und bei den Wiederholungen ($n=6$) reproduzierbar auftraten. Auftrag: 50 µg Polysomale Proteine

Das AUT-2D-Gel in Abbildung 3.33 A zeigt über 40 Protein spots. Viele davon sind nicht eindeutig zu zuordnen. Am oberen Rand des Gels ist, zur besseren Orientierung, eine Spur des AUT-Gels der ersten Dimension aufgelegt. In Abbildung 3.33 B ist der Far Western abgebildet, auf dem das IFR1 Signal bei 48 kD zu erkennen ist und zudem noch weitere Signale, alle unterhalb von 33 kD, die mit IFR1 wechselwirken. Drei der Signale (Buchstaben a-c) lassen sich, nach mehrmaliger Wiederholung ($n=6$) des Far Western Blots, eindeutig und reproduzierbar den Protein spots auf dem Gel zuordnen. Die so bestimmten Proteine a und b wurden im MALDI-TOF analysiert (siehe 3.5.2.2 MALDI-TOF der Proteine aus den AUT-2D Gelen).

3.5.2 Identifizierung von potentiellen Bindungspartner von IFR1

Mit Hilfe der Massenspektrometrie erfolgte die Identifizierung der Proteine, die mit IFR1 wechselwirken. Durch die IPG-strips und die AUT-Gelektrophorese konnten verschiedene Proteine aufgetrennt werden. Davon wurden insgesamt fünf ausgewählt, die signifikant häufig im Far Western ein Signal ergaben.

3.5.2.1 MALDI-TOF der Proteine aus den IEF-2D Gelen

Die zu identifizierenden Proteine wurden anhand der Häufigkeit ihres Auftretens im Far Western Blot, der Intensität ihrer Signale und der Eindeutigkeit der Zuordnung auf den eindimensionalen SDS-Gelen ausgewählt. Nach diesen Kriterien wurden die Proteine 1, 2 und 4 ausgeschnitten (Abbildung 3.34 A) und wie in Material und Methoden beschrieben aus den Gelen mittels Trypsinverdau extrahiert. In Abbildung 3.34 B ist ein Coomassie gefärbtes 2D Gel nach der IEF zu sehen. Die auszuschneidenden Proteine sind mit Pfeilen markiert, im Gel daneben sind die ausgeschnittenen Stellen zu sehen.

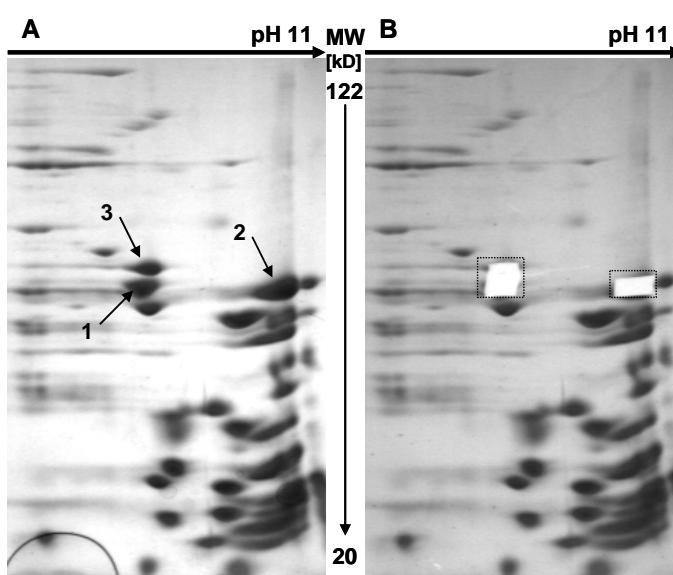


Abbildung 3.34 Coomassie gefärbtes IEF-2D-Gel zur MALDI-TOF Analyse.

In Gel A sind die Proteine, die ausgeschnitten wurden, mit Pfeilen und Ziffern markiert. In Gel B wurden die Gelstückchen ausgeschnitten. Auftragsmenge 300 µg polysomale Proteine.

Ergebnisse

Die massenspektrometrische Identifizierung der Proteine ergab folgendes (Tabelle 3.2):

Tabelle 3.2 Ergebnisse der MALDI-TOF Untersuchung der in der IEF-2D Elektrophorese ausgesuchten Proteine.

Proteinbezeichnung	1	2	3
Protein nach MALDI-TOF	S3a	L7a	L5
Spezies	<i>Gallus gallus</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Gallus gallus</i>
Molekulares Gewicht	29848 Da	39981 Da	34070 Da
Isoelektrischer Punkt	9,74	10,51	9,73

Alle drei identifizierten Proteine konnten dem Haushuhn *Gallus gallus* zugeordnet werden. Es handelt sich dabei um Proteine der kleinen (S3a) und der großen (L7a und L5) ribosomalen Untereinheiten. Demnach kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen IFR1 und den hier identifizierten ribosomalen Proteinen.

3.5.2.2 MALDI-TOF der Proteine aus den AUT-2D Gelen

Mittels der Häufigkeit ihres Auftretens im Far Western Blot, der Intensität ihrer Signale und der Eindeutigkeit der Zuordnung auf den eindimensionalen SDS-Gelen wurden die zu identifizierenden Proteine ausgewählt. Es wurde darauf geachtet, dass nur Signale ausgewählt wurden, die eindeutig nur einem einzigen Protein *spot* zugeordnet werden konnten.

Für die AUT-2D Elektrophorese wurden die Proteine a und b ausgeschnitten und identifiziert.

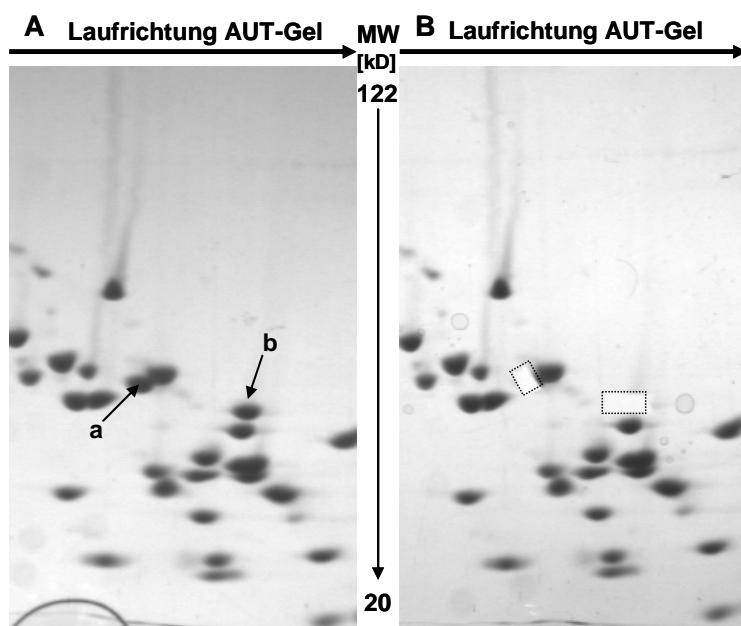


Abbildung 3.35 Coomassie gefärbtes AUT-2D-Gel zur MALDI-TOF Analyse.

In Gel A sind die Proteine, die ausgeschnitten wurden, mit Pfeilen und Buchstaben markiert. Gel B nach dem Ausschneiden der Gelstückchen. Auftragsmenge 50 µg polysomale Proteine.

Tabelle 3.3 Ergebnisse der MALDI-TOF Untersuchung der in der AUT-2D Elektrophorese ausgesuchten Proteine.

Proteinbezeichnung	a	b
Protein nach MALDI-TOF	L8	L13
Spezies	<i>Xenopus laevis</i>	<i>Gallus gallus</i>
Molekulares Gewicht	26995 Da	24381 Da
Isoelektrischer Punkt	11,12	11,75

Die identifizierten Proteine konnten dem Haushuhn *Gallus gallus* und *Xenopus laevis* zugeordnet werden. Bei den potentiellen Bindungspartnern von IFR1 handelt es sich um Proteine der großen (L7a und L5) ribosomalen Untereinheit. Durch die MALDI-TOF und den Far Western konnte eine Wechselwirkung zwischen IFR1 und den hier identifizierten ribosomalen Proteinen bestätigt werden.

3.5.2.3 Sequenzvergleiche der IFR1 Bindungspartner

Durch die MALDI-TOF Untersuchung der in den Far Western Blots gefundenen IFR1 Bindungspartnern konnten fünf verschiedene ribosomale Proteine eindeutig bestimmt werden.

Bei allen fünf potentiellen IFR1 Bindungspartner wurden die Primärstrukturen paarweise mit Hilfe des Dotplotverfahrens (<http://expasy.org/tools/>) auf Ähnlichkeiten hin untersucht. Da keines der untersuchten Paare besondere Sequenzähnlichkeiten zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass IFR1 keine bestimmten Motive der Primärstruktur erkennt. Wahrscheinlicher ist, dass IFR1 Sekundär- oder Tertiärstrukturen erkennt.

4 Diskussion

4.1 Die erythroide IFR1 und TOB Expression ist abhängig vom Entwicklungsstadium

Dragon et al. konnten 2002 bereits zeigen, dass die Expression von *ifr1*, *tob* und *fos* mRNA über den cAMP-Signalweg in mit Noradrenalin stimulierten Erythrozyten von Tag 11 Hühnerembryos induziert wird. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Proteinexpression von IFR1 und TOB in primitiven und definitiven Erythrozyten genauer untersucht.

4.1.1 Primitive Erythrozyten

In primitiven Erythrozyten des 5. Entwicklungstages ist die IFR1 und TOB Proteinexpression (Erythroblasten mit Zellteilungsaktivität, geringem Hämoglobingehalt, hohem RNA-Gehalt [Baumann, 1986]) unter dem Einfluss von NoA nur schwach induzierbar, obwohl nach 4-stündiger NoA Inkubation bereits eine deutliche Erhöhung der *ifr1*- und *tob*-mRNA Expression (Abbildung 3.1) nachweisbar ist [Dragon, 2002]. Ähnliches gilt für die frühesten definitiven Erythrozyten in der Zirkulation (Tag 7-8; postmitotische Erythroblasten mit geringem Hämoglobingehalt): Auch sie können die IFR1 Expression nach NoA-Zugabe kaum induzieren (Abbildung 3.2). Im Gegensatz dazu ist FOS in allen Stadien, auch in primitiven Erythrozyten, induzierbar. Die *ca*// mRNA kann in Tag 5 Erythrozyten bei einer *in vitro* Inkubation mit NoA ebenfalls exprimiert werden [Dragon, 2001], während *in vivo* die Induktion der CAII Synthese durch Hypoxie erst ab Tag 7 festgestellt wurde [Baumann, 1986].

In Tabelle 4.1 ist eine Übersicht der Induzierbarkeit der RNA und der Proteine in verschiedenen Entwicklungsstadien der Erythrozyten dargestellt.

Tabelle 4.1: cAMP-induzierte Transkription und Translation von Erythrozyten des Hühnerembryos verschiedener Entwicklungstage. Alle Erythrozyten wurden für 4h mit 1µM NoA induziert.

Entwicklungsstand Erythrozyten	Tag 5		Tag 7/8 primitive & frühe definitive Erythrozyten		Tag 11 mittlere definitive Erythrozyten		Tag 19 späte definitive Erythrozyten	
	primitive Erythrozyten	mRNA Protein	mRNA Protein	mRNA Protein	mRNA Protein	mRNA Protein	mRNA Protein	mRNA Protein
TK und TL unterschiedlich reguliert bei:								
IFR1	+	-	n.b.	(+)	+	+	+	+
TOB	+	-	n.b.	-	+	+	+	+
CAII	+	-	n.b.	+	+	+	+	n.b.
TK unterschiedlich reguliert bei:								
P5N	-	-			+	+		
HSP70 aus [Dragon, 2001]	-	n.b.			+	n.b.		
TK gleichbleibend reguliert bei:								
FOS	+	+	n.b.	+	+	+	+	+

n.b. nicht bekannt, + wird gebildet, (+) wird gering gebildet, - wird nicht gebildet, TK = Transkription, TL = Translation

In der Literatur wurde in Kaninchen-Retikulozyten ein Translationssilencing-Mechanismus für die erythroide 15-Lipoxygenase beschrieben. Die 15-LOX mRNA kommt dort als ein freies zytoplasmatisches mRNP (messenger Ribonukleoprotein) vor, das translational inaktiv ist [Thiele, 1982]. Sie wird nach ihrer Transkription bis zu ihrer Aktivierung als inaktive Form in den Erythroblasten gelagert. Die Synthese der Lipoxygenase findet nur in den reiferen Retikulozyten statt die das periphere Blut erreicht haben, nicht in Erythroblasten oder in den frühen, sehr jungen Stadien der Retikulozyten [Thiele, 1979].

Diese Art der Translationshemmung könnte auch erklären, weshalb in den unreifen erythroiden Zellen die mRNA von *ifr1*, *tob* und *caii* zwar vorhanden ist, aber kein Protein nachgewiesen werden kann. Die in primitiven Erythrozyten benötigten Proteine müssen in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt werden, da diese teilungsfähigen Zellen eine hohe Transkriptions- und Translationsaktivität besitzen, und ihre DNA replizieren müssen. Durch den möglichen hemmenden Einfluss von IFR1, TOB und CAII, könnte die Reifung der primitiven erythroiden Zellen negativ beeinflusst werden. Eine andere Erklärung für die fehlende Proteinsynthese von IFR1, TOB und CAII in den jungen, primitiven Erythrozyten könnte auch sein, dass diese Proteine in den primitiven Erythrozyten keine Funktion übernehmen, sondern erst in den späteren Stadien der Embryoentwicklung, z.B. beim Eintreten der entwicklungsbedingten Hypoxie.

