

Charakterisierung des Gens *Fbxl22* und seiner Funktion während der Muskelentwicklung der Maus

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biochem. Marc-Jens Kleppa,

geboren am 28.04.1982, in Hannover

2011



Referent: Prof. Dr. Andreas Kispert

Korreferent: Prof. Dr. Dietmar Manstein

Tag der Promotion: 29.09.2011

Danksagung

Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Andreas Kispert, für die sehr gute fachliche Betreuung und die wertvollen Ratschläge, sowie für die Vergabe dieser interessanten Fragestellung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, bedanken.

Herrn Prof. Dr. Manstein, für die Übernahme des Zweitgutachtens

Herr Prof. Dr. Andreas Schmiedl gilt mein Dank für die Analyse der TEM Proben.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Kispert für gute Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich Herrn Timo Lüdtko und Frau Dr. Susann Placzko für das nette Arbeitsklima danken. Danken möchte ich auch Herrn Carsten Rudat für die kritische Durchsicht der Doktorarbeit

Allen Mitarbeitern des Instituts für Molekularbiologie danke ich für die hilfreichen Diskussionen.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Tonio Oumeraci für seine ständige Hilfe und sein stets offenes Ohr.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Elke und Peter Kleppa, sowie meinem Bruder Oliver Kleppa, auf deren Unterstützung ich immer zählen konnte und ohne die mein Studium und meine Doktorarbeit niemals möglich gewesen wären.

Alea iacta est

Zusammenfassung

Während der Embryogenese ist es von entscheidender Bedeutung, dass Signalwege zeitlich und räumlich an und aus geschaltet werden. Bis heute ist viel darüber bekannt, wie die Mechanismen funktionieren, welche die Signalwege induzieren, aber nur wenig, wie sie wieder abgeschaltet werden. Ein wichtiger Mechanismus stellt dabei die Proteindegradation dar. Eine Proteingruppe, die sogenannten F-Box-Proteine, spielen in dem ubiquitin vermittelten Abbauweg eine Schlüsselrolle. Als Teil des SCF (Skp1-Cullin1-F-Box-Protein) Komplexes besteht ihre Aufgabe in der Erkennung und Markierung von Substraten, die für den Abbau vorgesehen sind. In der vorliegenden Arbeit wurde die *Fbxl*-Genfamilie auf ihre Expression hin untersucht. Dabei stellt sich heraus, dass das Gen *Fbxl22* als einziges Gen dieser Familie eine spezifische Expression aufweisen konnte. Aus diesem Grunde sollte dieses Gen näher untersucht werden. Es wurde eine zeitliche Expressionsanalyse von *Fbxl22* in ganzen Embryonen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass *Fbxl22* am Tag E8,5 im Einflusstrakt, dem primitiven Ventrikel und dem Ausflusstrakt exprimiert war. Am Tag E9,5 konnte *Fbxl22* in anterioren Somiten, genauer gesagt im Myotom, detektiert werden. Für die bessere zelluläre Auflösung wurden transverse Herzschnitte angefertigt und die Expression von *Fbxl22* detektiert. In E9,5 alten Herzen konnte eine starke Expression im Kompaktmyokard des Ventrikels, im Myokard der sich entwickelnden Trabekel und im Myokard des Atriums gefunden werden. Das aus endothelialen Zellen bestehende Kissengewebe und die aus endothelialen Zellen bestehende innere Verkleidung der Trabekel, zeigten dagegen keine Expression. Auch weiteren Verlauf der Kardiogenese beschränkt sich die Expression von *Fbxl22* weiter auf das Myokard. Ab dem Tag E14,5 wird die Expression von *Fbxl22* in den Trabekeln schwächer. Eine Analyse der Expression mittels semiquantitativer RT-PCR von *Fbxl22* in adulten Organen zeigte, dass Blase, Herz und Darm eine hohe Expression aufwiesen, während Lunge, Leber, Niere und Gehirn *Fbxl22* nur schwach exprimierten. Des Weiteren wurde die endogene Expression von *Fbxl22* während der myogenen Differenzierung untersucht. Durch Serumentzug induzierte myogene Differenzierung wurde in der Myoblasten Zelllinie C2C12 untersucht, wobei sich herausstellte, dass *Fbxl22* in der frühen Phase der myogenen Differenzierung transient hochreguliert wurde. Lokalisierungsstudien in der Myoblastenzelllinie C2C12 und der Kardiomyozytenzelllinie HL-1 zeigte eine zytoplasmatische Expression. Nach der Deletion der F-Box-Domäne zeigte sich ein

ubiquitäres Expressionsmuster. Interessanterweise, lokalisierte Fbxl22 in der epithelialen Zelllinie HEK293 und der Fibroblastenzelllinie NIH3T3 ubiquitär, wobei die Expression im Nukleus stärker war. Die Deletionsmutante hingegen zeigte die gleiche ubiquitäre Lokalisierung wie in den C2C12 oder HL-1. Wird das Proteasom durch die Zugabe des Proteasomblockers MG132 inhibiert, nimmt das Proteinniveau von Fbxl22 zeitabhängig zu. Dies spricht für einen proteasomalen Abbau von Fbxl22. Eine *in silico* Analyse durchgeführte Motivsuche (ELM), identifizierte die D-Box als mögliches Motiv. Die D-Box wird durch die beiden co-Aktivatoren Cdc-20 und Cdh-1 erkannt und führen zu dem proteasomalen Abbau des Proteins. In Fbxl22 konnte eine solche D-Box im N-terminalen Bereich, innerhalb der F-Box, gefunden werden. Um zu testen, ob Fbxl22 durch einen der co-Aktivatoren erkannt wird, wurden Kotransfektionsexperimente mit Fbxl22 und Cdc-20 oder Cdh-1 durchgeführt. Dabei wurde die Konzentration der co-Aktivatoren immer weiter erhöht, während die Konzentration an Fbxl22 konstant gehalten wurde. Es wurde jedoch kein Abfall im Proteinniveau von Fbxl22 detektiert. Im Gegenteil, eine Erhöhung der Cdc-20 oder der Cdh-1 Konzentration führte zu einer Erhöhung des Fbxl22 Proteinniveaus. Um die Rolle von *Fbxl22* besser verstehen zu können, wurde zwei Misexpressionsmäuse generiert. Eine durch *Tbx3::cre* induzierte Misexpression des vollständigen Proteins führte zu einer Wachstumsverzögerung der gesamten Transgenmaus bis zum Tag P180. Herz, Leber und Milz zeigten deutliche Gewichtsverluste gegenüber den Wildtypen. Die morphologische und histologische Untersuchung von Herz, Blase und Zunge zeigten jedoch keine Unterschiede zu den Wildtypen. Die *Tbx3::cre* induzierte Misexpression des dominant-negativen Fbxl22 zeigte keine Wachstumsunterschiede zu den Wildtypmäusen. Die morphologische Untersuchung von Herz, Blase und Zunge erbrachte keine Unterschiede. Die histologische Analyse mittels der Tri-Chrom Färbemethode zeigte jedoch ungewöhnliches Färbemuster im Blasenurothel. Die Analyse der Proliferation und der Apoptose zeigte deutliche Unterschiede verglichen mit dem Wildtyp. Während das Wildtyp Urothel eine starke Proliferation aufwies, konnte keine proliferierende Zelle in der Transgenmaus gefunden werden. Umgekehrt waren viele Zellen im Blasenurothel in Apoptose gegangen, während keine einzige Zelle im Wildtypen detektiert wurde, die in Apoptose ging.

Schlagworte: F-Box Protein, Maus, Muskelentwicklung

Summary

During embryonic development it is crucial that signaling pathways are to be switched on and off in temporal and spatial precise manner. Much is known about the mechanism how many of these pathways are induced but only little how they are turned off. Protein degradation plays an important part in this mechanism. F-Box proteins are involved in the ubiquitin mediated degradation pathway. As part of the SCF (Skp1-Cullin1-F-Box protein) complex their function is to recognize and mark substrates for degradation. We started to characterize a novel muscle specific family member, *Fbxl22*, which is expressed in the myocardium of the sinus venosus, ventricle and atrium. At E9,5 an additional expression domain establishes in the anterior somites, the myotomal part. Thus, interestingly *Fbxl22* is not limited to cardiomyocytes, instead expression could also be detected in smooth muscle cells and skeletal muscle. In postnatal organs *Fbxl22* is highly expressed in bladder, heart and gut, whereas it shows only minor expression in lung, kidney and liver. Furthermore we analyzed the endogenous mRNA level during myogenic differentiation in C2C12 cells by semi-quantitative RT-PCR. The mRNA levels are up regulated transiently during the initial phase of differentiation arguing that *Fbxl22* is only necessary in the initial steps of myogenic differentiation. In transient over expression experiments in C2C12 and HL-1 cells, *Fbxl22* is localized in the cytoplasm, whereas an F-box deletion-mutant shows ubiquitous localization. This implies that the F-Box domain is important to retain the protein in the cytoplasm. Surprisingly, localization studies of the full length protein in HEK293 and NIH3T3 shows a almost ubiquitous expression, with a little higher expression in the nucleus. Deletion of the F-Box domain leads to an exclusion out of the nucleus. Inhibition of the proteasome stabilizes *Fbxl22* in a time dependent manner arguing that *Fbxl22* is controlled by the proteasomal degradation pathway. An *in silico* analysis of *Fbxl22* (ELM) reveals a possible Destruction-Box (D-Box), which is recognized by the co-activators cdc-20 and cdh-1. Despite the fact, that there were hints which suggest a binding of cdc-20 to *Fbxl22*, we could not confirm this hypothesis. To further analyze the relevance of *Fbxl22* *in vivo* we generated two misexpressing mice. An early induction of *Fbxl22* by *Tbx3::cre* lead to an growth retardation in hemizygous mice. The histological analysis by HE staining, Tri-Chrome staining and Sirius-red staining revealed no significant differences. The specific induced misexpression of the dominant-negative variant of *Fbxl22* by *Tbx3::cre* lead to no obvious morphological

differences between wildtyp and mutant organs. The histological analysis by Tri-Chrome staining showed a different staining pattern in the bladder urothelium of P180 old hemizygous mice. The analysis of the proliferation rate and apoptosis revealed a drastic difference in the proliferation rate and apoptosis in the bladder urothelium of mutant mice. While wildtyp urothelium showed no apoptosis the level of apoptosis in the mutant is highly increased. Vise versa, while there was no proliferation detectable in the mutant urothelium we measured a high proliferation rate in the wildtyp situation.

Key words: F-Box protein, mice, muscle development

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------------|
| Inhaltsverzeichnis | IX |
| Abkürzungen und Symbole | XII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Das Ubiquitin-Proteasom System | 1 |
| 1.2 Das E1-E2-E3 Ubiquitin Ligase System | 4 |
| 1.2.1 Die E3 Ligase Familie | 6 |
| 1.2.2 Regulierung der Aktivität des SCF E3 Komplexes | 8 |
| 1.2.2.1 F-Box-Proteine und ihre Funktion in der Entwicklungsbiologie | 9 |
| 1.3 Zielsetzung dieser Arbeit | 11 |
| 2 Material und Methoden | 2 |
| 2.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial | 2 |
| 2.2 Chemikalien | 3 |
| 2.3 Substanzen und Kits für die Molekularbiologie | 3 |
| 2.4 Antikörper | 4 |
| 2.5 DNA Methoden | 6 |
| 2.5.1 Lösungen | 6 |
| 2.5.2 Standardmethoden | 7 |
| 2.5.3 Aufreinigung von BAC DNS | 7 |
| 2.5.4 DNA-Vektoren, rekombinante Plasmide und Wirtssysteme | 8 |
| 2.5.4.1 Klonierungsvektoren | 8 |
| 2.5.4.2 Wirtssysteme | 8 |
| 2.5.4.2.1 Bakterienstämme | 8 |
| 2.5.4.3 Plasmidkonstrukte zur Erstellung von Hybridisierungssonden | 8 |
| 2.5.5 Synthetische Oligonukleotide | 9 |
| 2.5.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) | 14 |
| 2.5.7 Southern-Blotting | 14 |
| 2.6 RNA Methoden | 14 |
| 2.6.1 Lösungen | 14 |
| 2.6.1.1 RNS Isolierung | 14 |
| 2.6.1.2 cDNA Synthese | 15 |
| 2.6.2 Herstellung der Hybridisierungssonden | 15 |
| 2.7 Versuchstiere | 15 |
| 2.8 Mausmethoden | 15 |
| 2.8.1 Lösungen | 15 |
| 2.8.2 Embryologische Methoden | 16 |
| 2.8.2.1 Verpaarungen | 16 |
| 2.8.2.2 Gewinn der Embryonen | 16 |
| 2.8.2.3 PFA-Fixierung und Dehydrierung von Embryonen und Geweben | 16 |
| 2.8.2.4 Genotypisierung von Embryonen | 17 |
| 2.8.3 Isolierung der Herzen, Zungen und Blasen aus Embryonen und adulten Tieren | 17 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 2.9 | Histologische Methoden | 18 |
| 2.9.1 | Lösungen | 18 |
| 2.9.2 | Paraffinschnitte | 20 |
| 2.9.3 | Allgemeine Handhabung von Schnittpräparaten bei Färbungen | 20 |
| 2.9.4 | Hämatoxin-Eosin-Färbung | 20 |
| 2.9.5 | Sirius-Rot Färbung | 21 |
| 2.9.6 | Masson's Tri-Chrom Färbung | 21 |
| 2.9.7 | Nachweis apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Assay | 21 |
| 2.9.8 | BrdU-Inkorporationsassay auf Paraffinschnitten | 21 |
| 2.9.9 | Elektronenmikroskopische Analyse von Herz, Blase und Zunge adulter Tiere | 22 |
| 2.9.10 | Immunhistochemische und Immunfluoreszenzfärbungen | 22 |
| 2.9.10.1 | Paraffinschnitte | 22 |
| 2.9.11 | RNA <i>in situ</i> Hybridisierung | 23 |
| 2.9.11.1 | Paraffinschnitte | 23 |
| 2.9.11.2 | Gesamt Embryonen | 24 |
| 2.9.12 | Dokumentation | 25 |
| 2.10 | Allgemeine Zellkultur Techniken | 26 |
| 2.10.1 | Lösungen | 26 |
| 2.10.2 | Kultivierung von adhärennten Monolayerkulturen | 27 |
| 2.10.3 | Subkultivierung von adhärennten Monolayerkulturen | 27 |
| 2.10.4 | Kultivierung von Embryonalen Stammzellen | 28 |
| 2.10.5 | Zellzahlbestimmung | 29 |
| 2.10.6 | Kryokonservierung von Zellkulturen | 30 |
| 2.10.7 | Transfektion | 31 |
| 2.10.7.1 | CaPO ₄ Transfektion | 31 |
| 2.10.7.2 | Fugene 6 & HD | 31 |
| 2.10.7.3 | Lipofectamine 2000 | 31 |
| 2.10.7.4 | Elektroporation | 32 |
| 2.11 | Proteinbiochemische Methoden | 32 |
| 2.11.1 | Quantifizierung des Proteingehalts mittels BCA Protein-Assay | 32 |
| 2.11.2 | Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran | 32 |
| 2.11.2.1 | SDS-Gelelektrophorese | 32 |
| 2.11.2.2 | Western Blot | 33 |
| 2.11.3 | TAP Tag Aufreinigung | 34 |
| 2.11.4 | TCA Fällung | 34 |
| 2.11.5 | Probenvorbereitung für MASDAQ Analyse und Durchführung | 35 |
| 2.11.6 | Immunpräzipitation | 35 |
| 2.11.7 | Antikörperherstellung | 36 |
| 2.11.7.1 | Proteinexpression in Bakterien | 36 |
| 2.11.7.2 | Proteinaufreinigung mittels Elektroelution und Konzentrierung | 36 |
| 2.11.7.3 | Affinitätsaufreinigung von Antikörpern | 37 |
| 3 | Experimente und Ergebnisse | 38 |
| 3.1 | Analyse der Expression der <i>Fbxl</i> Familie | 38 |
| 3.1.1 | Expressionsanalyse aller <i>Fbxl</i> Gene | 38 |
| 3.1.2 | Analyse der Expression des Gens <i>Fbxl22</i> | 40 |
| 3.1.3 | Analyse der Expression des Gens <i>Fbxl22</i> während der myogenen Differenzierung | 43 |
| 3.1.4 | Analyse der Expression des Gens <i>Fbxl22</i> in adulten Organen | 45 |
| 3.2 | Funktionelle Analyse von <i>Fbxl22</i> | 47 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 3.2.1 | <i>In vitro</i> Analyse von <i>Fbxl22</i> | 47 |
| 3.2.1.1 | Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen das <i>Fbxl22</i> Protein der Maus | 47 |
| 3.2.1.2 | Analyse der Spezifität des polyklonalen Antikörpers | 48 |
| 3.2.1.3 | Nachweis der intrazellulären Lokalisierung nach Überexpression | 49 |
| 3.2.1.4 | <i>Fbxl22</i> als Teil des SCF-Komplexes | 53 |
| 3.2.1.5 | <i>Fbxl22</i> Proteinabbau durch den APC/C | 54 |
| 3.2.1.6 | Einfluss von <i>Cdc20</i> und <i>Cdh1</i> auf die Stabilität von <i>Fbxl22</i> | 57 |
| 3.2.1.7 | Identifizierung möglicher Substrate | 58 |
| 3.2.2 | <i>In vivo</i> Analyse von <i>Fbxl22</i> | 62 |
| 3.2.2.1 | Klonierung eines „Knock-in“ Konstrukts | 62 |
| 3.2.2.2 | Analyse embryonaler Stammzellen | 64 |
| 3.2.2.3 | Klonierung und Analyse zweier Misexpressionskonstrukte | 66 |
| 3.2.2.4 | Misexpression des vollständigen Proteins in allen Zellen | 68 |
| 3.2.2.4.1 | Morphologische Analyse von <i>Tbx3^{cre/+}; Hprt^{Fbxl22/Fbxl22}</i> Mäusen bei P180 | 68 |
| 3.2.2.4.2 | Morphologische Analyse von <i>Tbx3^{cre/+}; Hprt^{Fbxl22/Fbxl22}</i> Mäusen bei P90 und P30 | 76 |
| 3.2.2.5 | Misexpression der dominant-negativen Form in allen Zellen | 84 |
| 3.2.2.5.1 | Morphologische Analyse von <i>Tbx3^{cre/+}; Hprt^{Fbxl22.d.F-Box/Fbxl22.d.F-Box}</i> Mäusen bei P180 | 84 |
| 3.2.2.5.2 | <i>Tbx3^{cre/+}; Hprt^{Fbxl22.d.F-Box/Fbxl22.d.F-Box}</i> Mäuse zeigen eine deregulierte Zellproliferation und Apoptose im Blasenurothel bei P180 | 89 |
| 3.2.2.5.3 | Morphologische Analyse der Blase von <i>Tbx3^{cre/+}; Hprt^{Fbxl22.d.F-Box/Fbxl22.d.F-Box}</i> Mäusen bei P90 und P30 | 91 |
| 3.2.2.6 | Misexpression des vollständigen Proteins in Myokardzellen | 94 |
| 4 | Diskussion | 97 |
| 4.1 | <i>Fbxl22</i> ist ein gewebespezifisch während der Embryogenese exprimiertes <i>Fbxl</i> -Gen | 97 |
| 4.2 | Funktion des <i>Fbxl22</i> Proteins | 100 |
| 4.2.1 | Überexpression des murinen F-box-Proteins <i>Fbxl22</i> führt zu unterschiedlichen, Zelltyp abhängigen, subzellulären Lokalisierungen | 100 |
| 4.2.2 | Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen das murine <i>Fbxl22</i> | 102 |
| 4.2.3 | <i>Fbxl22</i> ist Teil des SCF-Komplexes | 102 |
| 4.2.4 | <i>Fbxl22</i> könnte durch den APC/C ^{Cdc20} reguliert werden | 103 |
| 4.2.5 | Generierung einer <i>Fbxl22</i> Nullmutante | 105 |
| 4.2.6 | Die Misexpression des vollständigen Proteins in allen Zellen führt zu einem Wachstumsverlust | 107 |
| 4.2.7 | Die Misexpression des dominant-negativen Proteins in allen Zellen zeigte Unterschiede im Urothel der Blase | 111 |
| 5 | Literaturverzeichnis | 114 |
| 6 | Lebenslauf | 122 |
| 7 | Erklärung | 123 |

Abkürzungen und Symbole

| | |
|-------------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| AP | anteriorposterior |
| ATP | Adenosintri-phosphat |
| b | Base(n) |
| bidest. | bidestiliert |
| bp | Basenpaar(e) |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| bspw. | Beispielsweise |
| bzw. | beziehungsweise |
| c | centi- |
| Ca | Kalzium |
| CaCl ₂ | Kalziumchlorid |
| CAT | Chloramphenicol Acetyltransferase |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| Cre | 'cyclization recombinase' |
| d | Tage |
| d.h. | das heißt |
| dATP | Desoxyadenosintri-phosphat |
| dCTP | Desoxycytidintri-phosphat |
| dGTP | Desoxyguanosintri-phosphat |
| dTTP | Desoxythymidintri-phosphat |
| DAB | 3,3'- Diaminobenzidintetrahydrochlorid |
| DAPI | 4'-6-Diamidino-2-Phenylindol |
| DHFR | Dihydrofolatreduktase |
| DIC | Differential-Interferenzkontrast |
| DIG | Digoxigenin |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTPs | Desoxyribonukleosidtri-phosphate |
| dsDNA | Doppelstrang-DNA |
| DTT | Dithiothreitol |

| | |
|---------------------------------|--|
| DV | dorsoventral |
| E | Embryonaltag |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglycolbis-(β -aminoethylether) N, N, N', N'-tetraacetsäure |
| FCS | Fötale Kälberserum |
| g | Gramm |
| g | (Erdbeschleunigung) |
| GFP/Gfp | green-fluorescent-protein |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| h | Stunden |
| HCl | Salzsäure |
| H ₂ O | Wasser |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HPRT | Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase |
| Ig | Immunglobulin |
| k | kilo- |
| KH ₂ PO ₄ | Kaliumdihydrogenphosphat |
| kBp | Kilobasenpaare |
| KCl | Kaliumchlorid |
| l | Liter |
| LB | Luria-Bertani-Medium |
| LiCl | Lithiumchlorid |
| m | milli- |
| M | Mol pro Liter |
| μ | mikro- |
| Mg | Magnesium |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| MgSO ₄ | Magnesiumsulfat |
| MQ-H ₂ O | Millipore-Wasser |
| min | Minuten |
| mRNA | Boten-RNS |
| n | nano- |
| Na | Natrium |
| NaAc | Natriumacetat |

| | |
|----------------------------------|--|
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaH ₂ PO ₄ | Natriumdihydrogenphosphat |
| Na ₂ HPO ₄ | Dinatriumhydrogenphosphat |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| p | pico- |
| P | postnataler Tag |
| <i>p.A.</i> | zur Analyse |
| <i>p.c.</i> | post coitum |
| PBS | Phosphat gepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PFA | Paraformaldehyd |
| Pi | Phosphat |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| RNasin | RNase Inhibitor |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Dodecylsulfatnatriumsalz |
| Sec | Sekunden |
| peSPL | ´peak equivalent sound pressure level´ |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyldiamin |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| tRNA | Transfer RNA |
| TUNEL labeling | Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated UTP nick end labeling |
| U | Units (Einheiten) |
| ü.N. | über Nacht |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| u.U. | unter Umständen |
| UV | ultraviolettes Licht |
| V | Volt |
| Vol | Volumenanteile |
| WT | Wildtyp |
| x - | fach |
| z.B. | zum Beispiel |

°C Grad Celsius

% Prozent

1 Einleitung

1.1 Das Ubiquitin-Proteasom System

Während entwicklungsbiologischer Prozesse ist es von entscheidender Bedeutung, dass Proteine, wie z.B. Transkriptionsfaktoren oder Zellzyklusregulatoren, nur zu bestimmten Zeitpunkten und nur in bestimmten Zelltypen vorhanden sind. Manche Proteine weisen jedoch eine sehr stabile Struktur auf und ihre Halbwertszeiten wären zu lang, um durch natürliche Zersetzungsprozesse schnell genug zu verschwinden. Um deren zeitlich und räumlich distinkte Funktion zu gewährleisten, haben sich in der Zelle verschiedene Mechanismen und Organellen entwickelt, die den Abbau von Proteinen steuern und beschleunigen.

Proteine sind Bausteine und Maschinen des Lebens. Es gibt mehrere Zehntausende von ihnen in jeder Zelle, wo sie ihren wichtigen Aufgaben für den Organismus nachgehen. Wenn sie ihre Aufgaben jedoch erfüllt haben, müssen sie zersetzt werden, um Schaden vorzubeugen. Zudem können nicht mehr intakte- oder fehlgefaltete Proteine zu schwerwiegenden Krankheiten führen, wie z.B. bei der Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) (Novarino et al. 2010). Abnorm gefalteten Prionproteine, vor allem im Gehirn, zwingen den dort normalerweise vorhandenen Prionen mit gesunder Struktur ihre veränderte Struktur auf und lösen dort einen verhängnisvollen biochemischen Prozess aus, der letztlich zu einer Degeneration des Gehirns führt (Hörnlimann 2005).

Eine Möglichkeit wie Proteine zersetzt werden können, ist der Abbau innerhalb kleiner zellulärer Organellen, den sogenannten Lysosomen. In seinem Inneren befinden sich verschiedene hydrolytische Enzyme die ihr Funktionsoptimum im sauren Milieu haben. Lysosome spielen eine Schlüsselrolle in der Zersetzung alter Organellen innerhalb der Zelle, damit sie erneuert werden können. Dieser Prozess wird Autophagie genannt und wird in zwei Schritte unterteilt. Als Erstes wird eine Membran vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) entlassen, welche dann die alte Organelle umschließt. Im zweiten Schritt fusioniert ein Lysosom mit dieser Membran und es entsteht die sogenannte autophagische Vakuole. Das Lysosom entlässt daraufhin seinen gesamten Inhalt in die Vakuole und zersetzt damit die alte Organelle.

Proteine die in der Vakuole/Lysosom zersetzt werden sollen, müssen die Membran passieren um in das Innere zu gelangen. Im Laufe der Evolution haben sich mehrere Mechanismen entwickelt um dies zu bewerkstelligen. Einer dieser Mechanismen, um extrazelluläre- und Plasmamembran Proteine in das Lysosom zu transferieren, ist die Rezeptor vermittelte Endozytose. In diesem System binden Liganden (Proteine) an die Membran gebunden Rezeptoren und treten in die Zelle ein. Dieser Prozess ist spezifisch und wird reguliert (Gruenberg et al. 1989). In Hefe wird das Paarungspheromon α -Faktor durch Rezeptor vermittelte Endozytose in das Lysosom transferiert. Der sezernierte α -Faktor bindet spezifisch an Mata Zellen welche den α -Faktor Rezeptor (Ste2p) exprimieren. Nach der Bindung des α -Faktors wird der Rezeptor hyperphosphoryliert und der Pheromon-Rezeptor-Komplex durch Endozytose ins Innere gebracht (Singer & Riezman 1990).

Eines der wichtigsten Protein Degradierungssysteme ist das Ubiquitin-Proteasom System. Es besteht aus dem 26S Proteasom, welches sich durch die Bindung zweier 19S-RP ("regulatory particle") Untereinheiten und dem 20S-CP ("core particle") Proteasom bildet (Yang et al. 2004). In Säugetieren ist das 20S Proteasom ein zylindrischer Komplex, bestehend aus vier zusammengefügt, ring-ähnlichen Untereinheiten, welche jede einzelne selbst aus weiteren sieben ring-ähnlichen Untereinheiten besteht. Die äußeren Ringe bestehen aus α -Untereinheiten und die beiden inneren Ringe aus β -Untereinheiten, welche auch die katalytische Funktion innehaben (Mayr et al. 1998). Damit Substrate in ihre Bestandteile zerlegt werden können, müssen diese den katalytischen Bereich erreichen. In Eukaryoten besteht dieser katalytische Bereich aus mindestens zwei chymotrypsin ähnlichen, zwei trypsin ähnlichen und zwei caspase ähnlichen aktiven Seiten. Diese Aktivität wird allosterisch reguliert und es wird vermutet, dass die Proteindegradierung geordnet abläuft. Initiierend schneidet die chymotrypsin-ähnliche Seite das Protein in Polypeptide und stimuliert dadurch die caspase-ähnliche Seite. Ihre Aktivierung wiederum beschleunigt das Schneiden in weitere Fragmente, während die cymotrypsin-ähnliche Seite inhibiert wird. Wenn die caspase-ähnliche Seite nicht weiter schneiden kann, wird die cymotrophe Seite wieder reaktiviert (Kisselev et al. 1999). Substrate betreten die aktive Seite durch überqueren einer nahe gelegenen Öffnung im α -Ring. Diese ist jedoch geschlossen, solange der Ligand nicht gebunden

hat (Hill et al. 2002). Durch die Bindung der 19S-RP Untereinheit an das 20S Proteasom wird eine Konformationsänderung des α -Rings induziert, was zur Öffnung des katalytischen Bereichs führt (Groll et al. 2000).

Der 19S-RP ist ein Aktivator, der sowohl die peptidase Aktivität als auch die proteolytische Aktivität des 20S Proteasom stimuliert. Dieser Aktivator ist ein Komplex bestehend aus 18 unterschiedlichen Untereinheiten, welche durch ihre Topologie in zwei Sub-Komplexe unterteilt werden können. Sie werden als Basis und Deckel bezeichnet (Glickman et al. 1998). Die Basis beinhaltet 6 ATPasen und liefert dadurch die Energie für die Zusammensetzung des 26S Proteasoms, die Zerlegung ubiquitinerter Proteine in Peptide, das Entfalten von Proteinen und die gezielte Einführung in die katalytische Kammer des Proteasoms (Voges et al. 1999)(Köhler et al. 2001). Allein die Bindung des 20S Proteasoms an die Basis fördert die ATP-abhängige Hydrolyse von Peptiden. Für die Ubiquitin-abhängige Proteolyse sind im Gegensatz dazu sowohl die Basis als auch der Deckel nötig (Glickman et al. 1998). Der Deckel besteht aus mindestens acht nicht-ATPase Untereinheiten. Die Untereinheit S5a hat eine starke Affinität zu polyubiquitinierten Proteinen (Deveraux et al. 1994).

Die Markierung von Proteinen mit Ubiquitin ist Voraussetzung für deren Abbau. Durch die sukzessive Bindung von Ubiquitinmolekülen an Zielproteine werden diese für die Degradierung über das 26S Proteasom markiert (Skaar & Michele Pagano 2009). Ubiquitin ist ein kleines Protein mit einem Molekulargewicht von 8,56 kDa und ist innerhalb der Gruppe der Eukaryoten konserviert, was eine wichtige Rolle in der Zellbiologie impliziert. Während die Bindung eines einzelnen Ubiquitinmoleküls an ein Zielprotein in Verbindung mit Endozytose, Histonregulierung, DNA Reparatur und Export aus dem Nukleus in Verbindung gebracht wird, können ganze Ketten an den Lysinen 63 und 29 eine Rolle bei der Weiterleitung von Signalen spielen (Di Fiore & Pines 2008)(Woelk et al. 2007). Erfolgt die Verknüpfung von Ubiquitinmolekülen hingegen an den Lysinen 11 und 48, führt dies zur Erkennung und Degradierung über das 26S Proteasom System (Skaar & Michele Pagano 2009). Den umgekehrten Prozess, bei dem Ubiquitin vom Ubiquitin-konjugierenden Substrat abgespalten wird, bezeichnet man als Deubiquitinierung. Wie bei der Ubiquitinierung gibt es auch bei der Deubiquitinierung Enzyme, die diese Reaktion vermitteln, die sogenannten deubiquitinierenden Enzyme (DUBs) (Ramakrishna et al. 2011). DUBs haben vier

Hauptfunktionen: Als erstes aktivieren und prozessieren sie Ubiquitin Vorläuferproteine in ausgereifte Ubiquitinmonomere (Baker & Board 1987). Zum Zweiten sind sie beim Recyclen benutzter Ubiquitinmoleküle, die während des Ubiquitinierungsprozesses anfallen, involviert (Pickart & Rose 1985). Drittens spielen DUBs eine große Rolle beim Entfernen der Ubiquitinmoleküle, die nicht mit der proteasomalen Degradation assoziiert sind (Reyes-Turcu et al. 2009). Und schließlich agieren sie als Antagonisten für ubiquitinierte Proteine, indem sie den Prozess der Ubiquitinierung umkehren (Reyes-Turcu et al. 2009)(Nijman et al. 2005) (siehe Abbildung 1).

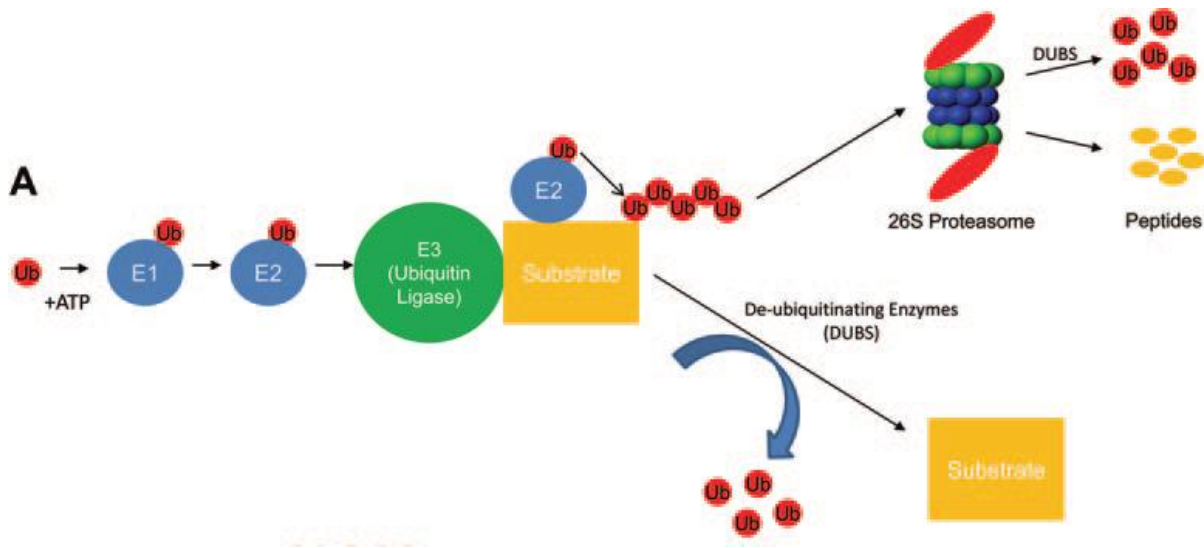


Abbildung 1: Abbau eines Proteins mittels des Ubiquitin Proteasom Systems.

Abbildung aus Homeister und Patterson, 2010.