4.1.2 Definitive Erythrozyten

Im Gegensatz zur fehlenden Translation von IFR1, TOB und FOS in primitiven Erythrozyten sind die drei Proteine in definitiven, embryonalen Erythrozyten (Inkubationstag 11) transient exprimiert. Allerdings zeigen sie nach der Induktion mit NoA eine unterschiedlich lange Verweildauer und Stabilität (Abbildung 3.3 und Abbildung 3.10) und ihre zugehörige mRNA hat zu verschiedenen Zeitpunkten ein Maximum (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2 Übersicht der mRNA und Proteinmaxima der Kurzzeit- und Langzeitinkubation von IFR1, TOB und FOS in NoA-induzierten Tag 11 Erythrozyten

TOB	mRNA	[h]	Protein
TOB	leichter Anstieg	2	Maximum
	Maximum	4-8	Abnahme
	Abnahme	12-24	Abnahme; kein Protein bei 24 h
IFR1	mRNA	[h]	Protein
	leichter Anstieg	2	Leichter Anstieg
	Maximum	4-12	Anstieg; Maximum bei 8-12h
FOS	-	24-48	Abnahme
	mRNA	[h]	Protein
	Maximum	2	Anstieg
FOS	Langsame Abnahme	4	Maximum
	Abnahme	8-24	Abnahme

Auffällig ist, dass TOB Protein abgebaut wird, obwohl die mRNA von TOB noch an Menge zunimmt, während bei IFR1 Gen- und Proteinexpression parallel verläuft. Bei FOS geht ein mRNA-Maximum bei 2 Stunden dem Proteinmaximum bei 4 Stunden voran. Es gibt in den definitiven embryonalen Erythrozyten also eine zeitlich aufeinander abgestimmte Induktion der mRNA und der Proteinexpression durch cAMP. Werden NoA-stimulierte Tag 11 Erythrozyten mit dem β -adrenergen Rezeptor Antagonist Propranolol versetzt, so werden alle drei Proteine nur gering exprimiert (Abbildung 3.3). Dies hängt damit zusammen, dass die Genexpression von *ifr1*, *tob* und *fos* mit Propranolol fast komplett inhibiert werden kann [Dragon, 2002] und somit nur eine minimale Proteinsynthese stattfindet. Durch die Blockierung der β 1- und β 2-adrenergen Rezeptoren mit Propranolol, kann NoA nicht mehr an die Rezeptoren binden, der cAMP-Signalweg wird gehemmt und es erfolgt keine Transkription der drei mRNAs [Dragon, 2002].

Mit den Adenosin A2-Rezeptoragonisten CPCA und Forskolin (Abbildung 3.4), einem direkten Aktivator der Adenylatcyclase, können IFR1, TOB und FOS in definitiven Erythrozyten induziert werden. Das Ergebnis stellt klar, dass das cAMP-Signal für die Induktion notwendig ist, wie Dragon et al. 2002 bereits bei der Transkription von *ifr1*, *tob* und *fos* in erythroiden Zellen zeigen konnten.

Für eine Beteiligung des klassischen Signaltransduktionsweges über die cAMP-aktivierte Proteinkinase A spricht, dass die NoA-abhängige Induktion von IFR1/FOS/TOB durch den Proteinkinase A-spezifischen Inhibitor H89 komplett aufgehoben werden kann, wenn er dem Inkubationsmedium zugegeben wird (Abbildung 3.4).

Damit ist klar, dass die Translation von IFR1, TOB und FOS in definitiven Erythrozyten durch die hormonelle Induktion mit NoA über die Signalkaskade cAMP → PKA → CREB-Phosphorylierung → Transkription abläuft.

Der Signalweg wird physiologisch bedeutsam, wenn im Embryo hypoxiebedingt Adenosin und Noradrenalin freigesetzt werden. Durch die Ausschüttung des Stresshormons NoA und der damit einhergehenden vermehrten Synthese von cAMP könnte eine Beschleunigung der Differenzierung ausgelöst werden, die zu einer schnelleren Reifung der definitiven Erythrozyten führt.

4.1.3 Späte definitive Erythrozyten

Auch in den späten definitiven Erythrozyten von Tag 17 bis Tag 19 (Abbildung 3.7) führt das NoA-bedingte Stresssignal zur Transkription der *ifr1*, *tob* und *fos* mRNA, die dann in Protein übersetzt wird. Selbst in fast ausdifferenzierten Erythrozyten des 19. Entwicklungstages kann die IFR1-Expression durch NoA noch deutlich induziert werden, obwohl in der späten terminalen Differenzierung der Kern der definitiven Erythrozyten kondensiert [Bruns und Ingram, 1973], die Proteinsynthese abnimmt (einige Ribosomen bleiben erhalten) und die Zellen sich auf ihre letztendliche Hauptaufgabe vorbereiten, dem Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidtransport. Selbst so spät ist eine Hemmung der NoA induzierten Proteinsynthese durch Propranolol oder Actinomycin D möglich (Abbildung 3.7). Da Actinomycin D die DNA-abhängige RNA-Polymerase blockiert, kommt es zu einem mRNA- und Proteinabfall. Die mögliche Blockierung der Induzierung mit Actinomycin D in Tag 19 Erythrozyten weist darauf hin, dass sowohl IFR1, als auch TOB und FOS unter den letzten Genen sind, die transkribiert und reguliert werden, bevor der Kern während der abschließenden erythroiden Reifung inaktiviert wird.

Interessanterweise steigt, parallel zur dieser induzierbaren Expression von IRF1, TOB und FOS, im letzten Drittel der Embryonalentwicklung die CAII-Aktivität im Hühnererythrozyten zusammen mit der *caII* mRNA an [Dragon 2003]. Dies hängt damit zusammen, dass ab dem 13. Tag der Embryonalentwicklung NoA im Plasma ansteigt (Abbildung 1.4) und damit die Gen- und Proteinexpression von CAII gesteigert wird. Dieser Anstieg dient dazu, die negativen Effekte der Hypercapnie auf den pH Wert des Blutes und auf die Hämoglobin Sauerstoff Affinität zu minimieren [Birchard und Black,

1986]. Diese Anpassung ist für den Embryo überlebenswichtig. Allerdings ist die *ca*//mRNA Menge in der RT-PCR von Tag 19 Erythrozyten sehr gering, da die definitiven Erythrozyten bis zu diesem Tag genügend CAII bilden konnten.

4.2 Mögliche Funktionen der induzierten Proteine

Sowohl für IFR1 als auch für TOB wurden in der Literatur verschiedene Funktionen beschrieben, die einen Zusammenhang zwischen der terminalen Differenzierung und der Induzierbarkeit von IFR1 und TOB bestätigen.

Im System der definitiven Erythrozyten ist TOB ein kurzlebiges Protein. Für TOB konnte bereits nachgewiesen werden, dass es zum einen sehr labil ist [Varnum, 1994] und dass es über Proteasomen abgebaut wird [Sasajima, 2002]. Es gehört zur Familie der APRO Proteine [Matsuda, 2001] die mit einigen zellulären Signalsystemen in Verbindung gebracht werden, wie z.B. Tyrosin-Rezeptor-Kinasen [Matsuda, 1996], Rezeptor-Serin-Kinasen [Yoshida, 2000] und Cyclin-abhängige Kinasen [Inamdar, 1996]. TOB unterdrückt dabei ein mitogenes Signal, indem es an die Komponenten (ErbB2, Smad1, 5 und 8, Caf1) des Signalwegs bindet.

Zudem verstärkt es die mRNA-Deadenylierung in Säugerzellen, indem es zur gleichen Zeit an den CCR4-CAF1-Nuklease Komplex [Ezzeddine, 2007] und an zytoplasmatisches Poly(A)-bindende Protein binden kann [Ezzeddine, 2007; Okochi, 2005]. Von Mauxion et al 2008 gezeigt werden, dass BTG2, ein Mitglied der BTG/TOB APRO-Proteinfamilie, ein allgemeiner Aktivator der mRNA-Deadenylierung ist. Es ist bekannt, dass die Deadenylierung der erste und wichtigste Schritt ist, der den mRNA-Abbau in Säugerzellen auslöst [Meyer, 2004; Parker und Song, 2004]. Die ausschließliche Lokalisation von TOB im Zytosol und die nicht nachweisbare Bindung an Ribosomen ist außerdem eine ideale Voraussetzung für seine Funktion als Bindungspartner von Ccr4/Caf1 und PABP.

Eine mögliche Erklärung für die Beschränkung der TOB-Proteinexpression auf die post-mitotische Phase der Reifung von Erythrozyten könnte die Eigenschaft der TOB-Proteinfamilie sein, die Zellproliferation zu inhibieren und als Repressor der Transkription zu dienen [Jia und Meng, 2007]. Zudem kommt es durch TOB in der späten Differenzierung zu einem schnelleren Abbau von kurz zuvor synthetisierten mRNAs um eine schnelle Installierung eines neuen Genexpressions Programms zu vereinfachen [Mauxion, 2008].

IFR1 wird als Regulator der neuronalen Differenzierung in der Chromaffinen Zelllinie PC12 der Ratten [Tirone und Shooter, 1989] und als positiver Regulator während der Muskeldifferenzierung in der C2C12 Myoblastenzelllinie der Maus [Guardavaccaro,

1995] beschrieben. Zudem stellten Vadivelu et al 2004 eine regulatorische Rolle von TIS7 (=IFR1) während der Muskelregeneration in adulten Mäusen fest. IFR1 ist meist an verschiedenen Differenzierungsprozessen beteiligt und könnte auch in den definitiven Erythrozyten des Hühnerembryos eine Rolle bei der terminalen Differenzierung spielen.

Eine mögliche Erklärung für die Induzierbarkeit in so einem späten Reifungsstadium der Erythrozyten wäre, dass IFR1 und TOB die Translation von mRNA in der terminalen Differenzierung herab setzen oder hemmen und damit die letzte Phase der Differenzierung unterstützen. So könnte die verbleibende Translationsmaschinerie für die letzten, wichtigen noch zu translatierenden mRNAs zur Verfügung stehen um somit die Differenzierung voranzutreiben.

Im System der späten terminalen Differenzierung könnte TOB in Hühnererythrozyten dazu beitragen, dass ein Teil der zu translatierenden mRNAs erst deadenyliert und dann abgebaut wird und damit den Abschluss der Differenzierung voranzutreiben, indem es die Translation der mRNA einiger spät exprimierter Gene hemmt. Gegen Ende der Differenzierung ist der mRNA Pool relativ klein, da nur noch sehr wenige Proteine synthetisiert werden. Über den TOB-Impuls könnte es zum unspezifischen Abbau von mRNA und damit zu einer Verschiebung im translatierten mRNA Pool kommen, bei der stabile mRNA weiterhin translatiert werden kann, während instabile mRNA schneller abgebaut werden. TOB würde so über die Veränderung des mRNA Pools indirekt die Proteinsynthese beeinflussen. Dies könnte auch erklären, warum IFR1 in den späten Tagen der Differenzierung immer noch über NoA induziert werden kann. Es könnte einen noch ungeklärten Mechanismus geben, der über die kurzzeitige, instabile TOB Expression die Differenzierung steuern kann. Allerdings ist noch nichts Genaues bekannt über die Regulierung der letzten Schritte des Differenzierungsprogramms, das in embryonale Erythrozyten in Gang gesetzt wird.

4.3 Stabilität von TOB und IFR1

In den Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass TOB ein instabiles Protein ist, das nach 2 Stunden Inkubation mit NoA wieder abgebaut wird. Es kann aber, wie erwartet, durch die Zugabe des Proteasominhibitors MG132 stabilisiert werden, da es über das Proteasom nicht mehr abgebaut wird [Sasajima, 2002]. Im Gegensatz zu TOB kann bei IFR1 nicht dieselbe Wirkung beobachtet werden, sondern das sehr stabile Protein, welches seine maximale Expression erst nach 8 Stunden zeigt (Abbildung 3.10), akkumuliert paradoxerweise bei der Zugabe von MG132 ins Medium weniger stark. Dies ist sowohl nach 4-stündiger NoA Stimulierung in Erythrozyten des 5. bis 11.

Entwicklungstages zu sehen (Abbildung 3.2) als auch nach 16-stündiger NoA Stimulierung in Tag 11 Erythrozyten (Abbildung 3.5). Auch bei CAII kommt es durch Zugabe von MG132 zu einer Hemmung der Translation.

Es kann also beobachtet werden, dass mit MG132 TOB angereichert wird, und langsam ansteigende Proteine wie IFR1 gehemmt werden. Werden definitive Erythrozyten des 11. Entwicklungstages für 16 Stunden ohne MG132 mit NoA stimuliert, kommt es wie erwartet nach 2 Stunden zum Abbau von TOB und zur Akkumulation von IFR1 (für CAII liegen keine Daten vor). Auch eine folgende 24-stündige NoA + MG132 Inkubation führt nicht zum erkennbaren Abbau von IFR1, vielmehr wird IFR1 aufgrund seiner Stabilität nach der langen Inkubationsdauer von 40 Stunden langsam abgebaut.

Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Anhäufung von TOB in definitiven Erythrozyten durch die Verstärkung der Deadenylierung [Ezzeddine, 2007] zum vermehrten Abbau von mRNA und damit offensichtlich zur Inhibition der Translation von CAII und IFR1 führt. Die kurzzeitige, transiente TOB Expression könnte ein wichtiger Faktor für die effiziente CAII- und damit auch für die IFR1-Synthese oder Regulation dieser Gene sein. Für TOB wurde nachgewiesen, dass es in T-Lymphozyten durch die Bindung an PABP als Translationsrepressor der Zellspezifischen IL-2 mRNA agiert [Okochi, 2005]. So könnte die kurze Expression von TOB unter normalen Inkubationsbedingungen die Beschleunigung des Abbaus der zellulären mRNA hervorrufen und damit als eine Art „Aktivator“ für die schnelle Umorganisation der Genexpression von IFR1 und CAII dienen.

4.4 TOB ist im Zytosol lokalisiert, IFR1 wandert vom Zytosol in den Kern

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IFR1 und TOB in definitiven Erythrozyten unterschiedlich lokalisiert sind. TOB wird im Zytosol nachgewiesen und ein Teil von IFR1 wandert nach 16-stündiger Inkubation mit NoA vom Zytosol in die Fraktion, die den Zellkern enthält (Abbildung 3.12). Diese Erkenntnisse vervollständigen die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe von 2007 [Steiner, 2007], in denen eine zytosolische Lokalisation für IFR1 und TOB während der Kurzzeitinkubation von 6 Stunden beschrieben wurde. In der Literatur wurde zudem sowohl für TOB [Jia, 2007] als auch für IFR1 [Vietor, 2002] in nicht-erythroiden Zellen ein Vorkommen im Zytoplasma und im Kern beobachtet. Der Transkriptionsfaktor FOS, der als eindeutiger Kernmarker dient (Abbildung 3.12), bindet an AP-1 Bindungsstellen als Heterodimer mit anderen Aktivatoren (z.B. Jun und Maf) der Transkription [Angel, 1991].