1.2 Das E1-E2-E3 Ubiquitin Ligase System

Die Ubiquitinierung von Zielproteinen wird durch eine enzymatische Kaskade vermittelt, bei der Ubiquitin durch ein E1 (Ubiquitin-aktivierendes Enzym) aktiviert wird. Bei diesem Prozess wird Energie benötigt, welche durch Hydrolyse von ATP entsteht und in welchem das C-terminale Glycin des Ubiquitins über eine Thioesterbrücke mit dem E1 verbunden wird (Skaar & Michele Pagano 2009). In tierischen Zellen lokalisieren E1 Enzyme sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma. Daher wird angenommen, dass der Prozess der Ubiquitinierung in beiden Zellkompartimenten stattfinden kann (Hatfield et al. 1997)(Weissman 2001). Im nächsten Schritt wird das Ubiquitin an ein E2 (Ubiquitin-konjugierendes Enzym)

übertragen, bevor es im darauffolgenden Schritt weiter transferiert wird. Der letztendliche Transfer wird durch eine E3 (Ubiquitin Ligase) vermittelt (siehe Abbildung 2). Während das humane Genom für nur zwei E1s und einige E2s kodiert, gibt es mehrere hundert E3s. Dadurch ist eine einzelne Kerneinheit in der Lage, viele Substrate zu ubiquitinieren. Schließlich wird das mit Ubiquitin markierte Protein vom 26S Proteasom erkannt und degradiert (Vierstra 2003). Es wird jedoch nur das Substrat degradiert. Da das Ubiquitin weiter verwendet werden kann, wird dieses vorher an der 19S-RP Untereinheit abgespalten. Dies geschieht über die DUB Enzyme (Vierstra 2003).

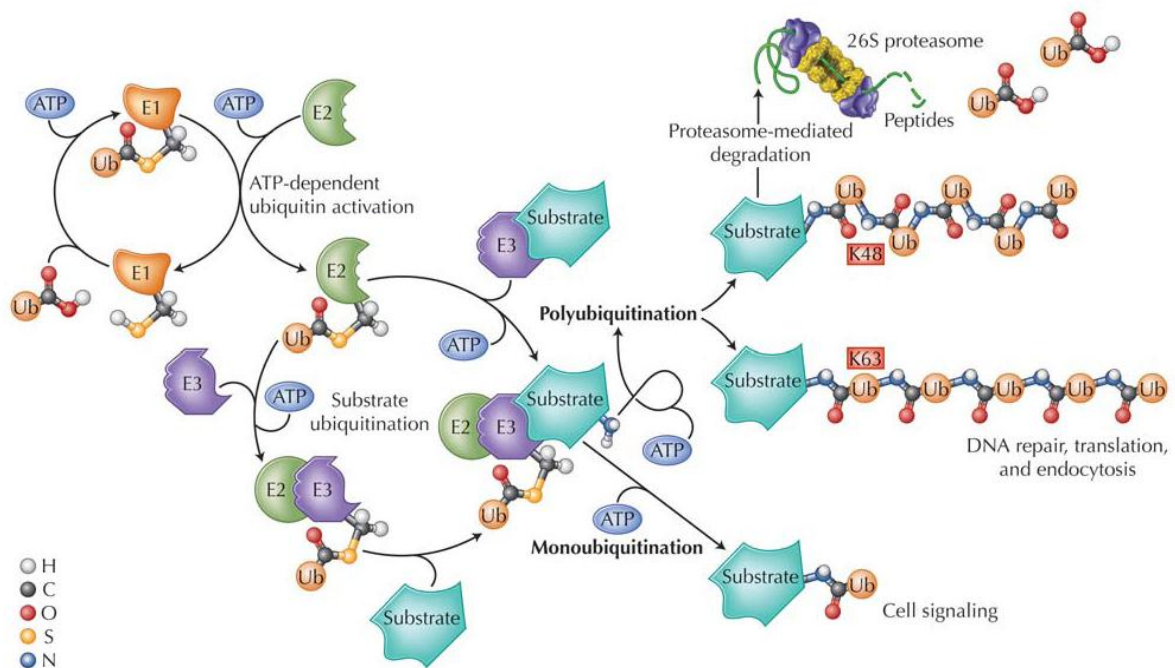


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Proteindegradation mittels des 26S Proteasoms und der Ubiquitinierungsmöglichkeiten.

Abbildung aus Willis, 2009.

Die E3s können anhand verschiedener Domänen und unterschiedlicher biochemischer Eigenschaften in zwei unterschiedliche Gruppen eingeordnet werden. Das Homolog zu E6-AP C-Terminus (HECT) Domäne Protein ist strukturell vergleichbar mit E6-AP, welches die Degradierung des Tumorsupressorproteins p53 durch das virale Onkogenprodukt Humane Papillomaviren (HPV) E6 vermittelt. Während des finalen Transfers von Ubiquitin an sein Substrat, formt die HECT Familie eine transient kovalente Bindung zum Ubiquitin. Bei der Ring-Familie werden jedoch durch die Ring-Domäne die E2s rekrutiert, welche keine direkte Rolle in der

Ubiquitinierungsreaktion spielt (siehe Abbildung 3). Sie vermitteln viel mehr den Transfer des Ubiquitins vom E2 auf das Substrat. Aufgrund ihrer strukturellen Zusammensetzung kann die Ring E3 Familie in zwei weitere Untergruppen eingeteilt werden. In der einen Gruppe enthält ein einfaches Polypeptid sowohl die Ring- als auch die Substrat Adapter Domäne. Während sich in der anderen Gruppe ein Multiuntereinheiten Komplex bildet, welcher aus ganz bestimmten Ring- und Substrat Adapter Domänen besteht und diese dann den E2-Substrat Komplex rekrutieren (Skaar & Michele Pagano 2009).

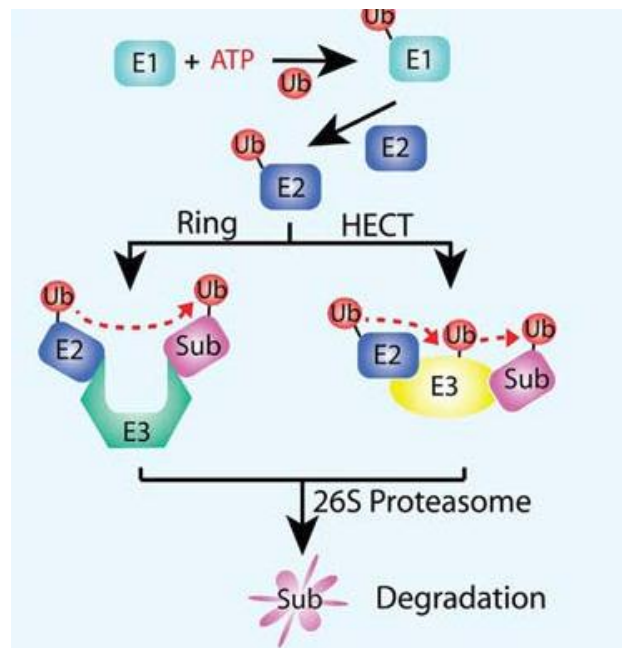


Abbildung 3: Schematische Darstellung der beiden Gruppen der E3 Ligasen.

Abbildung aus Chien, 2006.

1.2.1 Die E3 Ligase Familie

Wie bereits im vorigem Abschnitt beschrieben, wird die Substratspezifität durch eine Vielzahl von E3 Ubiquitin Ligasen vermittelt.

Der APC/C (Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome) Komplex spielt eine Schlüsselrolle in der Markierung von Wachstums- und zellzyklusregulatorischen Proteinen. Der APC/C Komplex besteht aus 11 Untereinheiten. Einige von ihnen zeigen Homologien zu Untereinheiten anderer E3 RING Ligasen. Z.B. APC2 welches homolog zu Cullin 1 ist (Capron et al. 2003). Der APC/C benötigt für seine Funktion zwei Co-Aktivatoren: Cdc20/FIZZY und Cdh1/FIZZY-related (Harper et al. 2002). Für die Substraterkennung sind zwei bestimmte Motive maßgebend. Die sogenannte D-

Box (Destruction Box) und die KEN-Box (Pfleger & Kirschner 2000). Als erstes wurde die D-Box im Zellzyklusprotein Zyklin B beschrieben (Glotzer et al. 1991). APC/C^{Cdc20}, welches hauptsächlich während der Mitose aktiv ist, erkennt seine Substrate mit Hilfe der D-Box. Im Gegensatz dazu, erkennt APC/C^{Cdh1} zusätzlich das KEN-Box Motiv (Pfleger & Kirschner 2000) (siehe Abbildung 4). Sowohl APC/C^{Cdh1} als auch APC/C^{Cdc20} haben wichtige Aufgaben bei der Kontrolle des Zellzyklus. Durch die gezielte Degradierung von Zellzyklusaktivatoren und Inhibitoren wird sichergestellt, dass Prozesse wie die Beendigung der Mitose, sowie die Aufrechterhaltung der G0 und G1 Phasen stattfinden (Skaar & Michele Pagano 2009).

Für die Ubiquitinierung durch den APC/C sind zwei Mechanismen beschrieben worden. Die APC/C Untereinheit kann phosphoryliert werden oder der Co-Aktivator Cdh1 kann degradiert werden (Kramer et al. 2000). Weitere regulatorische Möglichkeiten bieten inhibitorisch wirkende Proteine, wie z.B. Emi1, welches als Pseudosubstrat für die beiden Co-Aktivatoren Cdc20 und Cdh1 fungiert (Shah & Cleveland 2000)(Jerry Y Hsu et al. 2002)(J D Reimann et al. 2001).

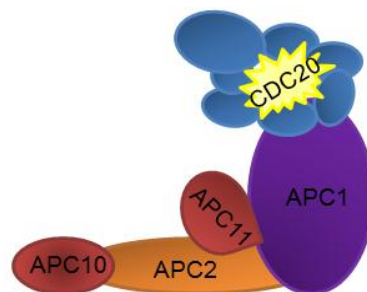


Abbildung 4: Schematische Darstellung des aktivierten APC/C-Komplexes.

Modifizierte Abbildung von Christian Hoischen, Leibniz-Institut für Altersforschung

Eine der am besten charakterisierten Ring Ligasen ist der SCF (Skp-Cullin-F-Box) Komplex. Dieser besteht aus vier Untereinheiten: Skp1, Cul1/Cdc53, Roc1/Rbx1/Hrt1 und einem F-Box-Protein. Innerhalb dieses Komplexes besitzt Cullin1 die Funktion eines Gerüstproteins. Cullin1 bindet mit seinem C-terminalen Ende Roc1. Damit ist der Komplex in der Lage, die Ub-konjugierten E2s zu rekrutieren. An seinem N-terminalen Ende interagiert Cullin1 mit Skp1. Dieser wiederum bindet an die F-Box eines F-Box-Proteins und gibt dem Komplex damit seine Spezifität (Ho et al. 2006).

Damit hat Cullin1 eine Schlüsselfunktion in der Formation dieses Komplexes (siehe Abbildung 5). Allein das humane Genom kodiert für acht verschiedene Cullin Proteine (CUL1-4A, 4B, 5, 7 und 9). All diese Cullin Proteine bilden ähnliche Cullin-Ring Ligase (CRL) Komplexe.

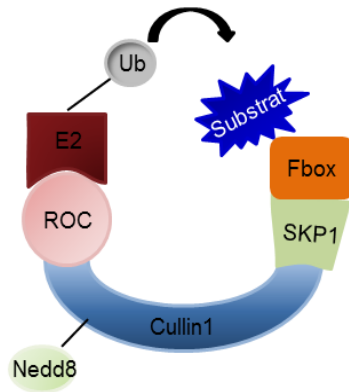


Abbildung 5: Schematische Darstellung des SCF Komplexes

Aufgrund der großen Flexibilität dieser Maschinerie, verschiedene Gerüstproteine mit variablen Adapterproteinen zu kombinieren, kann der Zellzyklus exakt gesteuert werden. Damit die Substrate jedoch von den Adapter (F-Box) Proteinen erkannt werden können, müssen sie in den meisten Fällen vorher phosphoryliert werden. Dies geschieht durch Zyklin-Abhängige-Kinasen (Cdk). Das F-Box-Protein Skp2 z.B. ist verantwortlich für den selektiven Abbau von phosphoryliertem p27, ein wichtiger Zellzyklusregulator (Carrano et al. 1999)(del Pozo & Estelle 2000)(Ho et al. 2006).

Durch das Auswechseln einer einzigen Untereinheit ist ein jeder dieser Komplexe in der Lage, mit einer einfachen Basis viele verschiedenen Substrate zu identifizieren. Beim APC/C-Komplex hingegen vermitteln nur zwei Co-Aktivatoren die Substratspezifität. Obwohl bisher gezeigt wurde, dass der SCF Komplex und der APC/C die beiden Haupt E3s in der Zellzykluskontrolle sind, haben sie jedoch weitere, größtenteils noch unbekannt Funktionen in anderen Bereichen der Zellphysiologie (Skaar & Michele Pagano 2009).

1.2.2 Regulierung der Aktivität des SCF E3 Komplexes

Durch den gezielten Abbau von Proteinen mittels der E3 Ubiquitin Ligasen werden verschiedene Wachstums- und Entwicklungsprozesse reguliert. Das Ubiquitin

ähnliche Protein NEDD8/RUB1 (Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Downregulated 8/Related to Ubiquitin 1) im Zusammenspiel mit dem COP9 Signalosom (Constitutively Photomorphogenic 9) und CAND1 (Cullin-Associated, Neddylation-Dissociated 1) reguliert die Aktivität der E3 Ligasen. Neddylierung, das heißt, die kovalente Verknüpfung von NEDD8 mit einem anderen Protein, konnte für fast alle Cullin Proteine gezeigt werden. Zusätzlich kann NEDD8 durch das COP9 Signalosom wieder entfernt werden. So, wie bei der Ubiquitinierung, wird die Neddylierung durch eine Enzymkaskade bestehend aus einem E1 einem E2 und einem E3 vermittelt (in diesem Fall das CRL selber) (Pan et al. 2004)(Rabut & Peter 2008).

Die Neddylierung hat unterschiedliche Effekte auf die CRL Komplex Aktivität. Es hat einen Einfluss auf den Zusammenbau des Komplexes. Durch die Bindung eines unmodifizierten CUL1s an CAN1 wird die Bindungsstelle für das SKP1 F-Box-Protein Paar blockiert (Goldenberg et al. 2004)(J. Liu et al. 2002)(Zheng et al. 2002)(Oshikawa et al. 2003). Durch die Konjugation von NEDD8 dissoziiert der CUL1-CAND1 Komplex und erlaubt damit die Etablierung eines aktiven Komplexes. Die inhibierende Wirkung von CAND1 scheint für alle Culline zu gelten. Obwohl dieses Model die essentielle Bedeutung für NEDD8 zeigt, kann es nicht den stimulierenden Effekt erklären (Chuang et al. 2004)(Furukawa et al. 2000)(Podust et al. 2000)(Read et al. 2000).

1.2.2.1 F-Box-Proteine und ihre Funktion in der Entwicklungsbiologie

F-Box-Proteine erfüllen wichtige Aufgaben in verschiedenen Bereichen der Zellbiologie. Eine ihrer wichtigsten Funktionen ist die Vermittlung der Substratspezifität im SCF Komplex. Dadurch verbinden sie die Ubiquitinmaschinerie mit diversen zellulären Prozessen. Durch die Regulierung der Substratstabilität kann gezielt Kontrolle auf einzelne Signalwegkaskaden genommen werden. Die Spezifität wird dabei durch eine große Anzahl verschiedener F-Box-Proteinen erreicht - bislang wurden 47 F-Box-Proteine im Säugetier identifiziert (Cenciarelli et al. 1999)(Winston et al. 1999). Alle F-Box-Proteine haben eine gemeinsame Domäne, die ihnen auch ihren Namen gibt. Dieses ca. 50 Aminosäure-lange Motiv, welches an der N-terminalen Seite sitzt, vermittelt die Protein-Protein Interaktion mit dem

Adapterprotein Skp1 (Kipreos & Michele Pagano 2000)(Cenciarelli et al. 1999). Das F-Box-Motiv wurde als erstes im humanen Zyklin F entdeckt, welches auch der Namensgeber dieses Motivs war (Bai et al. 1996). An ihrem C-terminalen Ende besitzt ein Großteil der F-Box-Proteine weitere Protein-Interaktionsdomänen. Aufgrund dieser Domänen wird die F-Box-Familie in drei große Untergruppen eingeordnet: die FBW Untergruppe besitzt neben dem F-Box-Motiv sogenannte WD40 Wiederholungen (Trp-Asp). Eine weitere Untergruppe ist die FBL Familie. Diese Gruppe besitzt Leuzin reiche Regionen (LRR) mit deren Hilfe phosphorylierte Substrate gebunden werden (Kobe & Kajava 2001). Die dritte Gruppe beinhaltet alle anderen F-Box-Proteine. Sie wird als FBX bezeichnet und umfasst verschiedene Typen von Protein-Interaktionsdomänen sowie unbekannte Domänen (Jin et al. 2004). Diese drei Gruppen unterscheiden sich überdies in ihrer Konservierung zwischen verschiedenen Eukaryoten. Während man annähernd alle F-Box-Proteine der beiden ersten Gruppen in *C.elegans* und *S.cerevisiae* wiederfindet sind jedoch nur etwa die Hälfte aus der dritten Gruppe dort zu finden (Kipreos & Michele Pagano 2000). Aufgrund dieser Homologie könnten sich gemeinsame Abbauege in unterschiedlichen Organismen entwickelt haben.

In einigen Organismen konnten F-Box-Proteine in entwicklungsbiologischen Prozessen sowie in einigen Signalwegen nachgewiesen werden. Wie zum Beispiel im Fall von *supernummerary limbs (slimb)*, eines der am besten charakterisierten *F-Box*-Gene in *Drosophila*. Sein humanes Homolog, das F-Box-Gen β -*Trep* kontrolliert die Stabilität verschiedener, wichtiger „Signalmoleküle“. Unter den Substraten befindet sich unter anderem Cubitus interruptus (Ci) und Armadillo (Arm, das humane β -catenin). Diese beiden Signalmoleküle kontrollieren unter anderem die nachfolgende Effektoren von Wingless (Wg) und Hedgehog (Hh), zwei sehr wichtige Signalwege in der Entwicklungsbiologie (Ho et al. 2006). Als ein nachfolgender Effektor von Hh reguliert Ci die transkriptionelle Antwort, welche durch Hh Liganden ausgelöst wird.

Im Dorsal/NF κ B Signalweg degradiert SCF^{Slimb} Cactus/I κ B. Zusätzlich hat Slimb eine Aufgabe bei der Kontrolle des Circadianrhythmus in Fliegen (Ko et al. 2002)(Grima et al. 2002). Des Weiteren hat es einen großen Einfluss auf die Oogenese in *Drosophila* (Muzzopappa & Wappner 2005) und hat wichtige regulatorische Eigenschaften während der Mitose (Wojcik et al. 2000).

Ein weiteres gut erforschtes F-Box-Gen ist *archipelago* (*ago*), dem Kontrollfunktionen in Bezug auf den Zellproliferationsprozess zugeschrieben werden. Es reguliert den Zellzyklusregulator Zyklin E (K H Moberg et al. 2001) und den Wachstumsfaktor dMyc in *Drosophila* (Kenneth H Moberg et al. 2004). Das humane Homolog zu *ago* ist *Fbw7*. Es baut beispielsweise Notch, sowohl in Säugetieren als auch in *C. elegans*, ab (Hubbard et al. 1997)(G. Wu et al. 2001). Der Verlust von *Fbxw7* ist embryonal letal. Durch den Einsatz von konditionellen Verlustmutanten konnte die Rolle von *Fbxw7* im hämatopoetischen System analysiert werden. Es wird vermutet, dass hämatopoetische Stammzellen (HSC) in der G0 Phase verharren, bis sie die Stammzellnische verlassen und anfangen zu proliferieren und zu differenzieren. Bei einem Verlust von *Fbxw7* führen erhöhte c-Myc Konzentrationen zu einem Fortlaufen im Zellzyklus und eventuell zu einem Abbau dieser HSC. Dies würde erklären, warum die *Fbxw7* Verlustmutanten HSC nicht in der Lage sind, neues Knochenmark zu bilden. Die erhöhte Proliferationsrate der *Fbxw7* Verlustmutanten HSC führt außerdem zu vermehrter Bildung von Vorläufer T-Zellen (CD4+/CD8+). Diese verschwinden jedoch relativ schnell wieder, da bei den einzelnen differenzierten Zellen p53 aktiviert wird und die Zellen daraufhin in Apoptose gehen (Thompson et al. 2008)(Matsuoka et al. 2008).

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

F-Box-Proteine besitzen eine essentielle Bedeutung für die Degradierung verschiedener Proteine und die damit gekoppelte Kontrolle über Signalwege und entwicklungsbiologischer Prozesse in der Zelle. Fehler in diesem System können zu Missbildungen, Krebs und frühe Letalität führen. Bis heute sind jedoch nur wenige F-Box-Proteinen untersucht wurden und über die Funktion vieler F-Box-Proteine ist nichts bekannt. Um ihre Funktionen und unterschiedlichen Aufgaben besser zu verstehen, müssen sie näher untersucht werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe der Gesamtembryo *in situ* Hybridisierung nach einem *F-Box*-Gen zu suchen, dass eine spezifische Expression aufweist und in der Literatur noch nicht bekannt ist. Mit der *Fbx1* Gruppe wurde angefangen. Es stellte sich heraus, dass *Fbx122* eine spezifische Expression aufweist. Dieses Gen sollte nun so weit wie möglich untersucht werden. Dafür sollten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Modelle benutzt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial

| | |
|---------------------------|--|
| Computer: | Apple iMac |
| Software: | Amira 3.1.1 for OSX (Mercury Computer Systems), Office:mac v.X. (Microsoft), Filemaker pro 6.0 (Filemaker), Mac Vector 10.5.2 (Accelrys), Photoshop CS (Adobe), Illustrator CS (Adobe) |
| Geldokumentationskammer: | Biorad, Sony Thermodrucker UP890CE |
| Gelelektrophoresezubehör: | Eigenbau |
| Glaswaren: | Objektträger: Superfrost plus (Menzel), |
| Deckgläser: | 24x60mm (Roth) |
| Heizplatte: | Schott |
| Hybridisierungsöfen: | mit Kippschüttler (Amersham) Mit Drehschüttler (Biometra) |
| Inkubatoren: | Wasserbäder (GfL), Rundschüttler (Infors HT), Trockeninkubatoren (Mettler) |
| Laborbedarf, allgemein: | Multimed, KDL, Kimberly-Clark |
| Nylonmembran: | HybondN-Plus (Amersham) |
| Mikropipetten: | Eppendorf, Roth |
| Mikroskope: | Leica DM5000 mit Digitalkamera Leica DFC 300FX und DFC350F, Leica MZ75, Leica M420 mit FUJI DigitalkameraHC3002, Leica MZFLIII mit UV-Lampe ebq 100(Leistungselektronik Jena GmbH), Zeiss Axioplan mit Digitalkamera ProgRes C14 (Jenoptik) und UV-Lampe (Zeiss) |
| Mikrotom: | Leica RM2155 |
| Mikrowellenöfen: | LG |
| Netzteil: | Biorad Powerpack 300 |
| pH-Meter: | WTW |
| Photometer: | Eppendorf BioPhotometer |
| Plastikwaren: | Greiner, Sarstedt, Falcon, Sigma |
| Präparierbesteck: | Fine Science Tools |
| Säulenmaterialien: | NucleoSpin-,NucleoBond-Säulen(Macherey&Nagel) |

| | |
|-------------------------|--|
| Schüttler und Rührer: | Heidolph, Assistent, IKA, Stuart, GFL |
| Thermoblock: | Eppendorf ThermoStat plus |
| Thermocycler: | Primus 96 plus (MWG-Biotech)peqSTAR 96 (PEQLABBiotechnologie GmbH) |
| Thermomixer: | Eppendorf 5436, HLC |
| Trockenplatte: | Medax |
| UV-Lampen: | UV Stratalinker 2400 (Stratagene) |
| Waagen: | Kern |
| Zentrifugationszubehör: | 50 ml und 400 ml Becher (Beckman) |
| Zentrifugen: | Eppendorf Tischzentrifuge 5415D, Beckman Model J6B mit den Rotoren JA-10, JA-20, Heraeus Biofuge13 und Biofuge15 |

2.2 Chemikalien

Chemikalien des Reinheitsgrads p.A. sowie gebrauchsfertige Lösungen wurden von den Firmen Amersham, AppliChem, BioRad, Boehringer, Fisher Chemicals, Fluka, Invitrogen, J.T.Baker, Merck, Pharmacia, Riedel-de-Häen, Roth, Sigma-Aldrich und Vector bezogen.

2.3 Substanzen und Kits für die Molekularbiologie

5-Bromo-2'-deoxy-Uridin (Roche), Anti-Digoxigenin-AP-Fab Fragmente (Roche), Antigen unmasking solution (VectorLabs), Blocking Reagent (Roche), BM Purple AP Substrate (Roche), DIG-Labeling-NTP-Mix (Roche), DNase I (Roche), Klenow-Fragment (NEB), Lysozym, Oligonucleotide (Sigma), Proteinase K (Roche), Restriktionsendonukleasen (NEB, Fermentas), RNase A (Roth), Rnasin (Promega), SP6 RNA Polymerase (Roche), T3 RNA Polymerase (NEB), T4 DNA Ligase (Fermentas, Boehringer), T4 Polynukleotidkinase (Pharmacia), T7 RNA Polymerase (NEB), 1 kB Leiter (GibcoBRL), Taq DNA Polymerase (Sigma), Vectastain DAB Substrate Kit für Peroxidasen (VectorLabs), Vectastain Peroxidase-anti-Kaninchen IgG (PK4001, Vector), Vectastain Peroxidase-Mouse-on-Mouse-Kit (PK2200, Vector), PAS Färbesystem (Sigma Aldrich), BCA Kit,

2.4 Antikörper

Es wurden folgende Antikörper benutzt.

Tabelle 1: Alle benutzten Antikörper mit Name der Firma, Bestellnummer, Verdünnung eingesetzt in Western Blot oder Immunfluoreszenz

| Name | Verdünnung WB | Verdünnung IF | Firma | Bestell nr. |
|---|---------------|---------------|-----------------------------|-------------|
| anti-alpha-smooth muscle actin, (1A4) | | 1:800 | Sigma | C 6198 |
| anti-cardiac troponin I (cTnI) | | 1:300 | HyTest | 4T21/2 |
| anti-collagen, type IV | | 1:300 | Millipore | AB756P |
| anti-human Fibronectin(Fn-15) | | 1:200 | Sigma | |
| Biotin-SP Donkey Anti-Goat IgG (H+L) | | 1:250 | Dianova | |
| Biotin-SP Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) | | 1:250 | Dianova | |
| Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG | | 1:250 | Jackson ImmunoResearch | |
| Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rat IgG | | 1:250 | Jackson ImmunoResearch | |
| Col1A2 (M-80) | | 1:200 | Santa Cruz | SC-28654 |
| Donkey anti mouse IgG (H+L)Red-X | | 1:250 | Dianova | 715-295-151 |
| Goat anti mouse | 1:2500 | | Santa Cruz | SC-2005 |
| Goat anti rabbit | 1:5000 | | Dianova | 111-035-045 |
| Goat anti rabbit rhodamine | | 1:100 | Dianova | 111-295-144 |
| Goat anti rat | 1:5000 | | Jackson-Dianova | 112-035-068 |
| Goat anti rat Alexa 555 | | 1:200 | Invitrogen Molecular probes | |
| Goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 555 | | 1:500 | Invitrogen Molecular probes | |

| | | | | |
|---|---------|-------|---------------------------------|-----------------|
| Goat-anti-rabbit, Alexa-488 | | 1:500 | Invitrogen Molecular probes | A-11034 |
| Gonkey anti mouse Alexa 488 | | 1:200 | Invitrogen | A21202 |
| Laminin | | 1:200 | Sigma | L9393 |
| MMP2/8B4 | | 1:200 | Abcam | ab7032 |
| Mouse anti Brdu | | 1:160 | Roche | 117037 6 |
| Mouse anti c-myc | 1:5000 | 1:250 | Santa Cruz (9E10) | SC-40 |
| Mouse anti flag M2 | 1:10000 | 1:800 | | |
| Mouse anti p27 | | 1:200 | BD Transduction Laboratories | 610242 |
| Mouse monocl. heavy chain cardiac myosin | | 1:200 | Abcam | ab15 |
| Mouse-anti-Collagen II (II- II6B3) | | 1:100 | | |
| p21 | | 1:200 | Santa Cruz | sc-397 |
| rabbit anti cullin-1 | 1:1000 | | Santa Cruz (H213) | SC- 11384 |
| rabbit anti GFP | 1:1000 | 1:200 | Santa Cruz (FL) | SC- 8334 |
| rabbit anti skp-1 | 1:1000 | | Santa Cruz (H163) | SC- 7163 |
| Rabbit pAb to Prox1 | | 1:200 | Abcam | ab1194 1-100 |
| Rabbit pAb to S100A4 | | 1:100 | Abcam | ab2795 7-250 |
| Rabbit pAb to SM22alpha | 1:1000 | 1:200 | Abcam | ab1410 6-100 |
| Rabbit polyclonal IgG DDR2 (H-108) | | 1:200 | Santa Cruz | sc-8989 |
| rabbit polyclonal to NOTCH3 | | 1:200 | | |
| Rat anti HA | 1:5000 | 1:250 | Roche (3F10=12CA5) | 118674 23001 |

2.5 DNA Methoden

2.5.1 Lösungen

Nicht aufgeführte Lösungen wurden nach Standardprotokollen hergestellt (Sambrook *et al.*, 1989), (Ausubel, 1994).

| | |
|-------------------------|---|
| 10x PCR Puffer Nr.2: | 100 mM TRIS.HCl pH8.5, 20 mM MgCl ₂ , 500 mM KCl, |
| 10x PCR Puffer Nr.8: | 100 mM TRIS.HCl pH8.5, 20 mM MgCl ₂ , 500 mM KCl, 50% DMSO (Sigma), |
| 10x PCR Puffer Nr.35: | 100 mM TRIS.HCl pH8.5, 10 mM MgCl ₂ , 500 mM KCl, 35% DMSO (Sigma) |
| Churchpuffer: | 70 g SDS, 20 ml EDTA 0,5 M, 10 g BSA auf 1 l mit Wasser auffüllen |
| Denaturierungspuffer: | 87,66 g/l NaCl, 20 g/l NaOH |
| dNTPs: | 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (für PCR) |
| EDTA: | 0,5 M in H ₂ O, pH 8,0. |
| G50-Puffer: | 10 mM TRIS pH7,5, 10 mM EDTA, 20mM NaCl, 0,1% SDS |
| HCl-Lösung (0,25 N): | 40 ml HCl 37% in 1,96 l ddH ₂ O |
| Heringsspermalösung: | 10 mg/ml in ddH ₂ O lösen, stark schütteln, für 5 min kochen, bei -20°C lagern, vor Gebrauch erneut aufkochen |
| Lösung 1: | 50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris, pH 8,0, 20 µg/ml RnaseA (frisch dazugeben) |
| Lösung 2: | 0,2 M NaOH, 1% SDS, pH 12,5-13,5 |
| Lösung 3: | 3 M Kaliumazetat |
| Neutralisierungspuffer: | 87,66 g/l NaCl, 60,5 g/l Tris-Base, pH 7,5 |
| SSC 20x: | 88,23 g/l Trinatriumcitrat, 175,32 g/l NaCl, pH 7-8 |
| TBE Puffer (10x): | 108 g Tris-HCl, 55,5 g Borsäure, 40 ml 0,5 M Na ₂ EDTA, pH 8,0 in 1 l Wasser |
| Transformations-Lösung: | 50-500 ng rekombinanter Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsansatz in 100 µl 1x KCM-Puffer |
| Waschlösung: | 0,1 % SDS in 2x SSC 0,1 % SDS in 1x SSC 0,1 % SDS in 0,1x SSC |

2.5.2 Standardmethoden

Molekularbiologische Standardmethoden wie Präparation genomischer DNS aus Gewebeproben, Präparation von Plasmid-DNS, Präzipitation von Nukleinsäuren, Agarosegelelektrophoresen, Restriktionsspaltungen von Plasmid-DNS, Dephosphorylierung restriktionsverdauter DNS, Ligation von DNS-Fragmenten und Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen wurden nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989), (Ausubel, 1994). Zur Isolierung von sehr reiner Plasmid-DNA wurden Plasmidaufreinigungs-Kits von Macherey&Nagel (NucleoSpin, NucleoBond) verwendet. Für die Elution von DNS Fragmenten aus Agarosegelen wurde das 'Zymoclean Gel DNA Recovery' Kit (Zymo Research) verwendet. DNS Sequenzierung erfolgte im Haus unter Verwendung des 'BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing' Kits (PE Applied Biosystems).

2.5.3 Aufreinigung von BAC DNS

Für die Aufreinigung von BAC DNS wurde ein modifiziertes Protokoll nach M. Messerle und E. Borst benutzt. Es wurde eine Übernachtkultur (10 ml) in LB-Medium + entsprechendes Antibiotikum angelegt. Am nächsten Tag wurden 9 ml Kultur bei 4000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml LB-Medium resuspendiert. Nach erneutem zentrifugieren (5 min, 5000 rpm) wurde der Überstand erneut verworfen. Das Pellet wurde in 200 µl Lösung 1 resuspendiert. Dazu wurden 300 µl Lösung 2 hinzugegeben und 10 x invertiert. Das Gemisch wurde für 5 min bei RT inkubiert und danach mit Lösung 3 versetzt und wieder 10 x invertiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 10 min mit anschließender Zentrifugation für 5 min bei 14000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen und zum Fällen mit 600 µl Isopropanol versetzt. Anschließend wurde für 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert, gewaschen (70 % Ethanol) und wieder zentrifugiert (10 min, 14000 rpm). Das Pellet wurde in 100 µl TE aufgenommen.

2.5.4 DNA-Vektoren, rekombinante Plasmide und Wirtssysteme

2.5.4.1 Klonierungsvektoren

Als Plasmidvektor zur Subklonierung von DNA-Fragmenten und für *in vitro* Transkription wurden pBlueskript II KS/SK (Stratagene), pGem4z (Promega), pGem-T-Easy (Promega) verwendet.

2.5.4.2 Wirtssysteme

2.5.4.2.1 Bakterienstämme

Zur Transformation von Plasmid-DNA wurden *E. Coli*-Zellen der Stämme XL1-Blue (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)])

XL10-Gold (Tetr Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]a) von Stratagene verwendet.