Definitive embryonale Hühnererythrozyten exprimieren nur noch wenige Gene, die mit der terminalen erythroiden Differenzierung abgeschaltet werden. Die Abschaltung eines Gens wird begleitet von Deacetylierungen der gebundenen Histone in der jeweiligen Genregion [Mutskov, 2004.]. Auch in Hühnererythrozyten wurde für die HDAC1 [Li, 1996] gezeigt, dass sie einen festen kernassoziierten und einen zytosolischen Anteil hat.

Wie gezeigt werden konnte, ist IFR1 während der terminalen Erythrozytenreifung 12-24 Stunden nach der Stimulierung mit cAMP teilweise kernlokalisiert. Innerhalb dieser Zeit kommt die Induktion einiger cAMP-abhängiger Gene, wie *caII* und *ifr1*, zum Stillstand bzw. einige Gene, darunter *tob*, *fos*, *hsp70* und *p5n*, die herunterreguliert werden.

Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass IFR1 an dieser terminalen Genabschaltung beteiligt sein könnte. So könnte IFR1 in embryonalen Hühnererythrozyten eine Funktion als „Gen-Silencer“ haben, und damit würde das cAMP-Signal eine neue reifungsbeschleunigende Funktion haben, die im Kontext des Hühnerembryos eine adaptive Maßnahme an Hypoxie darstellen würde.

Lokalisierungsstudien in PC12-Zellen und in einer epithelialen Brustdrüsenzelllinie der Maus zeigten eine Umverteilung von IFR1 vom Zytosol zur Plasmamembran nach hormoneller Stimulation und eine allmähliche Akkumulation von IFR1 im Kern [Dragon, 2003; Hebbes, 1988]. Dieses Ergebnis weist IFR1 eine mögliche Verbindung zwischen membranständigen Rezeptorsignalen und der Transkriptionsregulation zu.

In der epithelialen Brustdrüsenzelllinie konnte IFR1 erstmals eine spezifische Funktion zugewiesen werden, die auch für terminal differenzierende Erythrozyten in Betracht käme [Vietor, 2002]: IFR1 bindet und aktiviert in diesen Zellen die Histondeazetylase1 des SIN3-Komplexes und hemmt in Folge die Expression einer Reihe von Genen. Im Kern der definitiven Erythrozyten könnte demnach IFR1 mit DNA-gebundenen Histonen in Kontakt kommen und dort als Signal für die HDAC1, d.h. als Histondeazetylase-Aktivator dienen.

Da es bei der terminalen erythroiden Differenzierung schlussendlich zur Transkriptionshemmung aller noch aktiven Gene kommt, könnte das IFR1-Protein an der Hemmung einiger Gene beteiligt sein. Damit würde also cAMP in embryonalen Erythrozyten nach einem starken „On-Signal“ für Gene (evtl. Histonazetylierungen durch Phospho-CREB) möglicherweise über die Induktion von IFR1 ein zeitlich versetztes „Off“-Signal für die Transkription von Genen liefern (Histondeazetylierungen).

Neben IFR1 und TOB wird auch die Pyrimidin-5'-Nukleotidase durch Noradrenalin und Adenosin in definitiven Erythrozyten induziert [Dragon, 1998; Mass, 2003]. Das Schlüsselenzym des Pyrimidinstoffwechsels, ist an der Einstellung der

Pyrimidinnukleotidkonzentrationen von UTP und CTP, und damit an der Einstellung der O₂-Affinität des Hämoglobins beteiligt [Dragon, 1998]. In zirkulierenden embryonalen Hühnererythrozyten findet während der Differenzierung ein massiver Abbau der ribosomalen RNA statt (Baumann, 2003.). Daher ist es wahrscheinlich, dass die Nukleotide, die sich in embryonalen Erythrozyten anreichern, aus dem RNA-Abbau stammen. Abbauende Enzyme, wie die Pyrimidin-5'-Nukleotidase, entscheiden darüber, ob die Mononukleotide aus dem RNA-Abbau im Erythrozyten verbleiben und zu Trinukleotiden phosphoryliert werden, oder ob sie - dephosphoryliert zu Nukleosiden - die Zelle verlassen. Zeitgleich mit der Pyrimidin-5'-Nukleotidase wird auch IFR1 in NoA stimulierten definitiven Erythrozyten, über den cAMP Signalweg, hoch reguliert.

So könnte die Aufgabe des zytosolischen, hoch regulierten IFR1, ähnlich der Rolle der Pyrimidin-5'-Nukleotidase die am RNA Abbau beteiligt ist, darin bestehen, dass IFR verstärkend auf die Proteinacetylierung wirkt und somit zum Abbau der ribosomalen RNA beitragen, oder aber durch seine Bindung an die Ribosomen diese als Ziel für den Abbau markieren.

4.5 Knock-down der Genexpression von *ifr1* in definitiven Erythrozyten

In dieser Arbeit konnte keine ausreichendes silencing der IFR1 mRNA erreicht werden. Es konnte zwar mit DMRIE-C eine Transfektion in Tag 14 Erythrozyten gezeigt werden, allerdings kam es nicht zu einem vollkommenen Ausschalten von *ifr1*.

Interessant wäre ein 90-100%iger knock down der *ifr1* mRNA, da so Gene, deren steady-state-Level sich durch die IFR1-Expressionshemmung stabilisieren lassen, auf ihre Transkription- und Translationssaktivität hin untersucht werden könnten. Auch die Auswirkungen auf die zuletzt exprimierten Proteine wie TOB und CAII, oder deren mRNAs könnte nachgewiesen werden.

Trotz Optimierung der Anleitung von Suspensionszellen war die Transfektion der Erythrozyten ein Problem, da es sich dabei nicht um teilende Zellen handelt, sondern um post-mitotische, definitive Erythrozyten, und alle sich bisherigen in der Literatur beschriebenen Transfektionen auf sich teilende, adhärente- oder Suspensions-Zellen beschränkten.

Durch die NoA Induktion wurde die mRNA Expression der Erythrozyten erhöht. Deshalb schien die eingebrachte siRNA nicht auszureichen, um die durch NoA induzierte *ifr1* mRNA zu *silencen*. Zudem hätten für ein effizientes *silencing* mehrere siRNAs ausgetestet werden müssen, um die Kreuzreaktivität der verwendeten siRNA auszuschließen.

Ein weiteres Problem war die Stabilität der Transfektion, die für Erythrozyten nicht bekannt ist, obwohl es ausreicht die siRNA selbst in die Zelle zu bringen, um transient den RNAi-Effekt zu initiieren [Elbashir, 2001]. Durch die verwendeten Liposomen trat eine starke Hämolyse auf, die in der 4h NoA Kontrolle nicht festgestellt wurde. Deshalb konnte nicht sichergestellt werden, ob der erzielte knock-down durch die transfizierte siRNA zustande kam.

Versuche in Tag 11 Erythrozyten nach 4 Stunden ohne NoA Zugabe könnten eventuell klären, ob die relativ geringe Menge an mRNA (Abbildung 3.15) so gesilencet werden könnte, dass es auf mRNA Ebene zu keinem Signal mehr kommt.

Wenn IFR1, wie vermutet, an ribosomale Proteine binden kann und damit die Translation von anderen Proteinen beeinflusst, könnte durch das silencing erklärt werden, ob es zu einer besseren oder schlechteren Translation anderer Proteine kommt und die Funktion von IFR1 in der terminalen Differenzierung von Erythrozyten könnte aufgedeckt werden.

4.6 IFR1 ist in definitiven Erythrozyten mit Ribosomen assoziiert

Während TOB in den löslichen Fraktionen des linearen Saccharosegradienten wieder zu finden ist, ist IFR1 im Gegensatz dazu mit den ribosomalen Fraktionen im Saccharosegradienten assoziiert ist (3.3.4). Die Bindung von IFR1 an Ribosomen ist sehr stark und wird oft nur mit den Ribosomen im Gradientenprofil verschoben. So kann durch die Behandlungen mit KCl davon ausgegangen werden, dass IFR1 nicht an polysomengebundene Proteine assoziiert ist, die bei 0,5 M KCl abdissoziieren, sondern mit intrinsischen, ribosomalen Proteinen, da es sich bei 0,9M KCl mit in die vorderen Fraktionen verschieben lässt. Die durch die EDTA-Behandlung hervorgerufene Dissoziation der 80s-Ribosomen in die 40s- und 60s-Untereinheiten konnte aufzeigen, dass IFR1 mit einer oder beiden Untereinheiten wechselwirkt. Zudem konnte die RnaseA Behandlung klären, dass die Hydrolyse der mRNA die Bindung von IFR1 nicht beeinflusst und damit IFR1 nicht an die mRNA gebunden ist. Erst bei einem kompletten Abbau der RNA durch EDTA und RnaseA löst sich IFR1 von den Ribosomen und wird frei löslich.

Die Bindung von IFR1 an Ribosomen und sein Vorkommen im Zytoplasma weisen auf eine mögliche Funktion von IFR1 hin. So sind Ribosomen, wie 90% der Säugerproteine, N^a-terminal acetyliert [Driesssen, 1985] und die Deacetylierung dient als ein Signal für den Abbau von Proteinen. Außerdem sind Histondeacetylasen, wie

HDAC1, in der Lage, auch andere, nicht-Histon Proteine zu acetylieren [Yoshida, 2003].

In diesem Zusammenhang könnte IFR1 der Protein- oder Histondeacetylase als Signal dienen, damit die ribosomale RNA deacetyliert und damit abgebaut werden könnte.

Im Gegensatz zu TOB akkumuliert IFR1 in NoA-induzierten definitiven Erythrozyten über einige Stunden hinweg (Konzentration von ~2,7 µM in Tag 11 Erythrozyten Abbildung 3.14) und findet sich in den ribosomalen Fraktionen wieder (siehe 3.3.4), bevor es nach 24 Stunden langsam abgebaut wird (Abbildung 3.11). Mit einer ungefähren Schätzung des Ribosomengehalts von Tag 11 Erythrozyten von 0,8 – 1,5 µmol/l Erythrozyten, basierend auf 380 – 660 µg extrahierte RNA pro 10^6 Erythrozyten; MCV = 180 fl, MW_{RNA} = 2280 kD [Romanoff, 1967; Dragon und Baumann, 2003; Loening, 1968], konnte ein ungefähres Verhältnis von mindestens einem IFR1 Molekül pro Ribosom ausgerechnet werden. Die Häufigkeit von IFR1 und die nachgewiesene ribosomale Lokalisation legen nahe, dass IFR1 einen hauptsächlichen Effekt auf das Translationssystem haben muss. Unterstützt wird diese These durch die mittels 2D-Gelelektrophorese, Far Western Blot und MALDI-TOF Massenspektrometrie gefundenen Bindungspartner. Es handelt sich dabei um die ribosomalen Proteine L7a, L8, L13 und S3a (siehe 3.5), die über IFR1 miteinander verbunden sein könnten.

4.7 Potentielle Bindungspartner von IFR1

4.7.1 Intermolekulare Wechselwirkungen von IFR1 mit Proteinen

Die verschiedensten chemischen Crosslinker werden eingesetzt, um intramolekulare oder intermolekulare Protein Interaktionen zu untersuchen. Die Verwendung von homobifunktionellen Crosslinkern, die an beiden Seiten die gleiche reaktive Gruppe tragen und über eine Kohlenstoffkette miteinander verbunden sind, hat den Vorteil, dass identische funktionelle Gruppen von Proteinen miteinander verbunden werden. Ein Nachteil ist sicher, dass sie eine große Anzahl von undefinierbaren Produkten hervorrufen können [Avrameas, 1969].

Mit der Hilfe von DSS und DMP sollte ein intermolekulares Crosslinking stattfinden, um damit Protein-Protein-Wechselwirkungen aufzuklären zu können. Um die Menge an Crosslink Produkt abschätzen zu können und um die Reaktionskonditionen zu optimieren, wurde eine eindimensionale SDS-PAGE und ein anschließender Western Blot mit IFR1 Antikörper durchgeführt.

In dem mit DMP durchgeführten Crosslink kam es nicht, wie erwartet durch die Bindung von Proteinen an IFR1 zur Bildung einer höhermolekularen Bande, sondern nur zu einem Proteinschmier, der allerdings auch in der Kontrolle mit HBS-Puffer (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4) sichtbar wurde. Trotz der geringen Kreuzreaktivität kam es nicht zur Bildung von spezifischen Bindungen. Der auftretenden Schmier in den Spuren des Western Blots konnte nicht erklärt werden (Abbildung 3.26).

Da mit DSS in *Saccharomyces cerevisiae* mittels Protein-Protein Crosslink die räumliche Ausrichtung von Proteinen innerhalb der 40s ribosomalen Untereinheit geklärt werden konnte [Yeh, 1986], wurde dieser Crosslinker für weitere Versuche verwendet. Es kam zu keinem Shift der IFR1-Bande im Western Blot, allerdings kam es zu einer Reduzierung der IFR1-Bande mit ansteigendem Crosslink-Reagenz und zu keiner Reaktion mit der DMSO Kontrolle. Das Ergebnis in Abbildung 3.27 A zeigt, dass IFR1 mit Proteinen aus dem Polysomenpellet wechselwirkt und so eventuell große, komplexe Moleküle entstehen, die nicht mehr in das SDS-Gel einwandern können und damit in den Taschen des Sammelgels hängen bleiben bzw., wie in Abbildung 3.27 B zu sehen, einen Proteinschmier in höhermolekularen Bereichen des SDS-Gels hinterlassen.