BL21 (F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]))

2.5.4.3 Plasmidkonstrukte zur Erstellung von Hybridisierungssonden

Tabelle 2 Plasmidkonstrukte zur Erstellung von Hybridisierungssonden

| Gene Symbol | Gene Name | Lin-Nr. | Plasmid Nr. | Polymerase | Enzym |
|-------------|---|---------|-------------|------------|---------|
| Skp2 | S-phase kinase-associated protein 2 (p45) | 855 | 3679 | T3 | SphI |
| Fbxl2 | F-box and leucine-rich repeat protein 2 | 856 | 3680 | T3 | HindIII |
| Fbxl3 | F-box and leucine-rich repeat protein 3 | 857 | 3681 | T3 | NdeI |
| Fbxl4 | F-box and leucine-rich repeat protein 4 | 858 | 3682 | T3 | PstI |

| | | | | | |
|--------|--|-----|------|----|---------|
| Fbxl5 | F-box and leucine-rich repeat protein 5 | 859 | 3683 | T3 | BglIII |
| Fbxl6 | F-box and leucine-rich repeat protein 6 | 860 | 3684 | T3 | HindIII |
| Fbxl7 | F-box and leucine-rich repeat protein 7 | 861 | 2800 | T3 | NdeI |
| Fbxl8 | F-box and leucine-rich repeat protein 8 | 862 | 3685 | T3 | SacII |
| Lrrc29 | Leucine rich repeat containing 29 | 863 | 3686 | T3 | PvuII |
| Kdm2b | Lysine (K)-specific demethylase 2B | 864 | 3687 | T3 | NdeI |
| Fbxl12 | F-box and leucine-rich repeat protein 12 | 865 | 3688 | T3 | PvuII |
| Fbxl13 | F-box and leucine-rich repeat protein 13 | 866 | 3689 | T3 | HincII |
| Fbxl14 | F-box and leucine-rich repeat protein 14 | 867 | 3690 | T3 | PstI |
| Fbxl15 | F-box and leucine-rich repeat protein 15 | 868 | 3691 | T7 | PstI |
| Fbxl17 | F-box and leucine-rich repeat protein 17 | 869 | 3692 | T7 | PvuII |
| Fbxl19 | F-box and leucine-rich repeat protein 19 | 871 | 3693 | T3 | PstI |
| Fbxl20 | F-box and leucine-rich repeat protein 20 | 872 | 3694 | T3 | NdeI |
| Fbxl21 | F-box and leucine-rich repeat protein 21 | 873 | 3695 | T3 | HincII |
| Fbxl22 | F-box and leucine-rich repeat protein 22 | 874 | 3696 | T3 | NdeI |

2.5.5 Synthetische Oligonukleotide

Die folgende Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

Tabelle 3: Verwendete DNS Oligonukleotide. Von 5' in 3' Richtung abzulesen. Veranschaulicht bei AKO0925.

| Oligo Nr.: | Sequenz | Gene | Verwendung |
|-------------------|---|-------------|-------------------|
| AKO925 | 5'-AGCGGAGCCAAGCCAGCA-3 | Tbx3 | Genotypisierung |
| AKO926 | GCTAGAGCCTGTTTTGCACGTTCA | Tbx3 | Genotypisierung |
| AKO927 | CCTTGGCCTCCAGGTGCAC | Tbx3 | Genotypisierung |
| AKO1204 | ATGACAGACAGATCCCTCCTATCTCC | MHC | Genotypisierung |
| AKO1205 | CTCATCACTCGTTGCATCGAC | MHC | Genotypisierung |
| AKO1233 | ATCGCATATGCACATAACCCAGCTCAAT CG | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1234 | ATCGCATATGCACTTCCATTCTCTCGCA GAGC | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1235 | CGATCATATGGTAGGAGCCCCTGGGGT GAG | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1236 | ATGCGAATTCTCACCATGCACATAACCC AGC | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1237 | ATGCGAATTCACCATGCACTTCCATTCT CTCGCAGAG | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1238 | CGATGGATCCGTGTAGGAGCCCCTGGG GTGAG | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1267 | ATGCGGATCCACCATGCACATAACCCAG CTC | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1268 | ATGCGGATCCACCATGCACTTCCATTCT CTCGCAGAG | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1269 | CGATGAATTCCTGTTAGGAGCCCCTGGG GTGAG | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1283 | GCAACAGGTGCCCAAC | Fbxl22 | RT-PCR Forward |
| AKO1284 | CTCAGTAGGAGCCCCTG | Fbxl22 | RT-PCR Reverse |
| AKO1339 | CCAGAGCAGTGGAACCTACA | Fbxl22 | Genotypisierung |
| AKO1340 | CAGGCAAGGAACAGAGAAGG | Fbxl22 | Genotypisierung |
| AKO1341 | TGTATGTGCAGAGAGGCAGG | Fbxl22 | Genotypisierung |

| | | | |
|---------|---|--------------|-----------------|
| AKO1342 | AACTGCTTGTCCCAAACACC | Fbxl22 | Genotypisierung |
| AKO1376 | ACTAGTGATCAAGAGGCGGCCGCAAGG CGCGCCGAGCTC | Fbxl22 KO | Klonierung |
| AKO1377 | GAGCTCGGCGCGCCTTGCGGCCGCCTC TTGATCACTAGT | Fbxl22 KO | Klonierung |
| AKO1378 | GAGAGTCGACAGTGCAGGGCAAGTACC | Fbxl22 KO | Klonierung |
| AKO1379 | GAGAATTCGGCCGCACGTGAATGCCC | Fbxl22 KO | Klonierung |
| AKO1380 | GAGAGCGGCCGCTCAATCGGGAGTGTC TGC | Fbxl22 KO | Klonierung |
| AKO1381 | GAGAGGCGCGCCGATGAGGGACTGAG ACAGAGCC | Fbxl22 KO | Klonierung |
| AKO1382 | GGCCCACCGGTTTCACAGTG | Fbxl22 KO | RFLP |
| AKO1383 | CCTGCACTGTCTGTACCCAG | Fbxl22 KO | RFLP |
| AKO1384 | GAGAATTCCACTGTCAGCCACCCATCCA C | Fbxl22 KO | RFLP |
| AKO1385 | GCAGGAGCATGGCAGCTTCC | Fbxl22 KO | RFLP |
| AKO1563 | CGTCACCACTGCTGTGTCTCAGGGTTG C | Fbxl22 | Genotypisierung |
| AKO1564 | CGGTAATGCAGGCAAATTTTGGTGTACG | Fbxl22 | Genotypisierung |
| AKO1565 | TTCCTTGTCCAGTGAAGTTGATGG | Fbxl22 | Genotypisierung |
| AKO1566 | GCAGGCAAATTTTGGTGTACG | Fbxl22 | Genotypisierung |
| AKO1567 | CTCCCACTCATGATCTATAG | Fbxl22 | Genotypisierung |
| AKO1568 | GTACATTCATACAAGGGTTAG | Fbxl22 | Genotypisierung |
| AKO1569 | TCGCCGCTCCCGATTTCGCAGC | Fbxl22 | Genotypisierung |
| AKO1570 | CTACCGAGGAGGAGCCGGGGCTCTC | Fbxl22 | Genotypisierung |
| AKO1583 | CGATCATATGCAGCAGGGGCCAGAGGG T | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1584 | ATCGCATATGAACAGGTGCCCCAACCTG ACG | Fbxl22 | Klonierung |

| | | | |
|---------|-------------------------------------|----------------|-----------------|
| AKO1585 | CGATCATATGCGGGCAGGCGGCGCGGA G | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1586 | CGATCATATGCGGGCAGCTGAGCAGCA AG | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1587 | GCATCATATGGCGCTGCAGACTCTGCA CGTG | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1588 | CGATCATATGTCACCTGTTGCACACCTG CAG | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1589 | ATCGAATTCGCACATAACCCAGCTCAAT CG | Fbxl22 .GST | Klonierung |
| AKO1590 | ATCGAATTCGCACTTCCATTCTCTCGCA GAG | Fbxl22 .GST | Klonierung |
| AKO1591 | CGATGAATTCAGCAGGGGCCAGAGGGT GG | Fbxl22 .GST | Klonierung |
| AKO1592 | CGATGGATCCGTAGGAGCCCGTGGGGT GAG | Fbxl22 .GST | Klonierung |
| AKO1618 | CGTCATTGACGTCAATAGGG | HPRT | Genotypisierung |
| AKO1756 | CTAGTTCTAGAGCGGCCAGC | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1757 | GCTTGAAGTTCCTATTCCGAAG | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1758 | CTATAGATCCCTCGAATCAAG | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1759 | GAGTGGATGGGTGGCTGAC | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1760 | GACAGCTGTGCACATGCATC | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1761 | CAATGTACCAAAGGACAGC | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1762 | CACTAGTTATGTCAGGGCTG | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1763 | CAATGACCGTATGACTAGTGTG | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1764 | CACTAACTTGAATCCCTCAG | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1765 | CATTTTCCAGGTATGCTCAG | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1766 | GAACCTCATCACTCGTTGC | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1767 | CAGGTATGCTCAGAAAACG | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1804 | GATCGCTAGCTCACCATGCACATAACCC AGC | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1805 | GATCGCTAGCACACCATGCACTTCCATT | Fbxl22 | Klonierung |

| | CTCTCGCAGAG | | |
|---------|---|----------------|-----------------|
| AKO1806 | GATCCATATGTCAGTAGGAGCCCGTGG GGTG | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO1906 | CGATAGATCTGTAGGAGCCCGTGGGGT GAG | Fbxl22 .HIS | Klonierung |
| AKO1907 | CGATAGATCTGGCGCACCTGTTGCACA CCTGCA | Fbxl22 .HIS | Klonierung |
| AKO1993 | TGAGTGGGGGGGTTGATAATCTTGG | HPRT | Genotypisierung |
| AKO2017 | ATTTACCGTCATTGACGTCAATAGGG | HPRT | Genotypisierung |
| AKO2021 | ATGCGAATTCACCATGCACTTCCATTCT CTCGCAGAG | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO2022 | CGATGAATTCGCACCTGTTGCACACCTG CAG | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO2143 | GAGGCAATTTCAAGCAATTTG | Fbxl22 | Genotypisierung |
| AKO2147 | GGTCCTCAAACACATCTCGG | Fbxl22 | Genotypisierung |
| AKO2151 | CTCAGCCGGAAGTTGTCTTTC | Fbxl22 | Genotypisierung |
| AKO2153 | CTCCCTCTTATTAAGGACGCTG | Fbxl22 | Genotypisierung |
| AKO2205 | ATCGGCTAGCCACATAACCCAGCTCAAT CGGG | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO2206 | ATCGGCTAGCCACTTCCATTCTCTCGCA GAGC | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO2208 | CGATGCGGCCGCGTAGGAGCCCGTGG GGTGAG | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO2209 | CGATGCGGCCGCGCACCTGTTGCACAC CTGCAG | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO2239 | ATCGCATATGTCCTTCTGGACAAGGAC AGCC | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO2240 | ATCGAAGCTTATGTCCTTCTGGACAAG GACAGCC | Fbxl22 | Klonierung |
| AKO2256 | AACACTTATCAGCTCAGAGG | Fbxl22 | Genotypisierung |
| AKO2262 | GTCTGTCCTAGCTTCTCACTG | Fbxl22 | Genotypisierung |
| AKO2271 | GCCTACCTGTTGCACACCTG | Fbxl22 | Genotypisierung |
| AKO2436 | GCAACGTGCTGGTTATTGTG | Fbxl22 | Genotypisierung |

| | | | |
|---------|-----------------------|--------|-----------------|
| AKO2437 | CTGTGCGGAGCCGAAATCTG | Fbxl22 | Genotypisierung |
| AKO2438 | GAAGAGACACAGCAGACACTC | Fbxl22 | Genotypisierung |

2.5.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von DNS für die Klonierung wurde die Polymerase Phusion (Finnzymes) benutzt. Es wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen.

2.5.7 Southern-Blotting

Die Durchführung des „Southern Blotting“ wurde nach Laborprotokoll der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Kispert durchgeführt.

2.6 RNA Methoden

2.6.1 Lösungen

| | |
|-----------------------------|--|
| DEPC-H ₂ O: | 100 µl/L DEPC in bidest. H ₂ O, über Nacht inkubiert, dann autoklaviert |
| DIG-dNTPs: | 1 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM DIGdUTP (gebrauchsfertig, Roche) |
| DTT: | 200 mM in H ₂ O. |
| Millipore H ₂ O: | bidest H ₂ O gefiltert durch Millipore Filteranlage |
| PBS: | 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,7 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4. |
| PBST | PBS mit 0,1% Tween-20, vor Gebrauch frisch anzusetzen |
| TAE (50x): | 2 M TRIS.Acetat, 0,05 M EDTA, pH 8,0. |
| TE: | 10 mM TRIS.HCl pH 8,0, 1 mM EDTA. |
| TNT-Puffer: | 10mM TRIS.HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl, 0,1% Tween-20 |

2.6.1.1 RNS Isolierung

Für die Isolierung von RNS aus Zellen und Gewebe wurde peqGOLD RNAPure™ der Firma peqLab benutzt. Es wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen.

2.6.1.2 cDNA Synthese

Zuerst wurde die RNS auf Eis aufgetaut. Dann wurde sie bei 65° C für 5 min erwärmt und sofort auf Eis gekühlt. In den Ansatz kamen 10x Puffer RT 3 µL, 3 µL dNTP mix (5 mM je NTP), 3 µL Oligo-dT-Primer (10 µM), 1,5 µL RNAsin (10 units/µL), 1,5 µL M-MuLV Reverse Transkriptase, 17 µL RNAase freies Wasser und poly A RNS (E 9,5 whole embryo, 75 ng/µL). Danach wurde für 60-90 min bei 37° C inkubiert und max. 1/5 des totalen Volumens für die PCR eingesetzt.

2.6.2 Herstellung der Hybridisierungssonden

Für die RNS *in situ* Hybridisierung wurden Digoxigenin-markierten RNS Sonden verwendet. Der 10 µl-Standardreaktionsansatz für die *in vitro* Transkription enthielt 1µl linearisierter Plasmid-DNS (500 ng/µl), 1µl 10xTranskriptionspuffer, 1 µl 10xDIG-Reaktionsmix, 1µl 0,1mM DTT, 0,5 µl Rnasin, 0,5µl RNA-Polymerase und 5µl Milipore H₂O. Nach 2h Inkubation bei 37°C und dem Verdau der Plasmid-DNA (2µl DnaseI, 30 min, 37°C) wurde die RNS gefällt und in 60µl 50%igem Formamid/DEPC-H₂O gelöst. Nach der Beurteilung der Qualität durch gelelektrophoretische Auftrennung wurde die RNS bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.7 Versuchstiere

Folgende rekombinanten Allele, die alle auf einem gemischten genetischen Hintergrund (C57BL6/J und NMRI) gehalten wurden, fanden in dieser Arbeit Verwendung:

Tbx3Cre^(Δneo): MGI: Tbx3^{tm1.1(cre)Vmc}, Hoogaarset *al.*, 2007
Hprt^{Fbxl22.Full}: MGI: M. Kleppa, unveröffentlicht
Hprt^{Fbxl22.d.F-Box}: MGI: M. Kleppa, unveröffentlicht
MHCCre^(Δneo): MGI: MHC^{tm(cre)}, Lyons et al., 1990

2.8 Mausmethoden

2.8.1 Lösungen

PFA/PBS: 4% Paraformaldehyd in PBS.

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄, pH 7,2.

2.8.2 Embryologische Methoden

2.8.2.1 Verpaarungen

Embryonen für Expressionsanalysen gingen aus Verpaarungen von NMRI-Wildtypmäusen hervor. Konditionelle mutante Embryonen der Genotypen *Tbx3Cre/+*, *Hprt^{Fbxl22.Full/Fbxl22.Full}*, *Tbx3Cre/+*, *Hprt^{Fbxl22.d.F-Box/Fbxl22.d.F-Box}*, *MHCCre/+*, *Hprt^{Fbxl22.Full/Fbxl22.Full}* gingen aus Verpaarungen von für das *Tbx3Cre* oder *MHCCre* und das entsprechende Flox-Allel heterozygoten Männchen und für das Flox-Allel homozygoter Weibchen hervor. Sofern nicht anders angegeben, wurden als Kontrolltiere *Tbx3^{+/+}* oder *MHCCre^{+/+}* homozygote Geschwistertiere verwendet. Für die Bestimmung der Trächtigkeitsperiode der Mäuse wurde die Vaginal-Plug-Methode angewandt. Ausgehend vom Tag, an dem ein mucoider Plug in der Vagina eines verpaarten Mausweibchens detektiert werden konnte (definitionsgemäß: Tag 0,5 *post coitum* (*p.c.*)), wurde der Termin für die Entnahme der Embryonen errechnet

2.8.2.2 Gewinn der Embryonen

Für die Entnahme der Embryonen wurde die trächtige Maus durch Genickbruch getötet, die Bauchdecke durch einen medianen Schnitt geöffnet und die beiden Uteri entfernt. Die Isolierung der Embryonen aus den maternalen und extraembryonalen Geweben erfolgte in gekühltem (4°C) PBS unter einem Stereomikroskop (Leica MZ75). Um die Penetration des Fixatives zu erleichtern, wurde bei Embryonen älter als E11.5 standardmäßig der Kopf vom Rumpf abgetrennt, sofern keine unversehrten Embryonen benötigt wurden. Bei E18,5 Embryonen wurden zusätzlich die Haut entfernt und die Hirnhäute durchstoßen. Mussten die Embryonen genotypisiert werden, wurde wahlweise embryonales oder extraembryonales Gewebe (Dottersack) gesammelt.

2.8.2.3 PFA-Fixierung und Dehydrierung von Embryonen und Geweben

Präparierte Embryonen/Gewebe wurden mit 4%-PFA/PBS (bei 4°C, ü.N.) fixiert, sofern nichtausdrücklich anders gekennzeichnet. Die fixierten Embryonen wurden in

PBS gewaschen (2x für 10 min, RT) und über eine aufsteigende Methanolreihe (je 1x 25%, 50%, 75%, 100% Methanol/PBS, für je nach Größe 30 min bis 2 h pro Schritt) dehydriert. Anschließend wurden sie in frisches Methanol überführt und bei -20°C bis zur Durchführung der Experimente gelagert.

2.8.2.4 Genotypisierung von Embryonen

Zur Amplifikation Allel spezifischer DNS-Fragmente wurde eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Der Standardreaktionsansatz enthielt ungefähr 500 ng genomische DNS, je 10 pmol der spezifischen Primer-Oligonukleotide, je 10 nmol der vier dNTPs, 5 µl 10 x PCR-Puffer und 1,5 U Taq-Polymerase (Sigma) und wurde mit MQ-H₂O auf ein Endvolumen von 50µl aufgefüllt. Alle PCR Reaktionsprotokolle beinhalteten eine 2-4 min Denaturierung bei 94°C, ungefähr 30-35 Amplifikationszyklen, einen abschließenden 8 min Syntheseschritt und eine Lagerungsphase bei 4°C. Die Oligonukleotide wurden allelspezifisch variiert (Tabelle 4):

Tabelle 4: Verwendete Primerkombinationen für die Genotypisierung. wt: Wildtypallel; mut: transgenes Allel

| PCR | Oligo 1 | Oligo 2 | Oligo 3 | Fragement in bp | |
|--------------------------------------|---------|---------|---------|-----------------|-----|
| | | | | wt | mt |
| <i>Tbx3^{Cre}</i> | AKO0925 | AKO0926 | AKO0927 | 300 | 550 |
| <i>MHC^{Cre}</i> | AKO1204 | AKO1205 | | | 300 |
| <i>Hprt^{Fbxl22.Full}</i> | AKO2147 | AKO2153 | | | 710 |
| <i>Hprt^{Fbxl22.d.F-Box}</i> | AKO2151 | AKO2153 | | | 641 |
| <i>Hprt2</i> | AKO2143 | AKO1617 | AKO1417 | 547 | 780 |

2.8.3 Isolierung der Herzen, Zungen und Blasen aus Embryonen und adulten Tieren

Mausembryonen der Stadien E16.5 und älter wurden freipräpariert (2.8.2.2). Vom posterioren Ende ausgehend wurde dann das Herz in PBS unter Verwendung eines Stereomikroskopes freipräpariert. Für die Isolation von Blase, Herz und Zunge adulter Tiere wurden Tiere des entsprechenden Genotyps durch Genickbruch getötet und die Haut abgezogen. Nach dem Öffnen der Bauchdecke und dem Entfernen der Blase wurden alle inneren Organe entfernt um Platz für die Präparation des Herzens

zu schaffen. Das Diaphragma wurde aufgeschnitten und der Brustkorb lateral abgeschnitten. Danach wurde das Herz mitsamt allen Lungenflügeln herausgeholt und in PBS unter Verwendung eines Stereomikroskopes freipräpariert. Um die Zunge freizupräparieren wurde das Maul an den Mundwinkel angeschnitten und beide Kieferhälften auseinandergedrückt. Danach wurde die Zunge weit distal abgeschnitten. Alle drei Organe wurden für 1d in 4%-PFA/PBS bei 4°C fixiert, anschließend dehydriert.

2.9 Histologische Methoden

2.9.1 Lösungen

| | |
|------------------------------|---|
| Acetat-Lösung: | 0,5% Natriumacetat, vor Gebrauch zu filtrieren |
| Alkaline phosphatase Puffer: | 5 M NaCl, 1 M MgCl ₂ , 0,1% Tween20, 1 M TrisHCl (pH 9.5) |
| Alzian-Blau: | 10g/l in 3% Essigsäure, pH 2,5 |
| Antikörper-Lösung: | anti-DIG FAB-Fragmente, AP-gekoppelt (Roche), 1:5000 in Block-Lösung, vor Verwendung 2 h bei 4°C präadsorbiert. |
| Block-Lösung: | 10% Blocking Reagenz (Boehringer/Ingelheim) in MAB, zum Lösen unter Rühren auf 50°C erhitzt. |
| BM-Purple: | (Roche) durch Zentrifugation (Beckman J6B, 5 min 5000 Upm) geklärt, mit 0,1% Tween-20, gelagert unter Lichtabschluss bei 4°C. |
| BrdU-Lösung: | 10 mg/ml 5-Bromo-2'-DeoxyUridin (BrdU) in 0,9%NaCl/0,007N NaOH in ddH ₂ O, die Lösung ist bei -20°C zulagern und vor Gebrauch stark zu schütteln |
| DAPI: | 0,5 mg/l in PBS, zu aliquotieren und bei -20°C zu lagern |
| DEPC-H ₂ O: | 100 µl/L DEPC in bidest. H ₂ O, über Nacht zu inkubiert, dann autoklaviert. |
| Hybridisierungslösung: | am Tag des Gebrauchs zum Prähybridisierungspuffer ca. 1 µg/ml DIG-markierte-RNA-Sonde zusetzen. |

| | |
|---|---|
| Glyzin: | 1 M Glyzin, pH 7-8 |
| Lösung A: | 2.5g Acid Fuchsin (Sigma Aldrich), 2.5g Xylidine ponceau (Sigma Aldrich) in 500ml 1% Essigsäure |
| Lösung B: | 5g Phosphomolybdc Acid (Sigma Aldrich) in 500 ml ddH ₂ O |
| Lösung C: | 10g Light green SF yellowfish (Fluka) in 5% Essigsäure |
| Lösung I: | 125 mL Formamid, 25 mL SSC (20 x) pH 7, 250 µL 0,1% Tween20 in 125 mL ddH ₂ O. |
| MAB-Lösung: | 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5, frisch anzusetzen. |
| MABT-Lösung: | MAB-Lösung + 0,1% Tween-20. |
| Offizinelle Salpetersäure: | 32ml 65%ige Salpetersäure zu 71ml ddH ₂ O |
| Orcein Stammlös.: | 0.1g Orcein in 100 ml 2% offizienlle Salpetersäure/70% Ethanol |
| PBS: | 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,7 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4, autoklaviert (für alle Schritte vor der Hybridisierung in DEPC-H ₂ O). |
| PBST: | PBS mit 0,1% Tween-20, vor Gebrauch frisch anzusetzen. |
| Pikro-Indigokarmin-Lös.: | 0.25g Indigokarmin () in 100ml gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung |
| Picro-Sirius Rot Färbisg. | 0.5g Direct Red 80 (Sigma-Aldrich) in 500 ml gesättigterPikrinsäurelösung |
| PFA/PBS: | 4% Paraformaldehyd in PBS, gelagert bei -20°C, pH 6-7. |
| PFA/Glutaraldehyd: | PFA/PBS mit 0,2% Glutaraldehyd, 0,1% Tween-20, pH-Wert mit HCl einstellen auf pH 6-7 (Indikatorpapier), frisch ansetzen. |
| Prähybridisierungspuffer (Gesamtembryonen): | 50% Formamid, 5x SSC pH 7, 0,1% Tween, 1x tRNA, in DEPC-H ₂ O gelagert bei -20°C. |
| RIPA | 10% SDS, 5 M NaCl, 1% NP40, 10% Deoxycholot, 0,5 M EDTA, 1 M TrisHCl pH 8.0 |
| RNAse -Lösung: | 5 M NaCl, 1 M TRIS.HCl pH 7,5, 0,1% Tween-20. |

| | |
|-------------------|---|
| SSC (20x) pH 7.0: | 3 M NaCl, 0,3 M Nacitrat, pH 7,0, autoklaviert. |
| TBS: | 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 |
| TBST: | TBS mit 0,5 % TritonX100 |

2.9.2 Paraffinschnitte

Dehydrierte Embryonen oder Gewebestücke wurden erst schrittweise bei RT in Isopropanol (50% MeOH/EtOH, EtOH, 50% EtOH/Isopropanol, je 1h, Isopropanol, ü.N.), dann bei 65°C in Paraffin überführt (Isopropanol, 25%, 50%, 75% Paraffin/Isopropanol, je 2h und 2x 100% Paraffin, 2h, ü.N.), in eine Einbettungsform überführt und ausgehärtet. Die Lagerung von Paraffinblöcken erfolgte eingewickelt in Frischhaltefolie bei 4°C. Angefertigte Paraffinschnitte (5 und 10µm, Mikrotom RM2155, Leica) wurden auf beschichtete Objektträger (SuperfrostPlus, Menzel) aufgezogen und ü.N. bei 42°C getrocknet. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bis zur Durchführung der Experimente bei RT.

2.9.3 Allgemeine Handhabung von Schnittpräparaten bei Färbungen

Nach der Rehydrierung von Gewebeschnitten war ein Austrocknen der Gewebe zu vermeiden. Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle Waschschrte in Glasküvetten mit entsprechenden Einsätzen für Objektträger durchgeführt. Bei Schritten, die unter Einsatz eines möglichst geringen Volumens durchgeführt werden mussten, wurden die Lösungen direkt auf die durch eine Fettstift (ImmEdgePen, VectorLabs) voneinander getrennten Schnitte auf dem Objektträger gegeben. Die Inkubation erfolgte in kleinen Kunststoff- Inkubationskammern. Sofern nicht anders gekennzeichnet fanden alle Schritte bei RT statt.

2.9.4 Hämatoxilin-Eosin-Färbung

Für diese Färbung wurden PFA-fixierte (siehe Abschnitt: 2.8.2.3) Embryonen/Gewebe verwendet. Die Paraffinschnitte wurden in Roti-Histol deparaffiniert (1x 10 min, 1x 5 min), in Ethanol/H₂O rehydriert (2x 100%, je 5min, 95%, 90%, 70%, je 2 min, 2x H₂O, 5 min), in H₂O gewaschen und mit Hämatoxilin gefärbt (45 sec). Nach dem Waschen in H₂O unter kontinuierlichem

Wasseraustausch, einer Inkubation in Natriumacetat-Lösung (0,5%, 1min) und erneutem Waschen (2x H₂O, je 1 min) schloss sich die Eosin-Färbung an (1% alkalische Eosin-Lösung, 1 min). Die Schnitte wurden dann unter kontinuierlichem Wasseraustausch gewaschen, dehydriert (100% Ethanol, 2x je 2 min), in Roti-Histol geklärt (2x, je 10 min) und mit Permout eingedeckt.

2.9.5 Sirius-Rot Färbung

Für diese Färbung wurden Paraffinschnitte PFA-fixierter Gewebe/Embryonen verwendet. Die Schnitte wurden deparaffiniert, rehydriert (siehe Abschnitt 4.8.2.3), in Picro-Sirius Rot Färbelösung inkubiert (1h), mit 0,05% Essigsäure gewaschen (2x 5 min), über eine Ethanolreihe dehydriert, in RotiHistol geklärt und mit Permout eingebettet.

2.9.6 Masson's Tri-Chrom Färbung

Für diese Färbung wurden Paraffinschnitte PFA-fixierter Gewebe/Embryonen verwendet. Die Schnitte wurden deparaffiniert, rehydriert (siehe Abschnitt 2.8.2.3), mit Hämatoxilin gefärbt (siehe Abschnitt 2.9.4), in Lösung A inkubiert (10 min), mit ddH₂O gewaschen (2 min) danach in Lösung B inkubiert (5 min). Nach dem Waschen mit ddH₂O (2 min) wurden die Paraffinschnitte in Lösung C inkubiert (10 min) und erneut mit ddH₂O gewaschen (2 min) und über eine Ethanolreihe dehydriert, in RotiHistol geklärt und mit Permout eingebettet.

2.9.7 Nachweis apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Assay

Der Nachweis apoptotischer Zellen auf 5 µm Paraffinschnitten erfolgt unter Verwendung des ApopTag Plus Fluorescein *in situ* Apoptosis Detection Kits (Chemicon International). Die gefärbten Schnitte wurden in Mowiol mit Zusatz von DAPI (0,5µg/ml) eingedeckt.

2.9.8 BrdU–Inkorporationsassay auf Paraffinschnitten

Schwangeren Mäusen wurden 100 µl BrdU-Lösung pro 10 g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Nach einer Inkubation von 1 h wurden die Mäuse getötet, die Embryonenentnommen, fixiert und in Methanol überführt (vgl. 2.8.2.3). Die

immunhistochemische BrdU-Detektion mit Zellkerngegenfärbung (DAPI) erfolgte auf 5 µm Paraffinschnitten wie unter 2.9.10.1 beschrieben. Der BrdU- Markierungsindex ergab sich aus dem Verhältnis aller BrdU-positiven Zellkerne zur Gesamtzellkernzahl in einer definierten Fläche.

Für die Detektion von proliferierenden Zellen in adulten Mäusen wurde ein etwas abgewandeltes Protokoll benutzt. Die Konzentration der BrdU-Lösung wurde halbiert und den Mäusen alle zwei Stunden intraperitoneal für einen Zeitraum von 8 h injiziert. Nach der letzten Injektion wurden noch weitere 2 h gewartet und die Tiere dann getötet und ihre Organe freipräpariert (vgl. 2.8.3).

2.9.9 Elektronenmikroskopische Analyse von Herz, Blase und Zunge adulter Tiere

Gewebeaufbereitung, Anfertigung von Ultradünnschnitten und elektronenmikroskopische Dokumentation wurden in Kollaboration mit Herrn Prof. Dr. Dr. Andreas Schmiedl (Zentrum für Anatomie, Medizinische Hochschule Hannover) durchgeführt. Für die Erstellung von Ultradünnschnitten wurden isolierte Herzen, Blasen und Zunge schnellstmöglich (beim Herzen unter 5 min.) freipräpariert und dann in einer 1,5 M Glutaraldehyd und 1,5 M PFA in 0,1 M Cacodylatpuffer in kleine ca. 1 mm² große Stücke geschnitten und ü.N. fixiert, gewaschen 4 % Saccharose in 0,1 M Cacodylatpuffer, postfixiert (1% Osmiumtetroxid, 2 h), dehydriert, in Epon eingebettet und geschnitten (60 nm). Die Schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert und mit einem Zeiss 902 Elektronenmikroskop analysiert.

2.9.10 Immunhistochemische und Immunfluoreszenzfärbungen

2.9.10.1 Paraffinschnitte

Für immunhistochemische Färbungen auf 5µm Paraffinschnitten wurden Vectastain Unmasking solution, das DAB Substrat Kit für Peroxidasen (VectorLabs) verwendet. Die Inkubation des primären Antikörpers (siehe 2.4) erfolgte i.d.R bei 4°C ü.N.. Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden 5 µm Paraffinschnitte deparaffiniert und rehydriert (siehe 2.9.3.2). Epitopdemaskierung erfolgte unter Verwendung von Vectastain Unmasking Solution (100°C, 15 min). Nach dem Waschen in PBST (2x 5

min) folgte der Block unspezifischer Proteinbindungen durch Inkubation mit geeignetem Normalserum (30 min, RT, 2,5% in PBST) und die Inkubation des primären Antikörpers (siehe 2.4, 4°C, ü.N.). Nach dem Waschen mit PBST folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1 h, RT), Waschen in PBST und das Eindecken in Mowiol (mit DAPI Zusatz, 0,5 µg/ml).

2.9.11 RNA *in situ* Hybridisierung

2.9.11.1 Paraffinschnitte

Das verwendete Protokoll ist abgeleitet aus Moorman *et al.*, 2001.

Alle Waschschritte wurden in sterilisierten Glasküvetten mit entsprechenden Einsätzen für Objektträger durchgeführt. Vor der Hybridisierungsreaktion wurden nur DEPC-behandelte Waschlösungen verwendet. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Waschschritte bei RT durchgeführt. Bei Arbeitsschritten wie Prä- und Hybridisierung, Antikörper- und Farbreaktion wurden die Lösungen direkt auf die durch eine Fettstift von einander getrennten Schnitte auf dem Objektträger gegeben. Die Objektträger wurden während dieser Inkubationsphasen in flachen Kunststoff-Inkubationskammern aufbewahrt, die wiederum in größeren Inkubationskammern gelegt wurden. Um Verdunstungsvorgänge und damit verbundene Konzentrationsschwankungen zu verhindern, wurden mit den entsprechenden Puffer- oder Wasch-Lösungen befeuchtete Papiertücher in diese Kammern gelegt und die Kunststoffkammern während der Hybridisierung zusätzlich mit Frischhaltefolie eingeschlagen.

10µm Paraffinschnitte wurden in Rotihistol deparaffiniert (2x, je 10 min), in Ethanol gewaschen (50%Roti-Histol/Ethanol, 2 min, 2x 100%, 2 min), in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert (Ethanol/DEPC-H₂O: 95%, 90%, 70%, 50%, je 1min), anschließend in PBS gewaschen (2x je 5min), in Proteinase K-Lösung (10 µg/ml in 0,1M TRIS.HCl, pH7,5 für 10 min bei 37°C) und Glycin/PBS (0,2%, 10 min, RT) inkubiert, in PBS gewaschen (2x je 5min) und in PFA/Glutaraldehyd-Lösung postfixiert (4%-PFA, 0,2% Glutaraldehyd, in PBS, 20 min, RT). Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde mit einem Fettstift (ImmEdge Pen, Vector) ein Kreis um die einzelnen Schnitte auf dem Objektträger gezogen und die Objektträger bis zur Prähybridisierung in PBS aufbewahrt. Nach der Prähybridisierung (15µl

Prähybridisierungspuffer pro Schnitt, 1h , 70°C) und Hybridisierung (10µl Hybridisierungspuffer pro Schnitt, ü.N. , 70°C) wurden die Schnitte kurz in 2xSSC eingetaucht (65°C), mit 50% Formamide/ 2x SSC (2x 25min, 65°C) und PBS-T (3x 5 min) gewaschen und nach einer Vorinkubation mit Block-Lösung (30µl pro Schnitt, 30min) mit dem alkalische-Phosphatase-konjugiertem anti-DIG-Antikörper inkubiert (20µl, 1:5000 in Block-Lösung, 2h, RT). Die Schnitte wurden anschließend in PBST gewaschen (3x 5min) und durch das Waschen in NTMT in den alkalischen pH-Bereich überführt (2x 5 min, RT). Die Inkubation mit der Färbelösung BM-Purple (40 µl pro Schnitt, RT) fand unter Lichtausschluss statt und wurde bei ausreichend starkem Signal durch das Überführen in PBS gestoppt. Nach einer Postfixierung in PFA (4%, 1h, RT) und anschließendem Waschen in PBS (2x 5 min) wurden die Schnitte mit Mowiol eingedeckt.