Ein limitierender Faktor in dieser Crosslinkreaktion könnte sein, dass alle Reagenzien zur gleichen Zeit zusammen kommen und damit viele verschiedene Crosslink Produkte entstehen können. Eine Möglichkeit der Verbesserung würde darin bestehen, den Crosslink auf zwei Schritte aufzuteilen. Dabei könnte rekombinantes IFR1 Protein erst mit dem Crosslinker reagieren, um ein „aktiviertes“ Protein zu bilden. Anschließend könnte überschüssiges DSS Reagenz entfernt werden und das aktivierte Protein könnte mit einem zweiten potentiellen Bindungspartner gemischt werden, um eine Wechselwirkung zu erzielen [Hermanson, 1996].

Die weitere Vorgehensweise bei der eindeutigen Identifizierung eines Bindungspartner von IFR1 mittels Crosslinks wäre die Isolierung eines Protein-shifts von IFR1 im Western Blot und die anschließende Analyse der verdauten Proteine mit der MALDI-TOF-Massenspektrometrie.

4.7.2 Kovalente Bindung von IFR1 an RNA durch RNA Bindeproteine

In dieser Arbeit sollte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von ultraviolettem Licht der Wellenlänge 253nm ein photochemischer Crosslink zwischen dem IFR1 Protein und RNA induziert werden kann. Bei der Verwendung eines nativen Protein-RNA-Komplexes können mit dieser Technik Interaktionen zwischen Proteinen und RNA charakterisiert werden [Haynes, 1999].

Bei der Quantifizierung des UV Crosslinks aus Abbildung 3.29 konnten zwischen den Kontrollen und den Crosslinks keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, da die Effizienz eines UV Crosslinks sehr gering und auf der Proteinebene fast nicht nachweisbar ist. Von Meisenheimer und Koch wurde 1997 eine typische Ausbeute für einen UV-Crosslink von 5 bis 20 % für RNA-bindende Proteine beschrieben.

Mit einer Erhöhung der Proteinmenge (Abbildung 3.30 A) konnte eine zumindest eine qualitative Aussage getroffen werden: IFR1 bindet an RNA, denn in den UV-Licht bestrahlten Pelletproben konnte im Western Blot ein höhermolekularer Schmier, der deutlich stärker als bei den nicht bestrahlten Kontrollproben war, detektiert werden. Es kommt also zu einer kovalenten Verknüpfung zwischen IFR1 und RNA, allerdings kann das RNA bindende Protein PABP (Vergleich der beiden Western Blots in Abbildung 3.31) im Vergleich zu IFR1 deutlich mehr RNA binden.

Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass IFR1 in der Nähe von RNA lokalisiert ist, aber selber wahrscheinlich keine RNA Bindedomäne besitzt. So erklärt sich auch, dass im Far Western Blots und MALDI-TOF (3.5) L5 und S3a, zwei RNA-Bindeproteine, als Bindungspartner von IFR1 identifiziert wurden. Es liegt also nahe, dass IFR1 über L5 oder S3a in einem UV-Crosslink an die RNA kovalent gebunden werden könnte.

4.7.3 Identifizierung von IFR1-Bindungspartnern mit Hilfe des Far Western Blots

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche IFR1 Bindungspartner zu finden und zu identifizieren. Mit Hilfe des Far Western Blots konnte gezeigt werden, dass IFR1 mit ribosomalen Proteinen in Wechselwirkung treten kann.

Entscheidend für die Auswahl der Proteine in der IEF-2D- und der AUT-2D-Gelelektrophorese waren die Reproduzierbarkeit und Häufigkeit der wechselwirkenden Proteine, die leichte Zuordnung der Proteine vom Far Western Blot zum eindimensionalen SDS-Gel, die Lage des Proteins, die Ausschneidbarkeit des Proteins (ohne störende Nachbarproteine) und die Größe des Spots, da für die Identifizierung mit der MALDI-TOF Massenspektrometrie genug Proteinmaterial zur Verfügung stehen sollte.

Mit dem Far Western Blot der IEF-2D (Abbildung 3.32 B) konnten einige Proteine detektiert werden, die mit dem rekombinanten IFR1 reagieren. Es wurden die Proteine 1, 2 und 3 ausgewählt, die bei insgesamt vier Western Blots am häufigsten ein übereinstimmendes Signal zeigten. Protein 3 ist mit ca. 33 kD Molekulargewicht etwas größer als Protein 1 und 2.

Um eine bessere Auflösung der ribosomalen Proteine mit einem pl von 11 und mehr zu erreichen, wurde die AUT-Gelelektrophorese verwendet. Die Abbildung 3.33 B des Far Western Blots zeigt deutlich bei 48 kD das IFR1 Signal als Spot. Um ionische Wechselwirkungen des rekombinanten IFR1 mit unspezifischen Proteinen auf der Membran zu verringern, wurde die Membran mit 1M KCl gewaschen. Es wurden nur Proteine detektieren, die nach dem Waschschnitt mit 1M KCl, stark mit IFR1 wechselwirken. Nach mehrmaligen Wiederholungen des Far Western Blots zeigten sich mit a, b und c bezeichneten Proteine, als konstant nachweisbar (Abbildung 3.33). Ein direkter Vergleich der Far Western Blot Signale von der IEF-2D-Elektrophorese mit der AUT-2D-Elektrophorese ist nicht möglich. So wurde von Kaltschmidt und Wittmann 1970 beschrieben, dass die Löslichkeit mancher ribosomaler Proteine stark vom pH-Wert des Puffers abhängig ist. Der Standardlysepuffer der IEF hat einen neutralen pH Wert von ca. 7, während der AUT-Auftragspuffer einen pH Wert von ca. 4,5 hat. So können sich ribosomale Proteine, die meist basisch sind, in den beiden unterschiedlichen Puffern unterschiedlich gut lösen, was zur Folge hat, dass in der IEF und dem AUT System nicht die gleichen Proteine in der gleichen Menge gelöst sind. Dies führt dazu, dass mit beiden Systemen unterschiedliche ribosomale Proteine mit dem rekombinanten IFR1 wechselwirken. Interessanterweise bindet IFR1 nicht generell alle basischen Proteine (Abbildung 3.32), da im Far Western Blot ein Großteil der im SDS-Gel ersichtlichen Proteine keine Signale mit dem rekombinanten IFR1 gibt. In allen Far Western Blots der AUT-2D- und der IEF-2D-Gelelektrophorese konnte eine hohe Variabilität in der Anzahl der Chemilumineszenz Signale festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Für die Reproduzierbarkeit des Far Western Blots scheinen verschiedene Einflüsse, wie die Umgebungstemperatur beim Gellauf, die unterschiedliche Effizienz in der Übertragung von der ersten in die zweite Dimension, die Zusammensetzung und die Eigenschaften des rekombinanten IFR1 und die Beladung des IPG-Steifens bzw. AUT-Gels mit genauen Mengen an Gesamtprotein aus dem Polysomenpellet eine Rolle zu spielen.

Wie in den Polysomenpräparationen (siehe 3.3.4) gezeigt werden konnte, ist IFR1 *in vivo* mit Ribosomen assoziiert. Dies bestätigt die Ergebnisse des Far Western Blots, dass rekombinantes IFR1 an ribosomale Proteine bindet. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass es mit dem rekombinanten IFR1 zu falsch positiven Ergebnissen kommt und falsche Bindungspartner bestimmt werden, denn der Far Western Blot ermöglicht durch seinen Aufbau Proteinkontakte, die *in vivo* nicht möglich wären [Phizicky und Fields, 1995].

Ebenso sind falsch negative Ergebnisse möglich. So kann es sein, dass Proteine, die IFR1 *in vivo* binden, im Far Western nicht detektierbar sind. Dies könnte daran liegen,

dass mögliche Bindungsstellen von Proteinen, an die IFR1 binden kann, durch die denaturierenden Bedingungen in der SDS-PAGE nicht zugänglich sind.

4.7.4 Ribosomale Proteine als Bindungspartner von IFR1

Die massenspektrometrischen Sequenzbestimmung sollte die Bindungspartner, die mit dem rekombinanten IFR1 Protein im Far Western Blot der IEF-2D- und der AUT-2D-Gelelektrophorese wechselwirken, identifizieren.

Die ausgesuchten Proteine 1, 2 und 3 der IEF- und a und b der AUT-Elektrophorese wurden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten (siehe Abbildung 3.34 und Abbildung 3.35) und in der MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert.

Die Ergebnisse der Massenspektrometrie zeigten, dass alle analysierten Proteine der großen 60s oder der kleinen 40s ribosomalen Untereinheit zugeordnet werden können (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3 Übersicht der ausgeschnittenen Proteine und der in der MALDI-TOF identifizierten Proteine, sowie der Übereinstimmung der gefundenen Sequenz mit bereits publizierten Sequenzen.

Proteinbezeichnung	Ribosomales Protein	Spezies
1 (aus IEF)	S3a	<i>Gallus gallus</i>
2 (aus IEF)	L7a	<i>Gallus gallus</i>
3 (aus IEF)	L5	<i>Gallus gallus</i>
a (aus AUT)	L8	<i>Xenopus laevis</i>
b (aus AUT)	L13	<i>Gallus gallus</i>

Da in *Gallus gallus* noch keine Sequenz von L8 publiziert ist, wurde L8 der Spezies *Xenopus laevis* zugeordnet.

Um einen Zusammenhang zwischen den analysierten Proteinen mit IFR1 herzustellen, wurde nach den Funktionen der ribosomalen Proteine gesucht.

In der Literatur sind für L5 mehrere bekannte Funktionen beschrieben. So bindet es an die 5s-rRNA und kann auch die 5s-rRNA aus dem Kern exportieren oder in den Kern importieren [Rudt und Pieler, 1996]. Außerdem ist L5 in der Lage mit verschiedenen Proteinen zu interagieren und deren Lokalisation zu kontrollieren. Nachgewiesen ist die Beteiligung/Beeinflussung von L5 am Kerntransport von Mdm2, einem Inhibitor des p53-Genprodukts [Marechal, 1994]. Das ribosomale Protein S3a bindet *in vivo* das 3'-OH Ende der 18s RNA [Svobada und McConkey, 1978], interagiert mit der mRNA [Stahl und Kobets, 1981], mit Initiationsfaktoren [Nygard, 1987], der Initiator-tRNA [Westermann, 1981] und dem Elongationsfaktor EF2 [Nygard, 1987]. Außerdem wird vermutet, dass S3a auch bei der Apoptose involviert ist [Kho und Zarbl, 1992; Kho, 1996]. Für die anderen nachgewiesenen Proteine sind noch keine Funktionen bekannt.

Beide Proteine können, wie oben beschrieben, mit externen Proteinen wechselwirken, also theoretisch könnte IFR1 mit L5 oder S3a eine Bindung eingehen. Mit Hilfe von chemischen Crosslikern wurde in der Literatur die räumliche Anordnung von ribosomalen Proteinen untersucht. So können L8 und L7a direkt über Crosslinker verbunden werden oder jedes Protein für sich kann indirekt mit dem ebenfalls nachgewiesenen Protein L13 verbunden werden [Marion und Marion, 1987]. Es könnte also sein, dass die drei Proteine L7a, L8 und L13, die untereinander gecrosslinkt werden können, mit einem einzigen IFR1 Molekül in Kontakt stehen.

Die Proteine L5 und S3a sind räumlich wahrscheinlich zu weit von den drei genannten Proteinen entfernt, um eine Bindung mit demselben IFR1 Molekül einzugehen. Da sie in Eukaryoten indirekt miteinander in Kontakt stehen [Uchiumi, 1986], könnte mit Hilfe von einem weiteren IFR1 Molekül die große und die kleine Untereinheit miteinander verbunden werden.

Wie in 3.1.7 nachgewiesen wurde, wird mindestens ein IFR1 Molekül pro Ribosom gebunden. Auf Grund der IFR1 Konzentration könnte es aber auch möglich sein, dass zwei IFR1 Moleküle pro Ribosom assoziiert sind.

Dass IFR1 mit mehreren ribosomalen Proteinen in Kontakt steht, könnte daran liegen, dass es nur so mit dem sehr schwer zugänglichen Protein L13 [Marion und Marion, 1987] eine Bindung eingehen kann. Außerdem müsste für einen Kontakt IFR1 sehr stark an das Ribosom gebunden sein, so dass es zu einer Wechselwirkung kommen könnte. Für eine starke Assoziation von IFR1 mit den Ribosomen spricht, dass es nur mit einer vorangegangenen 0,9 M KCl Behandlung vollständig in die lösliche Fraktion des Saccharosegradienten überführen werden kann (Abbildung 3.22). IFR1 könnte also mit weiteren, im Far Western Blot detektierten aber noch nicht analysierten Proteinen wechselwirken.

Alle in der MALDI-TOF Massenspektrometrie bestimmten Bindungspartner von IFR1 sind ribosomale Proteine. Dass IFR1 mit den ribosomalen Fraktionen unterschiedlich behandelter Polysomenpellets und deren Saccharosegradienten assoziiert ist, unterstützt diese Vermutung. Mit Ausnahme von S3a, sind allerdings alle identifizierten Bindungspartner aus der 60s Untereinheit. Eine eindeutige Kolokalisation von IFR1 mit einer Untereinheit konnte trotz der Dissoziation der 80s in ihre 40s- und 60s-Untereinheit im EDTA Saccharosegradienten (Abbildung 3.23) nicht nachgewiesen werden. Auch bei der Behandlung mit 0,5 M KCl ist eine Kolokalisation von IFR1 mit einer Untereinheit nicht deutlich nachzuweisen (Abbildung 3.21). Die Zuordnung einer Untereinheit als Bindungspartner von IFR1 kann daher nicht eindeutig erfolgen. IFR1 kann sowohl mit der kleinen als auch mit der großen Untereinheit eine Bindung

eingehen, im besten Fall beide Untereinheiten miteinander verbinden, um so die Translation in der terminalen Differenzierung zu beeinflussen.

4.8 Ein mögliches Modell der Funktion von IFR1 und TOB

Die Regulation des mRNA-Umsatzes in Zellen spielt eine essentielle Rolle während der Genexpression. Nach heutiger Vorstellung wird die mRNA deadenyliert, um den Abbau von mRNA auszulösen. Dadurch kommt es zur Bildung von un-translatierbaren mRNA Protein-Komplexen (mRNPs), die sich in P-bodies ansammeln können [Mauxion, 2008].

P-bodies sind u.a. in NIH3T3 Zellen spezifisch nachweisbare, zytoplasmatische Herde, die Proteine besitzen, die bekannte Funktionen im mRNA Metabolismus übernehmen [Eulalio, 2007; Kedersha and Anderson, 2007; Parker and Sheth, 2007]. So wurden die Deadenylasen Pan2, Pan3 und Caf1 als neueste P-body Komponenten identifiziert und es konnte gezeigt werden, dass Pan3 dabei hilft, Pan2, Ccr4 und Caf1 zu rekrutieren. Für TOB konnte bereits gezeigt werden, dass es sowohl an PABP, als auch an Ccr4/Caf1 bindet und in NIH3T3 Zellen mit P-bodies kolokalisiert ist [Ezzeddine, 2007]. BTG2, ein Mitglied der APRO-Familie, aktiviert ebenfalls die mRNA Deadenylierung und damit den Abbau der mRNA. Es kommt so zu einer Regulation der Genexpression und es kann ein schnelles „resetting“ der Proteinproduktion während der Entwicklung oder nach speziellem Stress [Mauxion, 2008] stattfinden. Von Vietor et al. konnte 2002 gezeigt werden, dass IFR1 als Ko-Repressor mit dem HDAC1 des SIN3-Komplexes wechselwirkt und so die Expression einer Reihe von Genen hemmt.

Um sich eine Vorstellung der Funktion von TOB und IFR1 zu machen, wurde in der folgenden Abbildung 4.1 ein Model modifiziert, das versucht eine Verbindung zwischen der Deadenylierug und dem mRNA Abbau herzustellen [modifiziert nach Zheng, 2008]. Pan2/Pan3 und Ccr4/Caf1 Komplexe bilden einen Super-Komplex auf mRNAs im Zytoplasma. Der 3'-polyA-Schwanz/PABP Komplex stimuliert Pan2/Pan3, die das Poly-A Ende kürzen, inhibiert aber gleichzeitig die Aktivität von Ccr1/Caf1 [Tucker, 2002], so dass die erste Phase der Deadenylierung beginnen kann; währenddessen oder danach kommt es zum mRNP Umbau. Dieser Umbau könnte die Dissoziation von PABPs und einigen Translations-Initiationsfaktoren beinhalten und die Assoziation von Translations-Repressoren [Coller und Parker, 2005 ; Eulalio et al., 2007 ; Parker und Sheth, 2007] die einen Wechsel von mRNPs in einen untranslatierbaren Status fördern. Die neu gebildeten mRNPs können sich entweder mit schon existierenden P-bodies verbinden oder neue P-bodies bilden. In diesem kann dann die zweite Phase

der Deadenylierung durch Ccr4/Caf1 und/oder das decapping der mRNA fortgeführt werden. Es kann dann zum Abbau der mRNA oder aber zur Lagerung der mRNPs kommen.

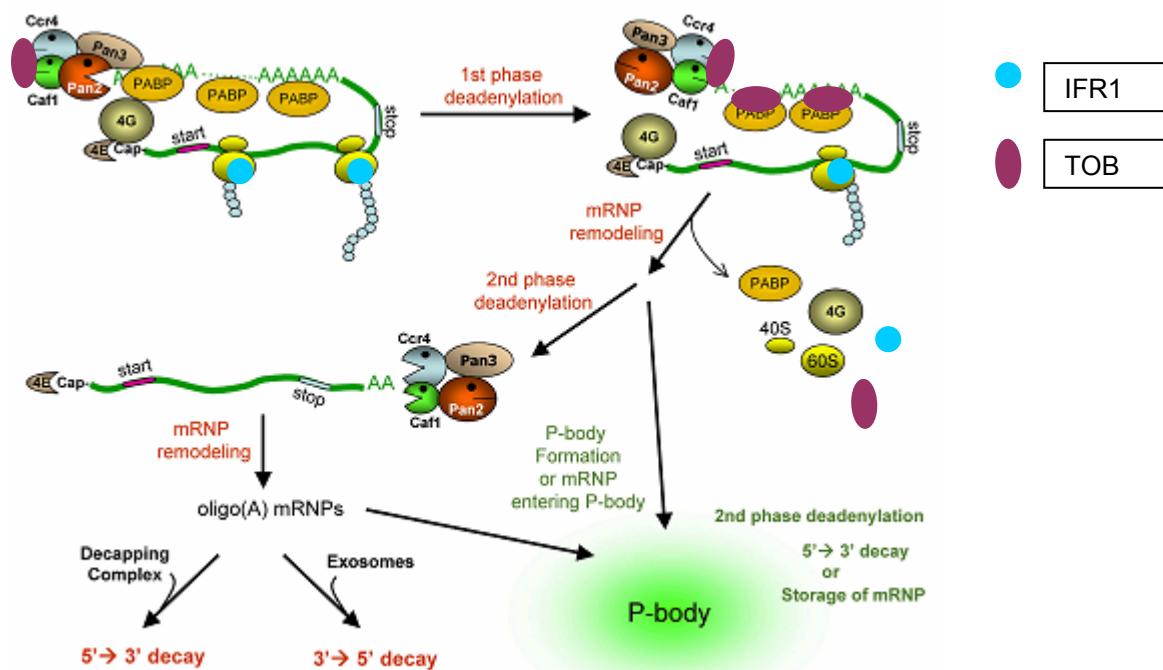


Abbildung 4.1: Modell der Deadenylierung, des mRNA Abbaus und der P-Body Bildung herzustellen [modifiziert nach Zheng, 2008].

Durch die Bindung von TOB an den Ccr4/Caf1 Komplex in der ersten Phase der Deadenylierung könnte dieser inhibiert werden, die Bindung an PABP könnte für den PAN3/Pan3 Komplex das Zeichen für den Beginn der Deadenylierung sein. Anschließend wird die Bindung von TOB an PABP und Ccr4/Caf1 gelöst und damit ist TOB frei löslich im Zytoplasma zu finden, könnte auch von Proteasomen abgebaut werden. So könnte TOB mit an der Deadenylierung und damit am Abbau der mRNA beteiligt sein. Dies würde auch erklären, warum TOB transient exprimiert wird, sehr kurzlebig ist und es nur durch die Stimulation mit NoA zu einem Anstieg der TOB Proteinexpression kommt. Es könnte also zu einer schnellen „Neueinstellung“ der Proteinproduktion während der Hypoxie kommen. So könnten für die späte Differenzierung noch zu translatierende Proteine synthetisiert werden. Dazu gehören nach Hämoglobin das zweithäufigste Protein CAII für die Versorgung des Erythrozyten mit genug Enzym und zum anderen IFR1, welches dann an Ribosomen bindet, als Signal für eine Deacetylase um den Abbau der Ribosomen in der sich differenzierenden Zelle voranzutreiben. Im Modell könnte es durch die Bindung von IFR1 an die Ribosomen entweder direkt durch IFR1 oder aber indirekt, indem IFR1 als Signal dient, zum Abbau der Ribosomen kommen. Andere Proteine, wie die Globine, die bereits in großer Menge im definitiven Erythrozyten vorliegen, könnten mit der Hilfe

Diskussion

von TOB und der Deadenylierung still gelegt werden. So kann der fast ausdifferenzierte definitive Erythrozyt des Embryos einerseits Ressourcen sparen und es wird keine „Energie“ für unnötige Protein Translationen mehr verschwendet. Die Hypoxie dient also als Signal für die definitiven Erythrozyten, die Differenzierung voranzutreiben, um ihre letztendliche Aufgabe, den Transport von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid zu übernehmen.

4.9 Ausblick

In dieser Arbeit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass sowohl IFR1, als auch TOB in der terminalen Differenzierung eine entscheidende Bedeutung zu kommt. Sie greifen aktiv in die Transkription und Translation der letzten verbleibenden Gene und Proteine ein, um dem sich differenzierenden Hühnererythrozyten die Möglichkeit zu geben, die letzten, noch wichtigen Differenzierungsschritte im Fall einer Hypoxie in Ganz zu setzen.

Da viele Schritte der Säuger- und Nichtsäuger-Erythropoiese ähnlich ablaufen, wird das embryonale Erythrozytensystem zu einem Modellsystem für Fragestellungen, die sich mit der Rolle von cAMP bei terminalen Reifungsvorgängen befassen.

Von besonderem Interesse wären daher Untersuchungen an mitotischen und postmitotischen Zellen, die mit rekombinantem IFR1 inkubiert werden. Kondensiert der Kern schneller, oder kommt es zu einem schnelleren Ribosomen- oder Globin-mRNA Abbau? Die Beobachtungen würden zu einem besseren Verständnis der Funktion von IFR1 beitragen.

Des Weiteren könnte die Überexpression von IFR1 in der HD3 oder der K562 Zelllinie zu einer Hemmung der Zellteilung führen. Es müsste untersucht werden, ob IFR1 wirklich akkumuliert und welche Wirkungen auf die Zellen beobachtet werden können. U.a. was mit den Globinen, CAII und P5N passiert. Die Polysomenpräparation sollten mit definitiven Erythrozyten des 19. Entwicklungstages wiederholt werden, um zu sehen in welchen Fraktionen IFR1, TOB, FOS und PABP vorkommt.

Um die Kolokalisation von TOB mit den P-bodies [Ezzeddine, 2007] aufzuklären, müsste erst geklärt werden, ob P-bodies auch in definitiven Erythrozyten des Hühnerembryos nachweisbar sind. Im Folgenden könnten die P-bodies in den Fraktionen eines Saccharosegradienten mit Hilfe eines Antikörpers gegen den P-body-Marker nachgewiesen werden.

Ein sehr gewagter Ansatzpunkt für den Einsatz von IFR1 und TOB wäre der Einsatz in der Krebstherapie. Mit IFR1 und TOB könnte ein Silencing des Kerns zu erreicht werden oder der vorzeitigen Abbau der Ribosomen. Da TOB die mRNA Deadenylierung unterstützt könnte so die Translation von Krebsgenen gehemmt werden. So könnte das antiproliferative TOB zusammen mit IFR1 eingesetzt werden, um in Krebszellen einen vorzeitigen Proliferationsstopp zu erreichen.

5 Zusammenfassung

Erythrozyten des Hühnerembryos sind seit langem ein Modell zur Untersuchung von erythroiden Proteinen, die während der terminalen Differenzierung auftreten. Unter anderen werden – bedingt durch die entwicklungsbedingte Hypoxie – durch Noradrenalin transient IFR1 und TOB exprimiert, die schon in anderen Zellsystemen als gemeinsam exprimierte Regulatoren der Transkription oder Translation bekannt sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Regulation, Lokalisation und zeitliche Expression von IFR1 und TOB in primitiven und definitiven Erythrozyten des Hühnerembryos untersucht, um die Funktion von IFR1 und TOB während der Differenzierung embryonaler Erythrozyten im Hühnerembryo aufzuklären.

Durch *in vitro* Studien an Noradrenalin induzierten Erythrozyten konnte durch RT-PCR Analysen gezeigt werden, dass *ifr1* und *tob* gemeinsam mit der *fos* mRNA sowohl in primitiven als auch in definitiven Erythrozyten des Hühnerembryos durch cAMP in einer zeitlich festgelegten Reihenfolge induziert werden. Die effiziente Translation von IFR1 und TOB ist allerdings beschränkt auf die postmitotischen, definitiven Erythrozyten aus Hühnerembryos von Tag 8 bis Tag 19, während FOS-Protein in allen Stadien der Erythrozyten gebildet wird. In definitiven Erythrozyten sind IFR1 und TOB transient exprimierte Proteine mit unterschiedlicher Stabilität und Verweildauer. Dabei geht die kurzzeitige Expression von TOB einer stabileren Expression von IFR1 voran, welches erst nach 24 Stunden langsam abgebaut wird.

Bei der Untersuchung der zellulären Verteilung der beiden Proteine in definitiven Erythrozyten stellte sich heraus, dass TOB ein zytosolisches Protein ist, während IFR1 nach 8-stündiger Verweildauer im Zytosol in den Kern wandert.

Die Analyse des Zytosols ergab, dass IFR1 im Zytosol quantitativ mit den Ribosomen assoziiert und TOB ein lösliches Protein ist.

Für IFR1 konnte die Assoziation von IFR1 mit anderen Proteinen und/oder mRNA gezeigt werden. Genaue Analyse der Interaktionspartner mittels 2D-Elektrophoresetechniken, Far Western Blot und MALDI-TOF identifizierten die ribosomale Proteine beider Untereinheiten (L7a, L8, L13, S3a) als Bindungspartner von IFR1. Die Funktion von IFR1 könnte darin bestehen, dass es im besten Fall beide Untereinheiten miteinander verbinden kann, um so die Translationseffizienz spät exprimierter Gene (Carboanhydrase, Globine) zu beeinflussen.

Das Modell der embryonalen Hühnererythrozyten könnte in Zusammenhang mit der Funktion der cAMP-induzierten Proteine IFR1 und TOB für weitere Untersuchungen zur Translationsregulation während der terminalen Erythrozytendifferenzierung dienen.