2.9.11.2 Gesamt Embryonen

Das Protokoll wurde eingesetzt zur Färbung von ganzen Embryonen, sog “whole mount *in situ* hybridization”, WISH). Sofern nicht anders vermerkt wurden alle Waschschrte in PBST für 3x 5 min bei RT durchgeführt. Bis zur Hybridisierung wurden alle Schritte in 2 ml Ependorfgefäßen durchgeführt, in späteren Schritten wurden 12-well Zellkulturplatten (Greiner) mit passenden Sieb-Einsätzen verwendet. Dabei fanden Lösungswechsel durch Versetzen der Siebe in eine Platte mit vorgelegter Lösung statt.

Die in Methanol bei –20°C gelagerten Embryonen wurden durch eine Methanol/PBS-Reihe rehydriert (75%, 50%, 25%, je 10min, RT) und in PBST gewaschen (2x 10 min, RT). Zur Verringerung von unspezifischer Färbung wurde mit Wasserstoffperoxid gebleicht (6% H₂O₂ in PBST, 1 h, RT), gefolgt von einem Waschschrte. Ausschließlich >10,5 Embryonen wurden mit Proteinase-K behandelt (10 µl/ml in PBST bei RT, 2 min) und daraufhin zur Inhibition der Protease in Glyzin/PBST gewaschen (2 mg/ml, 2x 5 min, RT). Nach erneutem Waschen wurden alle Objekte in PFA (4%)/Glutaraldehyd (0.2%) postfixiert (20 min, RT) und wieder gewaschen. Zur Prähybridisierung wurde einmal in Prähybridisierungspuffer gewaschen (5 min, RT) und dann in frischem Puffer im Hybridisierungssofen (Amersham) inkubiert (2h, 65°C, unter Schwenken). Pro Ansatz wurden 500 µl Hybridisierungslösung, mit 5-10 µl RNA (je nach Konzentration und Stärke der

Sonde) für 3 min bei 90°C denaturiert, für 1 min auf Eis abgekühlt und dann gegen den Prähybridisierungspuffer ausgetauscht. Hybridisiert wurde üN bei 70°C im Hybridisierungssofen (unter Schwenken).

Die Präparate wurden in vorgewärmtem Prähybridisierungspuffer gewaschen (2x 30 min, 65°C), und daraufhin zur Abkühlung auf RT gestellt. Vor der RNase-Behandlung wurden die Präparate in 1:1 Prähybridisierungspuffer/RNase-Lösung gewaschen (1x 5 min, RT) und dann in RNase-Lösung mit 100 µg/ml RNaseA inkubiert (2x 30 min, 37°C, unter Schwenken). Über Waschritte in 1:1 RNase-Lösung/Lösung I (5 min, RT) und Lösung I (5 min von RT auf 65°C bringen), folgten intensive Waschungen zur Entfernung von unspezifisch gebundener Sonde (2x 5 min, 3x 10 min, 1x 30 min und 5x 1 h, alle mit vorgewärmter Lösung I bei 65°C, unter Schwenken). Nach dem Abkühlen auf RT wurden schrittweise die Bedingungen zur Antikörper-Bindung eingestellt: 1x 5 min Lösung I/TBST, 2x 10 min TBST, 2x 10 min MABT (alle bei RT). Unspezifische Antikörperbindungsstellen wurden durch Inkubation in Block-Lösung abgesättigt (1 h, RT), dann folgte die Inkubation üN mit dem präadsorbierten anti-DIG-Antikörper (300 µl/well, 4°C).

Nach einer ausgedehnten Serie von Waschschritten in TBST (3x 5 min und 8x 1 h bei RT, sowie 1x üN bei 4°C) wurden die Präparate in PBS gewaschen (3x 20 min, RT) und dann in die Farbsubstrat-Lösung (BM-Purple, Roche) überführt und bei RT inkubiert. Bei Erreichen der gewünschten Farbintensität oder Einsetzen einer Hintergrundfärbung wurde die Reaktion durch Waschen in PBS gestoppt (3x 10 min, RT). Die Präparate wurden schließlich fixiert (4%PFA/PBS, 4°C, üN) und wenn nötig zur Klärung in 50% Glycerol überführt. Dazu wurde zuerst in PBT gewaschen und dann schrittweise die Glycerolkonzentration erhöht (30% und 50% Glycerol/PBT, je 1 d, bei RT auf dem Rollinkubator). Nach der Dokumentation wurden die Präparate bei 4°C gelagert.

2.9.12 Dokumentation

Schnittpräparate wurden mit einem Axioplan (Zeiss) oder DM5000 (Leica) Stereomikroskop dokumentiert. Für die konfokale Mikroskopie wurde das MikroskopTCS SP2 (Leica) verwendet. Für die Dokumentation von Gesamtembryonen, isolierten Innenohren und Übersichtsbildern von Schnittpräparaten wurde das Mikroskop Leica M420 mit FUJI Digitalkamera HC3002 verwendet. Eine Nachbearbeitung der digitalen Bilder erfolgte mit Photoshop CS.

2.10 Allgemeine Zellkultur Techniken

2.10.1 Lösungen

4x Probeauftragspuffer:

BRL Medium: Feeder Medium in denen BRL Zellen gewachsen sind

DMEM: Von GibcoBRL als Pulver bezogen

- mit L-Glutamin (frisch hinzugegeben)
- ohne Natriumpyruvat
- mit 4,5 g/l Glukose
- mit Pyridoxin

DAPI: 0,5 mg/l in PBS, zu aliquotieren und bei -20°C zu lagern

Desthiobiotin Elutionspuffer: 2 mM Desthiobiotin in H₂O

EDTA/Saline: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4mM KH₂PO₄, 0,537 mM EDTA

Elektroporationsmedium: 350 ml ES-Zellmedium, 150 ml BRL konditioniertes Medium, 1,5 ml Glutamax (100x), 1,5 ml Natriumpyruvat (100x), 10 µl LIF (10000 U/ml)

ES-Zellmedium: 15 % FCS, 100 µM 2-Mercaptoethanol (1000x), 1 mM Natriumpyruvat (100x), 2 mM Glutamax (100x), 0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren (100x), 10000 iU/ml Pen/Strep, 10000 U/ml LIF, in DMEM

Flag Elutionspuffer: Flag Peptid Vorratslösung wird 1:25 in TBS verdünnt (finale Konzentration 200 µg/ml)

Flag Peptid Vorratslösung: 4 mg Flag Peptid (Sigma Aldrich) werden in 800 µl TBS gelöst

Feeder Medium: 15 % FCS, 100 µM 2-Mercaptoethanol (1000x), 1 mM Natriumpyruvat (100x), 2 mM Glutamax (100x), 0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren (100x), 10000 iU/ml Pen/Strep, in DMEM

Freezing Medium ES: 10 % FCS, 10 % DMSO in ES Zellmedium

0,1 % Gelantine: 0,1 % Gelantine in H₂O

Lysierungspuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 80 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,1 % NP-40, Protease Inhibitor Cotail (Roche)

| | |
|-----------------------|---|
| Lysierungspuffer TAP: | TBS, 0,5 % (v/v) NP-40, 1 x Protease Inhibitor Cocktail (Roche), 1 x Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 (Sigma), 1 x Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (Sigma) |
| Mitomycin: | Mitomycin 2mg, 0,1 % DMSO, in PBS |
| PBS: | 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,7 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4, autoklaviert (für alle Schritte vor der Hybridisierung in DEPC-H ₂ O). |
| PBST: | PBS mit 0,1% Tween-20, vor Gebrauch frisch anzusetzen. |
| TBS: | 150 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl, pH 7,4 |
| TCA: | 10 % Tri-Chlor-Essigsäure |
| Trypsin: | 0,05 % Trypsin in 1x EDTA/Saline |
| Waschpuffer TAP: | TBS, 0,5 % (v/v) NP-40, 1 x Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 (Sigma), 1 x Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (Sigma) |

2.10.2 Kultivierung von adhärennten Monolayerkulturen

Die in dieser Arbeit verwendeten adhärennten Monolayerkulturen wurden in einer 10 cm² Kunststoffzellkulturplatte kultiviert. Um die *in vivo* Umgebungsbedingungen möglichst nahe zu simulieren, wurden die Zellen mit 8 ml Medium in einer mit Wasserdampf gesättigten CO₂-Atmosphäre (5 %) inkubiert. Die während der Kultivierung entstandenen Abfallprodukte wurden durch einen Mediumwechsel, der alle zwei Tage erfolgte, entfernt.

2.10.3 Subkultivierung von adhärennten Monolayerkulturen

Vor Beginn des Passagierens wurden das Medium und das Trypsin/EDTA auf 37 °C erwärmt. Das alte Medium wurde abgesaugt, und die Zellen wurden zweimal mit je 5 ml 1x PBS gewaschen. Nach dem Absaugen wurden 5 ml Trypsin auf die Zellen gegeben und für etwa 3 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Trypsin löst die Saccharidbindungen auf, die die Zellen zur Verankerung auf dem Flaschenboden gebildet haben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension mit

Medium im Verhältnis 1 : 2 verdünnt. Danach wurden die Zellen für 5 min bei 1000 Upm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels einer Vakuumpumpe abgesaugt. Das verbleibende Pellet wurde je nach Größe in 5 - 15 ml Medium resuspendiert.

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte anhand einer mikroskopischen Zählung in einer Neubauer-Zählkammer (siehe 4.10.5).

2.10.4 Kultivierung von Embryonalen Stammzellen

Bevor mir der ES-Zellkultur angefangen werden kann, müssen Feeder-Zellen aufgetaut werden. Sobald diese konfluent sind, werden sie 1:5 passagiert (s. 2.10.3). Damit die Feeder-Zellen als Untergrund für die ES-Zellen dienen können, müssen diese mit dem Wachstumsinhibitor Mytomycin behandelt werden. Dafür werden in eine vollgewachsene 150 cm Schale 100 µl Mytomycin gegeben und die Zellen für 2 h inkubiert. Danach konnte die 150 cm Platte auf 12-15 60 mm Platten aufgeteilt werden. Die so behandelten Feeder-Zellen können für bis zu 2 Wochen in einem Inkubator gelagert werden. 1 Gefäß mit ES-Zellen wurde schnellstmöglich in einem 37°C Wasserbad aufgetaut und auf eine 60 mm Schale mit Feeder-Zellen gegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Die ES-Zellen mussten sobald sie konfluent geworden sind 1:5 passagiert werden. Dazu wurde das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Nachdem sich die Feeder-Zellen langsam vom Boden der Platte abgelöst hatten, wurde ca. 3 ml Medium hinzugegeben und die Zellsuspension auf neue, mit Feeder-Zellen bedeckte Zellkulturschalen, überführt.

Zum einfrieren von ES-Zellen mussten diese mit Trypsin inkubiert werden, bis sich vom Boden der Zellkulturplatte gelöst hatten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ES-Zellmedium gestoppt und danach für 3 min bei 1000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Freezing-Medium resuspendiert und in ein Cryovial überführt.

Ein Tag vor der Elektroporation (s. 2.10.7.4) mussten 10x 100 mm Zellkulturplatten mit Gelantine überzogen werden. Nach der Elektroporation (s. 2.10.7.4) wurden die elektroporierten ES-Zellen in Elektroporationsmedium (EP) überführt und auf die vorher mit Gelantine behandelten Platten verteilt. Nach 24/48 h wurde das EP

Medium durch EP Medium mit Selektionsdruck (G418/HAT) ausgewechselt. Danach wurde das Selektionsmedium alle paar Tage, je nach der Menge an toten Zellen, gewechselt. Nach ca. 2 Wochen sind einzelne Kolonien sichtbar gewesen und konnten gepickt werden. Dafür wurde eine 96 well Platten mit Feeder-Zellen bedeckt. Das Feeder-Medium wurde entfernt und die ES-Zellen dort hin überführt. Danach wurden die Zellen mit Trypsin behandelt um die ES-Zellkolonien zu separieren. Die so separierten Zellen wurden mit Selektionsmedium versetzt. Falls anstelle von G418 HAT als Selektionsdroge benutzt wurde, wurde dieses durch HAT (1:100) ausgewechselt. Die Selektion wurde für 6 Tage aufrechterhalten. Nach den 6 Tagen wurde der Selektionsdruck zunehmend verringert. Über einen Zeitraum von 4 Tagen wurde der Selektionsdruck auf eine Verdünnung von HAT (1:400) verringert. Nachdem die 96 well Platte zugewachsen war, wurden die Zellen auf eine 24 well Platte überführt. Nach 2-3 Tagen war die Zellen auf der 24 well Platte konfluent und konnten dupliziert werden. Eine Platte wurde weggefroren und die zweite Platte für die DNS Extraktion benutzt.

2.10.5 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden zunächst 25 µl der Zellsuspension mit 25 µl Trypanblau (Stocklösung 0,5 % in 100 ml NaCl/K₂PO₄) vermischt und für 1 min bei RT inkubiert. Das Prinzip dieser Vitalfärbung beruht auf der Aufnahme des Farbstoffes Trypanblau durch die permeabel gewordenen Zellmembranen von toten Zellen. Die Membran ist intakt eine natürliche Barriere für diesen Farbstoff. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 25 µl der Suspension in eine vorbereitete Zählkammer gefüllt. Es wurden nur die angefärbten, lebenden Zellen gezählt. Durch diese Methode sind tote Zellen farblich abgrenzbar von lebenden.

Zur Vorbereitung der Zellzählung wurde ein Deckgläschen auf eine Neubauer-Zählkammer gedrückt bis die Newtonschen Ringe zu sehen waren. Dieses Erkennungsmerkmal signalisierte, dass die gewünschte Spaltbreite von 0,2 mm zwischen Deckglas und Kammer erreicht war.

Die Zählkammer besteht aus 16 Großquadraten, die wiederum in 16 Kleinquadrate aufgeteilt sind. Bei einer Fläche von je 1 mm² und einer Tiefe von 0,2 mm ergibt sich ein Volumen von 0,2 µl pro großes Quadrat. Ausgezählt wurden jeweils vier

Großquadrate, die sich zueinander auf einer Diagonalen befanden. Zellen, die auf dem oberen oder linken Rand lagen, wurden beim Zählen nicht berücksichtigt. Beim rechten und unteren Rand wurden alle Zellen bis zur mittleren der drei Begrenzungslinien gezählt. Von den vier Quadraten wurde der Mittelwert berechnet und zur Bestimmung der Zellzahl in folgende Formel eingesetzt:

$$Z = \frac{n}{N} \times 2 \times V$$

Z: Gesamtzellzahl

V: Ausgangsvolumen

N: Anzahl der ausgezählten Großquadrate

n: gezählte Zellzahl

2.10.6 Kryokonservierung von Zellkulturen

Einfrieren:

Das Einfrieren dient der langfristigen Lagerung von Zellen unter Erhalt ihrer Lebensfähigkeit. Die Vorbereitung der Zellen erfolgte analog zu 2.10.3. Nach dem Sedimentieren wurden die Zellen in ihrem Wachstumsmedium resuspendiert. Mittels Trypanblaufärbung wurde die Zellzahl bestimmt. Das Einfrieremedium war das entsprechende Wachstumsmedium, das zusätzlich 10 % DMSO und 10 % FKS enthielt. DMSO verhindert die Wasserkristallbildung im Inneren und Äußeren der Zelle und bewahrt die Zellen vor Membranschäden. Es wurden je 1 Million Zellen in einem Volumen von 1 ml in ein beschriftetes Kryoröhrchen pipettiert. Die Zellen wurden über Nacht auf -80 °C abgekühlt. Am nächsten Tag wurden die Kryogefäße in den Stickstofftank (-150 °C) überführt.

Auftauen:

Die benötigten Zellen wurden aus dem Stickstofftank genommen und direkt bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Sobald die Zellsuspension vollständig flüssig war, wurde das gesamte Volumen auf eine 15mlGefäß mit 4 ml vorgewärmtem Wachstumsmedium gegeben. Die Zellen wurden im Brutschrank über Nacht kultiviert. Damit die restlichen DMSO Rückstände die Zellen nicht schädigen konnten,

erfolgte am darauf folgenden Tag ein Medienwechsel. Sobald eine Konfluenz von 80 - 90 % erreicht wurde, konnten die Zellen in eine 100 cm² Flasche überführt werden. Alle Zellarten konnten, sobald sie die gewünschte Dichte erreicht hatten, für Versuche verwendet werden.

2.10.7 Transfektion

2.10.7.1 CaPO₄ Transfektion

Am Vortag wurden jeweils 5×10^5 Zellen auf eine 10 cm² Zellkulturplatte ausgesät. Für die nachfolgende Transfektion wurden 5 µg Plasmid eingesetzt. Hierfür wurde die DNS in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß vorgelegt und mit 438 µl serum- und antibiotikafreiem Medium verdünnt. Nach Zugabe von 63 µl CaCl erfolgte ein kurzes Durchmischen mit Hilfe eines Vortexers. Danach wurde 2x HBS hinzugegeben und nochmals kräftig gevortext. Die Komplexbildung erfolgte in der anschließenden zehnminütigen Inkubationszeit bei RT. Im Anschluss an die Inkubation wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion analysiert

2.10.7.2 Fugene 6 & HD

Ein Tag vor der Transfektion wurden die Zellen so in Zellkulturplatten ausgesät, dass sie eine Konfluenz von 50-70% am folgende Tag. Am Tag der Transfektion wurde das Medium ca. 2 Stunden vor der Transfektion gewechselt. Die Zellen wurden mit Fugene6 oder Fugene HD nach Herstellerangaben transfiziert.