6 Literaturverzeichnis

- Albrecht, M. and T. Lengauer (2004). "Survey on the PABC recognition motif PAM2." *Biochem Biophys Res Commun* 316(1): 129-38.
- Angel, P. and M. Karin (1991). "The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation." *Biochim Biophys Acta* 1072(2-3): 129-57.
- Arenander, A. T., R. W. Lim, et al. (1989). "TIS gene expression in cultured rat astrocytes: induction by mitogens and stellation agents." *J Neurosci Res* 23(3): 247-56.
- Arenander, A. T., R. W. Lim, et al. (1989). "TIS gene expression in cultured rat astrocytes: multiple pathways of induction by mitogens." *J Neurosci Res* 23(3): 257-65.
- Avrameas, S. and T. Ternynck, (1969). "The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents." *Immunochemistry* 6 (1): 53-66
- Baumann, R. and S. Dragon (2005). "Erythropoiesis and red cell function in vertebrate embryos." *Eur J Clin Invest* 35 Suppl 3: 2-12.
- Baumann, R., E. A. Haller, et al. (1986). "Hypoxic incubation leads to concerted changes of carbonic anhydrase activity and 2,3 DPG concentration of chick embryo red cells." *Dev Biol* 116(2): 548-51.
- Beaupain, D. (1985). "Line-restricted hemoglobin synthesis in chick embryonic erythrocytes." *Cell Differ* 16(2): 101-7.
- Beug, H., G. Doederlein, et al. (1982). "Erythroblast cell lines transformed by a temperature-sensitive mutant of avian erythroblastosis virus: a model system to study erythroid differentiation in vitro." *J Cell Physiol Suppl* 1: 195-207.
- Birchard, G. F. and C. P. Black (1986). "Effect of carbonic anhydrase inhibition on blood acid-base balance in the chicken embryo." *Poult Sci* 65(9): 1811-3.
- Bjellqvist, B., K. Ek, et al. (1982). "Isoelektric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications." *J Biochem Biophys Methods* 6 (4): 317-39.
- Bradbury, A., R. Possenti, et al. (1991). "Molecular cloning of PC3, a putatively secreted protein whose mRNA is induced by nerve growth factor and depolarization." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(8): 3353-7.
- Brown, J. L. and V. M. Ingram (1974). "Structural studies on chick embryonic hemoglobins." *J Biol Chem* 249(12): 3960-72.
- Brunn, G. A. and V. M. Ingram (1973). "Erythropoiesis in the developing chick embryo." *Dev Biol* 30(2): 455-9.
- Brunn, G. A. and V. M. Ingram (1973). "The erythroid cells and haemoglobins of the chick embryo." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 266(877): 225-305.

- Buanne, P., B. Incerti, et al. (1998). "Cloning of the human interferon-related developmental regulator (IFRD1) gene coding for the PC4 protein, a member of a novel family of developmentally regulated genes." *Genomics* 51(2): 233-42.
- Caplen, N. J., S. Parrish, et al. (2001). "Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17): 9742-7.
- Celis J. E. (1998). "Cell Biology; A Laboratory Handbook." 2. Auflage Academic Press San Diego
- Coller, J. and R. Parker (2005). "General translational repression by activators of mRNA decapping." *Cell* 122(6): 875-86.
- De Cesare, D., G. M. Fimia, et al. (1999). "Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation." *Trends Biochem Sci* 24(7): 281-5.
- Dexter, T. M., C. M. Heyworth, et al. (1990). "The role of growth factors in self-renewal and differentiation of haemopoietic stem cells." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 327(1239): 85-98.
- Dieterlen-Lievre, F., L. Pardanaud, et al. (1988). "Early haemopoietic stem cells in the avian embryo." *J Cell Sci Suppl* 10: 29-44.
- Dragon, S. and R. Baumann (2001). "Erythroid carbonic anhydrase and hsp70 expression in chick embryonic development: role of cAMP and hypoxia." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280(3): R870-8.
- Dragon, S. and R. Baumann (2003). "Hypoxia, hormones, and red blood cell function in chick embryos." *News Physiol Sci* 18: 77-82.
- Dragon, S., N. Offenhauser, et al. (2002). "cAMP and in vivo hypoxia induce tob, ifr1, and fos expression in erythroid cells of the chick embryo." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282(4): R1219-26.
- Dragon, S., S. Glombitza, et al. (1996). "Norepinephrine-mediated hypoxic stimulation of embryonic red cell carbonic anhydrase and 2,3-DPG synthesis." *Am J Physiol* 271(4 Pt 2): R982-9.
- Driesssen, H. P., W. W. de Jong, et al. (1985). "The mechanism of N-terminal acetylation of proteins." *CRC Crit Rev Biochem* 18(4): 281-325.
- Elbashir, S.M., J. Harborth, et al. (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." *Nature* 411:494–498.
- Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, et al. (2007). "P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(1): 9-22.
- Ezzeddine, N., T. C. Chang, et al. (2007). "Human TOB, an antiproliferative transcription factor, is a poly(A)-binding protein-dependent positive regulator of cytoplasmic mRNA deadenylation." *Mol Cell Biol* 27(22): 7791-801.
- Fletcher, B. S., R. W. Lim, et al. (1991). "Structure and expression of TIS21, a primary response gene induced by growth factors and tumor promoters." *J Biol Chem* 266(22): 14511-8.
- Fucci, L., C. Cirotto, et al. (1983). "Synthesis of globin chains in the erythropoietic sites of the early chick embryo." *J Embryol Exp Morphol* 77: 153-65.

- Gahmberg, C. G. and L. C. Andersson (1981). "K562--a human leukemia cell line with erythroid features." *Semin Hematol* 18(1): 72-7.
- Gautschi, M., S. Just, et al. (2003). "The yeast N(alpha)-acetyltransferase NatA is quantitatively anchored to the ribosome and interacts with nascent polypeptides." *Mol Cell Biol* 23(20): 7403-14.
- Gilbert, S.F. (2003). „Developmental Biology.“ Sinauer Assosiates Inc. 7. Auflage
- Guardavaccaro, D., M. T. Ciotti, et al. (1995). "Inhibition of differentiation in myoblasts deprived of the interferon-related protein PC4." *Cell Growth Differ* 6(2): 159-69.
- Haynes S. A. (1999). "RNA-Protein Interaction Protocols." Methods in Molecular Biology, Human Press Inc. 118
- Heath, J. K., A. G. Smith, et al. (1990). "Growth and differentiation factors of pluripotential stem cells." *J Cell Sci Suppl* 13: 75-85.
- Hebbes, T. R., A. W. Thorne, et al. (1988). "A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin." *Embo J* 7(5): 1395-402.
- Hendzel, M. J., G. P. Delcuve, et al. (1991). "Histone deacetylase is a component of the internal nuclear matrix." *J Biol Chem* 266(32): 21936-42.
- Howell, J. M., T. L. Winstone, et al. (2006). "An evaluation of in vitro protein-protein interaction techniques: assessing contaminating background proteins." *Proteomics* 6(7): 2050-69.
- Iacobetti, P., G. Barsacchi, et al. (1996). "Expression of the PC4 gene in the developing rat nervous system." *Brain Res* 707(2): 293-7.
- Ihle, J. N. and D. Askew (1989). "Origins and properties of hematopoietic growth factor-dependent cell lines." *Int J Cell Cloning* 7(2): 68-91.
- Ikematsu, N., Y. Yoshida, et al. (1999). "Tob2, a novel anti-proliferative Tob/BTG1 family member, associates with a component of the CCR4 transcriptional regulatory complex capable of binding cyclin-dependent kinases." *Oncogene* 18(52): 7432-41.
- Inamdar, N. M., Y. I. Ahn, et al. (1996). "The heme-responsive element of the mouse heme oxygenase-1 gene is an extended AP-1 binding site that resembles the recognition sequences for MAF and NF-E2 transcription factors." *Biochem Biophys Res Commun* 221(3): 570-6.
- Ji, X., J. Kong, et al. (2003). "In vivo association of the stability control protein alphaCP with actively translating mRNAs." *Mol Cell Biol* 23(3): 899-907.
- Jia, S. and A. Meng (2007). "Tob genes in development and homeostasis." *Dev Dyn* 236(4): 913-21.
- Kaltschmidt, E. and H. G. Wittmann (1970). "Ribosomal proteins. XII. Number of proteins in small and large ribosomal subunits of Escherichia coli as determined by two-dimensional gel electrophoresis." *Proc Natl Acad Sci USA* 67(3): 1267-82
- Kedersha, N. and P. Anderson (2007). "Mammalian stress granules and processing bodies." *Methods Enzymol* 431: 61-81.

- Kho; C. J., Y. Wang, et al. (1996). "Effect of decreased fte-1 gene expression on protein synthesis, cell growth and transformation." *Cell Growth Differ* 7(9):1157-66.
- Kho, C.J. and Zarbl (1992). "Fte-1, a v-fos transformation effector gene, encodes the mammalian homologue of a yeast gene involved in protein import into mitochondria." *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (6): 220-4
- Klein, D. J., P. B. Moore, et al. (2004). "The contribution of metal ions to the structural stability of the large ribosomal subunit." *Rna* 10(9): 1366-79.
- Koller, M., S. Dragon, et al. (1994). "Control of red cell function of late chick embryos: role of extracellular ATP/AMP and egg size." *Am J Physiol* 267(2 Pt 2): R542-8.
- Koury, M. J., S. T. Sawyer, et al. (1984). "Splenic erythroblasts in anemia-inducing Friend disease: a source of cells for studies of erythropoietin-mediated differentiation." *J Cell Physiol* 121(3): 526-32.
- Kreider, B. L. and G. Rovera (1992). "The immediate early gene response to a differentiative stimulus is disrupted by the v-abl and v-ras oncogenes." *Oncogene* 7(1): 135-40.
- Kujubu, D. A., R. W. Lim, et al. (1987). "Induction of transiently expressed genes in PC-12 pheochromocytoma cells." *Oncogene* 1(3): 257-62.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259):680-5.
- Lasky, L. and A. J. Tobin (1979). "Transcriptional regulation in avian erythroid cells." *Biochemistry* 18(8): 1594-8.
- Lemez, L. (1977). "[Quantitative study of 5 types of definitive erythrocytes (E II) in chick embryos]." *Verh Anat Ges*(71 Pt 1): 235-8.
- Li W., H. Y. Chen and J. R. Davie (1996). "Properties of chicken erythrocyte histone deacetylase associated with the nuclear matrix." *Biochem J* 314 (Pt 2): 631-637.
- Lim, R. W., B. C. Varnum, et al. (1987). "Cloning of tetradecanoyl phorbol ester-induced 'primary response' sequences and their expression in density-arrested Swiss 3T3 cells and a TPA non-proliferative variant." *Oncogene* 1(3): 263-70.
- Loening, U. E. (1968). "Molecular weights of ribosomal RNA in relation to evolution." *J Mol Biol* 38(3): 355-65.
- Marechal, V., B. Elenbaas, et al. (1994). "The ribosomal L5 protein associates with mdm-2 and mdm-2-p53 complexes." *Mol Cell Biol* 14(11): 7414-20
- Marion, M.J. and C. Marion (1987). "Localisation of ribosomal proteins of the surface of mammalian 60s ribosomal subunits by means of immobilized enzymes. Correlation with chemical cross-linking data." *Biochem Biophys Res Commun* 149(3): 1077-83
- Marks, P. A., M. Sheffery, et al. (1987). "Induction of transformed cells to terminal differentiation." *Ann N Y Acad Sci* 511: 246-55.

- Mass, M., E. Simo, et al. (2003). "Erythroid pyrimidine 5'-nucleotidase: cloning, developmental expression, and regulation by cAMP and in vivo hypoxia." *Blood* 102(12): 4198-205.
- Matsuda, S., J. Kawamura-Tsuzuku, et al. (1996). "Tob, a novel protein that interacts with p185erbB2, is associated with anti-proliferative activity." *Oncogene* 12(4): 705-13.
- Matsuda, S., J. Rouault, et al. (2001). "In search of a function for the TIS21/PC3/BTG1/TOB family." *FEBS Lett* 497(2-3): 67-72.
- Mauxion, F., C. Faux, et al. (2008). "The BTG2 protein is a general activator of mRNA deadenylation." *Embo J* 27(7): 1039-48.
- Meisenheimer, K. M. and T. H. Koch (1997). "Photocross-linking of nucleic acids to associated proteins." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 32(2): 101-40.
- Meyer, S., C. Temme, et al. (2004). "Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 39(4): 197-216.
- Munroe, D. and A. Jacobson (1990). "Tales of poly(A): a review." *Gene* 91(2): 151-8.
- Mutskov, V. and G. Felsenfeld (2004). "Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9." *Embo J* 23(1): 138-49.
- Nygard, O., L. Nilsson, et al. (1987). "Characterisation of the ribosomal binding site for eukaryotic elongation factor 2 by chemical cross-linking." *Biochem Biophys Acta* 910(3): 245-53
- O'Farrell, P. H. (1975). "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins." *J Biol Chem* 250(10): 4007-21.
- Okochi, K., T. Suzuki, et al. (2005). "Interaction of anti-proliferative protein Tob with poly(A)-binding protein and inducible poly(A)-binding protein: implication of Tob in translational control." *Genes Cells* 10(2): 151-63.
- Orkin, S. H. (1978). "Differentiation of murine erythroleukemic (Friend) cells: an in vitro model of erythropoiesis." *In Vitro* 14(1): 146-54.
- Paglia, D. E. and W. N. Valentine (1980). "Hereditary and acquired defects in the pyrimidine nucleotidase of human erythrocytes." *Curr Top Hematol* 3: 75-109.
- Parker, R. and H. Song (2004). "The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover." *Nat Struct Mol Biol* 11(2): 121-7.
- Parker, R. and U. Sheth (2007). "P bodies and the control of mRNA translation and degradation." *Mol Cell* 25(5): 635-46.
- Pasquali, C., F. Vilbois, et al. (2000). "Mapping and identification of protein-protein interactions by two-dimensional far-Western immunoblotting." *Electrophoresis* 21(16): 3357-68.
- Phizicky, E.M. and S. Fields (1995). "Protein-protein interactions: methods for detection and analysis." *Microbiol Rev* 59(1): 94-132
- Romanoff, A.L. (1960). „The avian embryo. The Mac-partial pressure of gas exchange of the chicken embryo.” Millan co, New Yoerk.

- Romanoff A. L., (1967). "Biochemistry of the avian embryo. A quantitative analysis of prenatal development." Interscience Publishers, John Wiley & Sons, New York.
- Roth, A., R. Gill, et al. (2003). "Temporal and spatial gene expression patterns after experimental stroke in a rat model and characterization of PC4, a potential regulator of transcription." *Mol Cell Neurosci* 22(3): 353-64.
- Rubin, D. C., E. A. Swietlicki, et al. (1998). "Regulation of PC4/TIS7 expression in adapting remnant intestine after resection." *Am J Physiol* 275(3 Pt 1): G506-13.
- Rudt, F. and T. Pieler (1996). "Cytoplasmatic retention and nuclear import of 5S ribosomal RNA containing RNPs." *Embo J* 15(6):1383-91
- Ryazanov, A. G. and A. S. Spirin (1990). "Phosphorylation of elongation factor 2: a key mechanism regulating gene expression in vertebrates." *New Biol* 2(10): 843-50.
- Sasajima, H., K. Nakagawa, et al. (2002). "Antiproliferative proteins of the BTG/Tob family are degraded by the ubiquitin-proteasome system." *Eur J Biochem* 269(14): 3596-604.
- Saunders, J. W., Jr. (1948). "The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm." *J Exp Zool* 108(3): 363-403.
- Schewe, T. and S. M. Rapoport (1981). "Role of a cell-specific lipoxygenase in the maturation of reticulocytes." *Acta Biol Med Ger* 40(4-5): 591-6.
- Shaywitz, A. J. and M. E. Greenberg (1999). "CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals." *Annu Rev Biochem* 68: 821-61.
- Sherton, C. C. and I. G. Wool (1972). "Determination of the number of proteins in liver ribosomes and ribosomal subunits by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis." *J Biol Chem* 247(14): 4460-7.
- Shimizu, R. and M. Yamamoto (2007). "[Function and gene expression regulation of GATA-1 and GATA-2 transcription]." *Seikagaku* 79(10): 941-52.
- Shivdasani, R. A. and S. H. Orkin (1996). "The transcriptional control of hematopoiesis." *Blood* 87(10): 4025-39.
- Shivdasani, R. A., Y. Fujiwara, et al. (1997). "A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development." *Embo J* 16(13): 3965-73.
- Stahl, J. and N.D. Kobets (1981). "Affinity labelling of proteins at the mRNA binding site of rat liver ribosomes by an analogue of octauridylate containing an alkylating group attached to the 3'-end." *FEBS Lett* 132 (2): 269-72
- Steiner, S. K., R. Baumann, et al. (2007). "Regulation and localization of TOB and IFR1 in differentiating red cells." *Biochem Biophys Res Commun* 359(4): 1010-6.
- Stern, C. D. (2005). "The chick; a great model system becomes even greater." *Dev Cell* 8(1): 9-17.
- Su, A. I., M. P. Cooke, et al. (2002). "Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7): 4465-70.

- Svobada, A. J. and E. H. McConkey (1978). "Crosslinking of proteins to ribosomal RNA in HeLa cell polysomes by sodium periodate." *Biochem Biophys Res Commun* 81 (4):1145-52
- Temme, C., S. Zaessinger, et al. (2004). "A complex containing the CCR4 and CAF1 proteins is involved in mRNA deadenylation in Drosophila." *Embo J* 23(14): 2862-71.
- Thiele, B. J., H. Andree, et al. (1982). "Lipoxygenase mRNA in rabbit reticulocytes. Its isolation, characterization and translational repression." *Eur J Biochem* 129(1): 133-41.
- Thiele, B. J., J. Belkner, et al. (1979). "Synthesis of non-globin proteins in rabbit-erythroid cells. Synthesis of a lipoxygenase in reticulocytes." *Eur J Biochem* 96(3): 563-9.
- Tickle, C. (2004). "The contribution of chicken embryology to the understanding of vertebrate limb development." *Mech Dev* 121(9): 1019-29.
- Tirone, F. and E. M. Shooter (1989). "Early gene regulation by nerve growth factor in PC12 cells: induction of an interferon-related gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(6): 2088-92.
- Tucker, M., M. A. Valencia-Sanchez, et al. (2001). "The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*." *Cell* 104(3): 377-86.
- Uchiumi, T., M. Kikuchi, et al. (1986). "Cross-linking study on protein neighbourhoods at the subunit interface of rat liver ribosomes with 2-iminothiolane." *J Biol Chem* 260(9): 5675-82
- Vadivelu, S. K., R. Kurzbauer, et al. (2004). "Muscle regeneration and myogenic differentiation defects in mice lacking TIS7." *Mol Cell Biol* 24(8): 3514-25.
- Valentine, W. N., K. Fink, et al. (1974). "Hereditary hemolytic anemia with human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency." *J Clin Invest* 54(4): 866-79.
- Varnum, B. C., R. W. Lim, et al. (1989). "Characterization of TIS7, a gene induced in Swiss 3T3 cells by the tumor promoter tetradecanoyl phorbol acetate." *Oncogene* 4(10): 1263-5.
- Varnum, B. C., S. T. Reddy, et al. (1994). "Synthesis, degradation, and subcellular localization of proteins encoded by the primary response genes TIS7/PC4 and TIS21/PC3." *J Cell Physiol* 158(1): 205-13.
- Viator, I. and L. A. Huber (2007). "Role of TIS7 family of transcriptional regulators in differentiation and regeneration." *Differentiation* 75(9): 891-7.
- Viator, I., S. K. Vadivelu, et al. (2002). "TIS7 interacts with the mammalian SIN3 histone deacetylase complex in epithelial cells." *Embo J* 21(17): 4621-31.
- Westermann, P., O. Nygard, et al. (1981). "Cross-linking of Met-tRNAf to eIF-2 beta and to the ribosomal proteins S3a and S6 within the eukaryotic initiation complex, eIF-2. GMPPCP.Met-tRNAf.small ribosomal subunit." *Nucleic Acids Res* 9(10): 2387-96
- Wong, G. K., B. Liu, et al. (2004). "A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms." *Nature* 432(7018): 717-22.

- Yeh, Y. C., R. R. Traut, et al. (1986). "Protein topography of the 40 S ribosomal subunit from *Saccharomyces cerevisiae* as shown by chemical cross-linking." *J Biol Chem* 261(30): 14148-53.
- Yoshida, M., A. Matsuyama, et al. (2003). "From discovery to the coming generation of histone deacetylase inhibitors." *Curr Med Chem* 10(22): 2351-8.
- Yoshida, Y., A. von Bubnoff, et al. (2003). "Tob proteins enhance inhibitory Smad-receptor interactions to repress BMP signaling." *Mech Dev* 120(5): 629-37.
- Yoshida, Y., S. Tanaka, et al. (2000). "Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts." *Cell* 103(7): 1085-97.
- Yoshida, Y., T. Nakamura, et al. (2003). "Mice lacking a transcriptional corepressor Tob are predisposed to cancer." *Genes Dev* 17(10): 1201-6.
- Zheng, D., N. Ezzeddine, et al. (2008). "Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells." *J Cell Biol* 182(1): 89-101.
- Zwilling, E. (1956). "Genetic mechanism in limb development." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 21: 349-54.

6.1 Eigene Veröffentlichung

- Steiner, S. K.**, R. Baumann und S. Dragon. (2007). "Regulation and localization of TOB and IFR1 in differentiating red cells." *Biochem Biophys Res Commun* 359(4): 1010-6.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

2,3BPG	2,3-Bisphosphoglycerat
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
CAII	Carboanhydrase II
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
c-fos	cellular Finkel-osteogenic sarcoma onkogen
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
h	Stunde(n)
H ₂ O _{bidest.}	destilliertes Wasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
I.E.	Internationale Einheit
IFR1	Interferon-related protein = TIS7 = IFRD1 = PC4
Min	Minute(n)
mRNA	messenger RNA
NoA	Noradrenalin
P5N	Pyrimidin 5'-Nucleotidase
PABP	Poly A binding protein
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Polyethylen
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PU	Puromycin
RME	receptor-mediated endocytosis (rezeptorvermittelte Endozytose)
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	region of interest

RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
siRNA	small interfering RNA
TOB	transducer of erbB2 = TIS21 = PC3
U	enzymatische Einheit (Unit)
UE	Untereinheit
ÜN	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute

7.2 Aminosäuresequenzen von TOB

TOB_CHICKEN	1	MQLEIQLVALNFIISYLYNKLPRRRVNIFGEELERLLKKYEGHWYPEKPYKGSGFRCIHI	60
TOB_MOUSE	1	MQLEIQLVALNFIISYLYNKLPRRRVNIFGEELERLLKKYEGHWYPEKPYKGSGFRCIHV	60
TOB_HUMAN	1	MQLEIQLVALNFIISYLYNKLPRRRVNIFGEELERLLKKYEGHWYPEKPYKGSGFRCIHI	60
TOB_CHICKEN	61	GEKVDVPVIEQASKESGLDIDDVGRGNLPQDLNSVWIDPFEVSYQIGEKGPVKVLVDD-NEN	119
TOB_MOUSE	61	GEKVDVPVIEQASKESGLDIDDVGRGNLPQDLNSVWIDPFEVSYQIGEKGPVKVLVDDSET	120
TOB_HUMAN	61	GEKVDVPVIEQASKESGLDIDDVGRGNLPQDLNSVWVDPFEVSYQIGEKGPVKVLVDDNNEN	120
		*	
TOB_CHICKEN	121	GC ELDKEIKNSFNPEAQVFMP SDPASSVSSSPSPPFGHSAAVSPTFMPRSTQPLTFTTA..	179
TOB_MOUSE	121	GC ELDKEIKNSFNPEAQVFMP SDPASSVSSSPSPPFGHSAAVSPTFMPRSTQPLTFTTA	180
TOB_HUMAN	121	GC ELDKEIKNSFNPEAQVFMP SDPASSVSSSPSPPFGHSAAVSPTFMPRSTQPLTFTTA	180
TOB_CHICKEN	180	TFAATKFGSTKMKNSGRSNKVARTSPTNLGL--NVNDLLKQKAISSSMHSLYGLGLG---	234
TOB_MOUSE	181	TFAATKFGSTKMKNSGRSSKVARTSPINLGLTVNVNDLLKQKAISSSVHSLYGLGLGSQQ	240
TOB_HUMAN	181	TFAATKFGSTKMKNSGRSNKVARTSPINLGL--NVNDLLKQKAISSSMHSLYGLGLG---	235
		*	
TOB_CHICKEN	235	-----NQQQQQQQQQKT SALSPNAKEFIFTNMQGQG	264
TOB_MOUSE	241	QPQPQPQQQQQQQQPSSSQPPPLPQQQQQQPQQQQQQQQT SALSPNAKEFIFTNMQGQG	300
TOB_HUMAN	236	-----SQQQPQQQQQPAQPPPPPPPPQQQQQQKT SALSPNAKEFIFTNMQGQG	283
TOB_CHICKEN	265	-STGSIFPGDSPNLNSPLQYSNAFDMFAYGGLNEKSFDGLNFSLNNMQYSNQQFQPVM	323
TOB_MOUSE	301	SSTNGMFPGDSPNLNSPLQYSNAFDVFAAYGGLNEKSFDGLNFSLNNMQYSNQQFQPVM	360
TOB_HUMAN	284	SSTNGMFPGDSPNLNSPLQYSNAFDVFAAYGGLNEKSFDGLNFSLNNMQYSNQQFQPVM	343
TOB_CHICKEN	324	AN 325	
TOB_MOUSE	361	AN 362	
TOB_HUMAN	344	AN 345	

Vergleich der TOB Aminosäuresequenz von Huhn, Maus und Mensch [www.expasy.org]. * PABP-Interaktions Motiv: 12-15 Aminosäuren, die PABP in sehr geringen Mengen binden können [Albrecht und Lengauer, 2004].

7.3 Aminosäuresequenz von IFR1

IFR1_CHICKEN	1	MPKSKKRGSNHQRG-----AGGQPRSVQPFSDEDASIETMSHCSGFSDP	44
IFR1_MOUSE	1	MPKNNKRNAPHRGG--GGGGGSGAATSAATTAGGPHRTVQPFSDHASIETMSHCSGYSDP	58
IFR1_RAT	1	MPKNNKRNAPHRGG--GGGGGSGAATSAATTAGGPHRTVQPFSDHASIETMSHCSGYSDP	58
IFR2_HUMAN	1	---RKGGQRGGGG-----ARSSAQADSGSSDEAASEARSTASECPSL	50
IFR1_HUMAN	1	MPKNNKRNTPHRGSSAGGGGSGAAATAATAGGQHNRVQPFSDHASIETMSHCSGYSDP	60
IFR1_CHICKEN	45	ASFTED---GPEV-DEEATQEDLEYKLKGFIIDLTLDSAKTRQALESLKAFSSKILY	99
IFR1_MOUSE	59	SSFAED---GPEVLDEEGTQEDLEYKLKGFIIDLTLDSAKTRQALEGVKNALSSKVLY	114
IFR1_RAT	59	SSFAED---GPEVLDEEGTQEDLEYKLKGFIIDLTLDSAKTRQALEGVKNALSSKVLY	114
IFR2_HUMAN	51	LSTTAEDSLGGDVV-DEQQQEDLEEKKEYVDCLTDKSAKTRQGALESRLALASRLLP	109
IFR1_HUMAN	61	SSFAED---GPEVLDEEGTQEDLEYKRKGFIIDLTLDSAKTRQALEGIKNALASKMLY	116
IFR1_CHICKEN	100	EFIGERRMTLTDISIERCIKKGKSEELCAAAGLACLLCVQMGSIESEEIFKTLGPVLKKI	159
IFR1_MOUSE	115	EFVLERRMRLTDISIERCLKKGKSDQEAAAASVLCIQLGPGLFEESEEILKTLGPILKKI	174
IFR1_RAT	115	EFVLERRMRLTDISIERCLKKGKSDQEAAAASVLCIQLGPGLFEESEEILKTLGPILKKI	174
IFR2_HUMAN	110	DFLLERRLTLADALEKCLKKGKGEQALAAAALVGLLCVQLGPGLPKGEELFHSQLQPLLVSV	169
IFR1_HUMAN	117	EFIGERRMTLTDISIERCLKKGKSDQEAAAASVLCIQLGPGLFEESEEILKTLGPILKKI	176
IFR1_CHICKEN	160	VCDGTAVSQARQACATCLGICCFIVTDDITELYSTMCELESVFTKAYP-RDRDTNGVSST	218
IFR1_MOUSE	175	ICDGAASIQARQTCATCFGVCCFIATDDITELYSTLECFENIFTKSYL-KEKDNTVCST	233
IFR1_RAT	175	ICDGTASIQARQTCATCFGVCCFIATDDITELYSTLECFLEGIFTKSYL-KEKDNTVCST	233
IFR2_HUMAN	170	LSDSTASPAARLHCASALGLGCYVAAADIQDLVSCLALESVFSRFYGLGGSSTSPVVA	229
IFR1_HUMAN	177	ICDGASMQARQTCATCFGVCCFIATDDITELYSTLECLENIFTKSYL-KEDTTVICST	235
IFR1_CHICKEN	219	PSTVLHISALLAWTLLLTICPMNEVKKKIETHLHKLPMLSCDDVNMRIAAGETLALLFE	278
IFR1_MOUSE	234	PNTVLHISLLAWTLLLTICPINEVKKKLELHFHKLPMLSCDDVNMRIAAGESLALLFE	293
IFR1_RAT	234	PNTVLHISLLAWTLLLTICPISEVKKKLELHFHKLPMLSCDDVNMRIAAGESLALLFE	293
IFR2_HUMAN	230	SLHGLLSAALQAWLLLTCIPSTQISHILDRLQLPRLPQLSSSESVNLIRIAAGETIALLFE	289
IFR1_HUMAN	236	PNTVLHISLLAWTLLLTICPINEVKKKLEMHFHKLPMLSCDDVNMRIAAGESLALLFE	295
IFR1_CHICKEN	279	LARETDADFFYEDMELLTEKLRALATDGNKHRAKVDKRQRSVFRDVLRAVEERDFPTET	338
IFR1_MOUSE	294	LARGMESDFYYEDMDSLTQMLRALATDGNKHRAKVDKRQRSVFRDVLRAVEERDFPTET	353
IFR1_RAT	294	LARGMESDFYYEDMDSLTQMLRALATDGNKHRAKVDKRQRSVFRDVLRAVEERDFPTET	353
IFR2_HUMAN	290	LARDLEEEFVYEDMEALCSVRLTLATDSNKYRAKADRRQRSTFRAVLHSVEGGECEEII	349
IFR1_HUMAN	296	LARGIESDFYYEDMESLTQMLRALATDGNKHRAKVDKRQRSVFRDVLRAVEERDFPTET	355
IFR1_CHICKEN	339	VKFGPERMYIDCWVKKQTYDTFKEILGSGMQYHLQSNDFLRNVFELGPPVMLDAATLKT	398
IFR1_MOUSE	354	VKFGPERMYIDSWKKHTYDTFKEVLGSGMQYHLQTNEFLRNVFELGPPVMLDAATLKT	413
IFR1_RAT	354	VKFGPERMYIDSWKKHTYDTFKEALGSGMQYHLQTNEFLRNVFELGPPVMLDAATLKT	413
IFR2_HUMAN	350	VRFGFEVLYMDSWARHRIYAFAKKEVLGSGMHHLQNNEELLRDIFGLGPVLLDATAALKAC	409
IFR1_HUMAN	356	IKFGPERMYIDCWVKKHTYDTFKEVLGSGMQYHLQSNEFLRNVFELGPPVMLDAATLKT	415
IFR1_CHICKEN	399	KISRFERHLYNSAAFKARTKARSKCRDKRADVGeff	434
IFR1_MOUSE	414	KISRFERHLYNSAAFKARTKARSKCRDKRADVGef-	448
IFR1_RAT	414	KIPRFERHLYNSAAFKARTKARSKCRDKRADVGeff	449
IFR2_HUMAN	410	KVPRFEKHYNSAAFKARTKARSVRDKRADI----	441
IFR1_HUMAN	416	KISRFERHLYNSAAFKARTKARSKCRDKRADVGeff	451

Vergleich der IFR1 Aminosäuresequenz von Huhn, Maus, Ratte und Mensch [www.expasy.org]. [Albrecht und Lengauer, 2004].

7.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Relative Größe und morphologisches Aussehen von erythroiden Zellen der Wirbeltiere in unterschiedlichen Differenzierungsstadien.	4
Abbildung 1.2 Übersicht der Differenzierung von Hühnererythrozyten.	7
Abbildung 1.3 Modell der Signaltransduktion im Erythrozyten.....	9
Abbildung 1.4 2,3-Bisphosphoglycerat (2,3BPG)- Konzentration und Carboanhydrase II (CAII)- Aktivität, sowie die Plasmakonzentration von Noradrenalin während der Hühnerembryo Entwicklung [aus Dragon und Baumann 2003]	10
Abbildung 2.1 Schema der Low-speed Zentrifugation und der anschließenden Ultrazentrifugation zur Gewinnung des Polysomenpellets.....	51
Abbildung 3.1 NoA induzierte Expression in primitiven Erythrozyten.	54
Abbildung 3.2 NoA induzierte Expression in primitiven, frühen und späten definitiven Erythrozyten.....	55
Abbildung 3.3 Proteinexpression von IFR1 und TOB in Tag 11 Erythrozyten.	56
Abbildung 3.4 Western Blot Analyse der Induktion von IFR1 und TOB von Tag 11 Erythrozyten.....	57
Abbildung 3.5 Western Blot Analyse (n=3) der Induktion von IFR1 und TOB von Tag 11 Erythrozyten +/- 10µM MG132.	58
Abbildung 3.6 Graphische Darstellung der Western Blot Signale von IFR1 und TOB aus der Abbildung 3.5 A.....	58
Abbildung 3.7 NoA-induzierte Proteinexpression von Tag 17 bis 19 und Tag 11 Erythrozyten.	59
Abbildung 3.8 PCR Analyse (n=4) der cAMP-abhängige Genexpression von <i>ifr1</i> , <i>fos</i> , <i>tob</i> und β - <i>globin</i> in definitiven Erythrozyten von Tag 11.	61
Abbildung 3.9 Auswertung der Ethidium Bromid (EtBr) Fluoreszenz der aufgetragenen PCR Produkte von <i>fos</i> , <i>ifr1</i> , <i>tob</i> und β - <i>globin</i> aus Abbildung 3.8 in Abhängigkeit von der Zeit in Stunden [h].	61
Abbildung 3.10 Western Blot Analyse (n=3) von Ganzzell-Lysaten mit unterschiedlich langen Induktionszeiten	62
Abbildung 3.11 Stabilitätsnachweis von IFR1 in Tag 11 und Tag 17 Erythrozyten.....	63
Abbildung 3.12 Stimulierung von Tag 11 Erythrozyten für 2, 6 und 16 Stunden mit 10µM NoA.	64
Abbildung 3.13 Stimulierung von Tag 17 Erythrozyten für 4, 8 und 16 Stunden mit 10µM NoA.	64
Abbildung 3.14 Quantifizierung des IFR1 Gehalts in Ganzzell-Lysat nach 20-stündiger Inkubation mit 10µM NoA.....	65
Abbildung 3.15 RNAi mit <i>ifr1</i> siRNA in Tag 14 Erythrozyten.....	67
Abbildung 3.16 Tag 14 Erythrozyten wurden transfiziert mit 6µl Liposomen und 1µg <i>ifr1</i> siRNA oder mit 12 µl Liposomen und 1 µg oder 2 µg <i>ifr1</i> siRNA.	68
Abbildung 3.17 Tag 11, 14 und 19 Erythrozyten wurden mit 10µM NoA für 4 Stunden induziert.....	70
Abbildung 3.18 Polysomen Fraktionierung von definitiven Erythrozyten.	71

Abbildung 3.19 Western Blot (n=3) zur Überprüfung der IFR1 Akkumulation in Tag 14 Erythrozyten nach 4h NoA Inkubation.....	72
Abbildung 3.20 Kontroll-Gradient: Unbehandelte Polysomenpräparation von Tag 14 Erythrozyten nach 4 h NoA (10 µM) Inkubation.....	74
Abbildung 3.21 0,5 M KCl Gradient: Mit 0,5 M KCl behandelte Polysomenpräparation von Tag 14 Erythrozyten nach 4 h NoA (10 µM) Inkubation.	75
Abbildung 3.22 0,9 M KCl Gradient: Mit 0,9 M KCl behandelte Polysomenpräparation von Tag 14 Erythrozyten nach 4 h NoA (10 µM) Inkubation.	76
Abbildung 3.23 EDTA Gradient: Mit 20 mM EDTA behandelte Polysomenpräparation von Tag 14 Erythrozyten nach 4 h NoA (10 µM) Inkubation.	77
Abbildung 3.24 RNaseA Gradient: Mit 10 pg/µl RNaseA behandelte Polysomenpräparation von Tag 14 Erythrozyten nach 4 h NoA (10 µM) Inkubation....	78
Abbildung 3.25: RNaseA-EDTA Gradient.....	79
Abbildung 3.26 Western Blot (n=3) eines Chemischen Crosslink mit 1 bis 5 mM DMP und IFR1 Antikörper. HBS und unbehandeltes Polysomenpellet (Pe, 10 µg) als Kontrolle.....	80
Abbildung 3.27 (A) Western Blot (n=3) und (B) SDS-Gel von einem chemischen Crosslink mit DSS in verschiedenen Konzentrationen (1 bis 5 mM) und DMSO als Kontrolle.	82
Abbildung 3.28 Graphik der Western Blot Signale aus Abbildung 3.27	83
Abbildung 3.29 Western Blot mit IFR1 Antikörper. Quantitative Crosslinks.....	84
Abbildung 3.30 A Western Blot (n=3) mit IFR1 Antikörper eines qualitativen Crosslink. B Coomassie gefärbtes SDS-Gel.....	85
Abbildung 3.31 Western Blots (n=2) im direkten Vergleich eines UV-Crosslink mit IFR1 und PABP Antikörper. Auftrag je Spur 37,5 µg polysomale Proteine.....	86
Abbildung 3.32 (A) IEF-Gel und der dazugehörige IFR1 Far Western (B).....	88
Abbildung 3.33 IFR1 Far Western Blot eine AUT-2D- Gels.	88
Abbildung 3.34 Coomassie gefärbtes IEF-2D-Gel zur MALDI-TOF Analyse.....	89
Abbildung 3.35 Coomassie gefärbtes AUT-2D-Gel zur MALDI-TOF Analyse.	90
Abbildung 4.1: Modell der Deadenylierung, des mRNA Abbaus und der P-Body Bildung herzustellen [modifiziert nach Zheng, 2008].	109

7.5 Tabellen

Tabelle 1.1: Proliferationsfähigkeit und Färbungsverhalten von Säugerblutzellen in verschiedenen Reifungsstadien.....	3
Tabelle 1.2: Übersicht der Modelle der erythroiden Zelldifferenzierung. Proerythroblasten (Pro-EB).....	6
Tabelle 1.3 Regulation/Induktion und Funktion von IFR1 in verschiedenen Zelllinien..	13
Tabelle 2.1 Oligonukleotide und Primer für die RT-PCR	27
Tabelle 2.2 siRNA Sequenz.....	27
Tabelle 2.3 Übersicht der verwendeten Antikörper, Verdünnung und Hersteller.....	28
Tabelle 2.4 Zusammensetzung der SDS Gele.....	33
Tabelle 2.5 Zusammensetzung der AUT-Gele.....	41
Tabelle 3.1 Mittelwerte, Standardabweichung und <i>silencing</i> der einzelnen transfizierten Proben und der Kontrollen	67
Tabelle 3.2 Ergebnisse der MALDI-TOF Untersuchung der in der IEF-2D Elektrophorese ausgesuchten Proteine.....	90
Tabelle 3.3 Ergebnisse der MALDI-TOF Untersuchung der in der AUT-2D Elektrophorese ausgesuchten Proteine.....	91
Tabelle 4.1: cAMP-induzierte Transkription und Translation von Erythrozyten des Hühnerembryos verschiedener Entwicklungstage. Alle Erythrozyten wurden für 4h mit 1 μ M NoA induziert.....	93
Tabelle 4.2 Übersicht der mRNA und Proteinmaxima der Kurzzeit- und Langzeitinkubation von IFR1, TOB und FOS in NoA-induzierten Tag 11 Erythrozyten	94
Tabelle 4.3 Übersicht der ausgeschnittenen Proteine und der in der MALDI-TOF identifizierten Proteine, sowie der Übereinstimmung der gefundenen Sequenz mit bereits publizierten Sequenzen.....	106

7.6 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Rosemarie Baumann für die Möglichkeit diese Doktorarbeit in Ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen, für die Bereitstellung der Mittel zur Durchführung und für Ihre Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Stefanie Dragon, für die Aufnahme in Ihren kleinen Arbeitskreis und die interessante Themenstellung. Ihre Diskussionsbereitschaft und Kreativität halfen mir bei allen wissenschaftlichen Fragen immer weiter. Danke auch für die interessanten Gespräche (nicht nur wissenschaftlich) und die Betreuung unter „erschwerten Bedingungen“ während des Zusammenschreibens.

Ebenfall bedanken möchte ich mich bei PD Dr. Rainer Schreiber für sein Interesse an meinem Thema und den damit verbundenen Diskussionen.

Bei Herrn Richard Huss möchte ich mich für seine herausragende Mitarbeit im Rahmen seiner Diplomarbeit bedanken.

Bei Regine Volkmann und Friedl Webinger möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mich so nett und unkompliziert in ihrer Mitte aufgenommen haben. Danke auch für die Durchführung von Experimenten und für ihre große und stete Hilfsbereitschaft, die mir das Arbeiten im Labor sehr erleichterten.

Danke auch an Robert Götz für seine Unterstützung im Laboralltag und an Hildegard Westermeier für Ihre Hilfe bei allen Organisationsfragen.

Ebenso möchte ich mich bei allen Laborkolleginnen und –kollegen der Nachbararbeitsgruppen für ihre Hilfsbereitschaft während der gesamten Promotionszeit bedanken.

Vielen Dank auch an den Lehrstuhl von Prof. Dr. Herbert Tschochner für die Bereitstellung der Ultrazentrifuge und an Prof. Dr. Rainer Deutzmann und Eduart Hochmuth für die Durchführung der MALDI-MS.

Zudem möchte ich allen anderen nicht genannten Personen danken, die in der einen oder anderen Form zum Gelingen und zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen haben.

Lieben Dank auch an meine Eltern, die mich immer gefördert haben und die mir immer Mutmachend zur Seite standen.

Zuletzt möchte ich mich noch herzlich bei meiner Freundin Melanie, bei meinen Freundinnen Sandra und Uli, und bei all meine „alten“ und „neuen“ Freunden, für Ihre Geduld, Ihr offenes Ohr und Ihre liebevolle Unterstützung bedanken. Ohne Sie wäre dieser Weg steiniger gewesen.

7.7 Erklärung

Hiemit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtliche oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommenen Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntliche gemacht.

Die im Methodenteil und in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeldlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeldliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Diese Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....
Simone Steiner