2.10.7.3 Lipofectamine 2000

Ein Tag vor der Transfektion wurden die Zellen so in Zellkulturplatten ausgesät, dass sie eine Konfluenz von 50-70% am folgende Tag. Am Tag der Transfektion wurde das Medium ca. 2 Stunden vor der Transfektion gewechselt. Die Zellen wurden mit Lipofectamin 2000 nach Herstellerangaben transfiziert.

2.10.7.4 Elektroporation

Für die Elektroporation von ES Zellen wurden 20 µg linearisierte und aufgereinigte DNS eingesetzt. Ein Tag vor der Elektroporation wurden 10 x 100mm Platten mit 0,1 % iger Gelatine bedeckt. Für die Elektroporation wurden ca. 5 fast konfluente 60 mm Platten genommen. Durch die Behandlung mit Trypsin wurden die ES Zellen von den Platten gelöst und in ein 50 ml Gefäß überführt. Das Gefäß wurde bei 1000 Upm für 3 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 30 ml PBS gelöst. Die Lösung wurde wieder zentrifugiert (1000 Upm, 3 min) der Überstand verworfen und das Pellet in 700 µl EP-PBS (Elektroporations-PBS) gelöst. Die Lösung wurde in eine Elektroporationsküvette vorgelegt und mit der DNS-Lösung versetzt. Nach mehrmaligem auf und ab pipettieren konnte die Küvette in den Elektroporator (Bio Rad Gene Pulser) gestellt werden. Es wurden die folgenden Einstellungen benutzt: 0,240 kV, 500 µF, High Cap. Nach der Kalibrierung des Gerätes wurden die ES-Zellen elektroporiert. Die Zellen wurden in 10 ml Elektroporationsmedium überführt und auf die im Vorfeld mit Gelatine beschichtet 90 mm Platten verteilt.

2.11 Proteinbiochemische Methoden

2.11.1 Quantifizierung des Proteingehalts mittels BCA Protein-Assay

Die Proteinmenge der in Lysispuffer aufgenommenen Zellen wurde mittels des BCATM Protein Assay Kit gemessen. Es wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen.

2.11.2 Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran

2.11.2.1 SDS-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen anhand ihrer molaren Masse erfolgte mittels denaturierender, diskontinuierlicher SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli. Hierfür wurde zu Beginn des Versuches ein 10 % iges Polyacrylamidgel gegossen. Nach einer gründlichen Reinigung mit 70 % igem EtOH wurden die Abstandsplatte und die Deckplatte mit Hilfe einer Halterung fixiert und in den Gießstand eingespannt. Anschließend wurde die Gellösung für das Trenngel in einem Erlenmeyerkolben vorbereitet und nach Zugabe aller Bestandteile vorsichtig in die Gelkassette gegossen. Damit sich während der Polymerisation eine glatte Grenzfläche ausbilden

konnte, erfolgte eine Überschichtung der Trenngellösung mit 100 % igem Isopropanol. Nach einer Polymerisationszeit von etwa 20 min wurde der Alkohol vollständig entfernt. Anschließend wurde die Gellösung für das Sammelgel vorbereitet und bis zum oberen Rand in die Gelkassette gefüllt. Sofort wurde die Schablone für die Probenaschen eingesetzt. Nach einer weiteren Polymerisationszeit von etwa 20 min konnte das Gel für die Elektrophorese verwendet oder bei 4 °C über einen kurzen Zeitraum gelagert werden.

Die Proben wurden im Verhältnis 1 : 4 mit einem 4x Probenpuffer gemischt und für fünf Minuten bei 95 °C inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die Gelkassette entsprechend den Herstellerangaben in die Elektrophoreseapparatur eingespannt. Nach dem Befüllen mit 1x SDS Laufpuffer konnten die Proben inklusive einer Proteingrößenleiter in die entsprechenden Probenaschen pipettiert werden. Die Aufkonzentrierung der Proteine erfolgte im Sammelgel bei 70 V. Sobald die Bromphenolblau-Front das Trenngel erreicht hatte, konnte die Spannung auf 90 V erhöht werden. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Proteingrößenleiter die gewünschte Auftrennung zeigte. Die Gele wurden aus der Apparatur herausgenommen, und das Sammelgel wurde entfernt. Die Gele wurden entsprechend der Fragestellung weiterbearbeitet.

2.11.2.2 Western Blot

Die Vorbereitung des Gels erfolgte wie in 4.11.2.1 beschrieben. Für den Transfer wurde eine Nylonmembran der Firma Millipore verwendet, die kurz in 100 % igem Methanol und anschließend in kaltem 1 x Transferpuffer geschwenkt wurde. Nachdem das Gel kurzzeitig mit demselben Puffer benetzt wurde, konnte die Blotapparatur entsprechend den Herstellerangaben zusammengebaut werden. Der Transfer erfolgte für 1 h bei einer konstanten Spannung von 25 V und einem Strom von 150 mA bei RT. Nach Ablauf der Zeit wurde die Membran für 20 min bei RT in 5 % Magermilch inkubiert. Die anschließende Inkubation mit dem verdünnten, primären Antikörper (s. Tab. 1) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Membran für jeweils zehn Minuten dreimal mit 1x PBT Puffer gewaschen. Die nachfolgende Inkubation mit dem sekundären Antikörper (s. Tab. 1) erfolgte für 1 h bei RT auf der Wippe. Der anschließende Waschschrift erfolgte in 1x PBT.

Für die Detektion der Banden wurden die Membranen anschließend in einer ECL Lösung für 1 min inkubiert und anschließend in einer Filmkassette durch auflegen eines Filmes bis zur gewünschten Intensität entwickelt.

2.11.3 TAP Tag Aufreinigung

Die Vorkultivierung der Zellen (siehe 2.10.3) und die darauffolgende Transfektion erfolgten wie in 2.10.7 beschrieben. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen 1 x mit warmen PBS gewaschen. Die Lyse der Zelle fand mit 1 ml TAP Lysierungspuffer statt. Nach der Inkubation für 15 min auf Eis, wurden die Zellen für 10 min bei 10000 x g auf 4°C, zentrifugiert. Während dieser Zeit wurden die Strep-Tactin Superflow Kugeln zweimal gewaschen. Einmal mit dem 4 fachen Volumen TBS und einmal mit dem 4 fachen Volumen TAP Lysierungspuffer. Danach wurde der Überstand für 1 h bei 4°C mit den Strep-Tactin Superflow Kugeln inkubiert. Um die Kugeln vom Überstand zu trennen, wurden die Kugeln bei 7000 x g für 30 sec zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstands wurden die Kugeln 3 x mit 500 µl Waschpuffer gewaschen. Zum Eluieren der gebundenen Proteine wurden den Kugeln 500 µl Desthiobiotin Elutionspuffer beigefügt und für 10 min inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren des Überstands wurden 25 µl vorher gewaschene anti-Flag M2 Kugeln (3 x mit dem 4 fachen Volumen) zu dem Überstand hinzugegeben und für 1 h bei 4°C auf einem Überkopffrotor inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren der Kugeln wurden diese einmal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend zweimal mit TBS. Zur Eluierung der Proteine wurde die Kugeln mit dem 4 fachen Volumen FLAG Eluierungspuffer für 10 min inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren der Kugeln (10 sec bei 2000 x g) konnten die Überstände gesammelt werden und die Proteine gefällt werden.

2.11.4 TCA Fällung

Zu den Proben wurden 100 µl 10% ige TCA hinzugefügt (1:1) und auf Eis für 10 min inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren bei 4°C wurden das Pellet mit eiskaltem 100 % igem Alkohol gewaschen. Dann wurde erneut bei 4 °C für 20 min (13000 Upm) zentrifugiert.

2.11.5 Probenvorbereitung für MASDAQ Analyse und Durchführung

Die Vorkultivierung der Zellen (s. 2.10.3) und die anschließende Proteinbestimmung erfolgte wie in 4.11.1 beschrieben. Für die MASDAQ Analyse wurde der unter 2.11.5 beschriebene Versuch expandiert, und für jeden Ansatz wurden 4 x 15 cm² Zellkulturplatten verwendet. Nach erfolgter Auftrennung (s. 2.11.2.1) wurden die Proteine mittels kolloidalen Coomassiefärbung detektiert. Hierfür wurde das Gel für eine Stunde in 40 % Ethanol und 10 % Essigsäure bei RT unter leichtem Schütteln fixiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschriffe für jeweils zehn Minuten mit ddH₂O. Die Färbung des Gels wurde üN bei RT auf dem Schüttler durchgeführt. Zum Entfärben wurde das Gel am nächsten Tag mit 1 % Essigsäure so lange inkubiert, bis alle überschüssigen Coomassie Partikel entfernt waren. Die einzelnen sichtbaren Banden wurden ausgeschnitten und für die Massenspektrometrie weiterverarbeitet.

2.11.6 Immunpräzipitation

Die Vorkultivierung der Zellen (s. 2.10.3) und die anschließende Proteinbestimmung erfolgte wie in 2.11.1 beschrieben. Für die nun nachfolgende Immunpräzipitation wurden 500 µg Proteinlysate eingesetzt und auf ein Volumen von 500 µl mit NP40 Puffer aufgefüllt. Es folgte eine Vorklämung der Proteinmischung mit Sepharosekugeln. Anschließend erfolgte die zweistündige Antikörperinkubation bei 4 °C auf dem Rotierer. Danach wurden zu jeder Probe 30 µl Sepharoseträger gegeben. Je nach Antikörper wurden entweder G-Sepharosekugeln (Maus) oder A-Sepharosekugeln (Kaninchen) verwendet, die vor der Zugabe dreimal mit NP40 Puffer gewaschen wurden. Die Proben wurden für eine weitere Stunde auf dem Rotierer inkubiert. Anschließend folgten drei Waschschriffe mit jeweils 1 ml NP40 Puffer. Zur Sedimentation der Sepharosekugeln wurden die Proben für 1 min bei 1000 Upm bei 4 °C zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschriff wurde der komplette Überstand entfernt und die Proben in 10 µl 4x Probenpuffer aufgenommen. Nach einer anschließenden zehnminütigen Inkubation bei 95 °C konnten die Ansätze auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und analysiert werden.

2.11.7 Antikörperherstellung

2.11.7.1 Proteinexpression in Bakterien

Für die Expression in Bakterien wurde die Wildtyp- (WT) und Deletionsmutante (delta.F-Box) Variante von Fbxl22 in den bakteriellen Expressionsvektor pGEX kloniert (s. 2.5.2). Nach Bestätigung der fehlerfreien Sequenz konnte das Plasmid in chemisch kompetente BL21 Zellen transformiert werden (s. 2.5.2).

Zur Austestung der optimalen Induktionszeiten und Konzentration des IPTGs wurden unterschiedliche Ansätze ausgetestet. Für dieses Konstrukt wurde eine optimale Induktionszeit von 12 Stunden bei 16 °C und eine Konzentration von 2 mM IPTG ermittelt.

2.11.7.2 Proteinaufreinigung mittels Elektroelution und Konzentrierung

Die induzierte Probe wurde mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese (s. 2.11.2.1) auf einem 20 cm x 16 cm x 0,5 cm Gel aufgetrennt. Für die Proteinfällung wurde das Gel mehrere Minuten in eiskaltem 3 M KCl geschwenkt. Die Bande, die dem induzierten Protein entspricht, wurde mittels Skalpell ausgeschnitten und in eine 10 ml Spritzeüberführt. In der Zwischenzeit wurde ein Dialyseschlauch auf die Breite einer Elektrophoresekammer zugeschnitten und mehrmals mit 1x TBE Puffer gespült.

Die Aufkonzentrierung der Proben erfolgte mittels einer kommerziell erhältlichen Membran von Millipore (Amicon Pure). Der Ausschlussgrad wurde entsprechend der zu erwartenden Proteingröße gewählt. Hierfür wurden 15 ml von der aufkonzentrierenden Lösung auf den Filter gegeben und für 15 min bei 4 °C und 4 000 Upm in einer Beckmann Zentrifuge zentrifugiert. Das hierbei übrig bleibende, eingeeengte Volumen wurde mittels einer 200 µl Pipette in ein Eppendorfgefäß überführt. Der Zentrifugationsschritt wurde so lange wiederholt, bis das gewünschte Volumen bzw. die gewünschte Endkonzentration erreicht wurde.

Für die Immunisierung wurden 4 ml der Probe mit einer Konzentration von 1 mg/ml zu Sigma geschickt. Nach fünf Immunisierungsschritten wurden die Kaninchen ausgeblutet, und das so erhaltene Serum konnte für die Affinitätsaufreinigung zur Optimierung des Antikörpers (s. 2.11.7.3) verwendet werden.

2.11.7.3 Affinitätsaufreinigung von Antikörpern

Zu Beginn des Experiments wurde 1 g CNBr aktivierte Agarose in ein 50 ml Polypropylenröhrchen eingewogen und mit 50 ml 1 mM HCl gemischt. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 4 000 Upm. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 ml Borsäure (pH 8,3) zum Pellet. Nach kurzer Durchmischung wurde die Probe für 5 min bei 4 000 Upm zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden 2,7 mg Protein in 1 ml 1x PBS gelöst und anschließend zusammen mit weiteren 10 ml 1x PBS zum Pellet gegeben. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei 4 °C auf dem Rotierer. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Probe erneut zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 ml kaltem 0,1 M Natriumacetat pH 4,0/ 0,5 M NaCl. Nach dem nun folgenden Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 50 ml kaltem 0,1 M Tris pH 8,0/ 0,5 M NaCl gewaschen und erneut zentrifugiert. Der nächste Waschschrift erfolgte mit 50 ml kaltem 0,1 M Glyzin pH 2,3. Das Pellet wurde nach dem folgenden Zentrifugationsschritt in kaltem 1x PBS erneut gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 10 ml resuspendiert und dabei in ein 15 ml PP- Röhrchen überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden 3 ml aufgetautes Antiserum auf das Sepharosepellet gegeben. Die Probe wurde anschließend über Nacht bei 4 °C auf dem Rotierer inkubiert. Am nächsten Tag wurde frischer Puffer A angesetzt. Nach dem Abzentrifugieren der Probe wurde der Überstand bei 4 °C gelagert und das Pellet mit 14 ml kaltem Puffer A gewaschen. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Das Sepharosepellet wurde anschließend mittels 14 ml Puffer A auf eine Säule transferiert. Es folgte ein zweimaliger Waschschrift mit 1x PBS. In der Zwischenzeit wurden 10 Eppendorfgefäße mit jeweils 50 µl 1 M Tris pH 9,5 gefüllt und auf Eis zum Abkühlen gestellt. Nachdem die Säule verschlossen wurde, erfolgte die Elution mit 5 ml Glyzin pH 2,3. Es wurden jeweils 500 µl Fraktionen aufgefangen und nach sofortigem Mischen zu 4°C gestellt. Die Säule kann nach viermaligem Waschen mit 50 mM Tris pH 7,5 in 50 mM Tris pH 7,5/ 0,02 % Natriumazid bei 4 °C bis zum nächsten Gebrauch gelagert werden.

Die aufgefangenen Fraktionen 1 – 9 können auf einem 10 %igem SDS-Gel nach dem Elutionshöhepunkt hin überprüft werden.

3 Experimente und Ergebnisse

3.1 Analyse der Expression der *Fbxl* Familie

3.1.1 Expressionsanalyse aller *Fbxl* Gene

Da bisher nur wenig über die *F-Box*-Gene bekannt ist, wurden in dieser Arbeit die verschiedenen *F-Box*-Gene der *Fbxl* Untergruppe auf ihre Expression hin untersucht. Dazu wurde eine Expressionsanalyse aller bekannter Maus *Fbxl* Gene auf ganzen Embryonen des Alters E10,5 mittels RNA *in situ* Hybridisierung durchgeführt. Die *F-Box*-Gene *Skp2*, *Fbxl4*, *Fbxl7*, *Fbxl8*, *Lrrc29*, *Kdm2b*, *Fbxl12*, *Fbxl13*, *Fbxl15*, *Fbxl20*, *Fbxl21* wiesen ein ubiquitäres Expressionsmuster auf (s. Abb. 6A,D,G,H,I,J,K,L,N,Q,R). Die *F-Box*-Gene *Fbxl3*, *Fbxl5*, *Fbxl6*, *Fbxl14*, *Fbxl17*, *Fbxl19* waren zu diesem Entwicklungszeitraum in keinem Gewebe exprimiert (s. Abb. 6C,E,F,M,O,P). *Fbxl2* war im 10,5 d *p.c.* Embryo ubiquitär exprimiert mit Ausnahme des Herzens (s. Abb. 6B). Das Gen *Fbxl22* hingegen zeigte eine spezifische Expression im Herzen (s. Abb. 6S). Der Einflusstrakt, das ist der Bereich des embryonalen Herzens, in dem das Sauerstoff arme Blut in das Herz fließt, zeigte eine starke Expression. Eine weitere Expressionsdomäne war das Atrium, der Vorhof des Herzens, sowie der Ventrikel, die Hauptkammer des Herzens. Der Ausflusstrakt, der Bereich aus dem das Blut aus dem Herzen herausfließt, zeigte auch spezifische Expression (siehe Abb. 6S). Eine weitere Expressionsdomäne stellten die anterioren Somiten dar (siehe Abb. 6S).

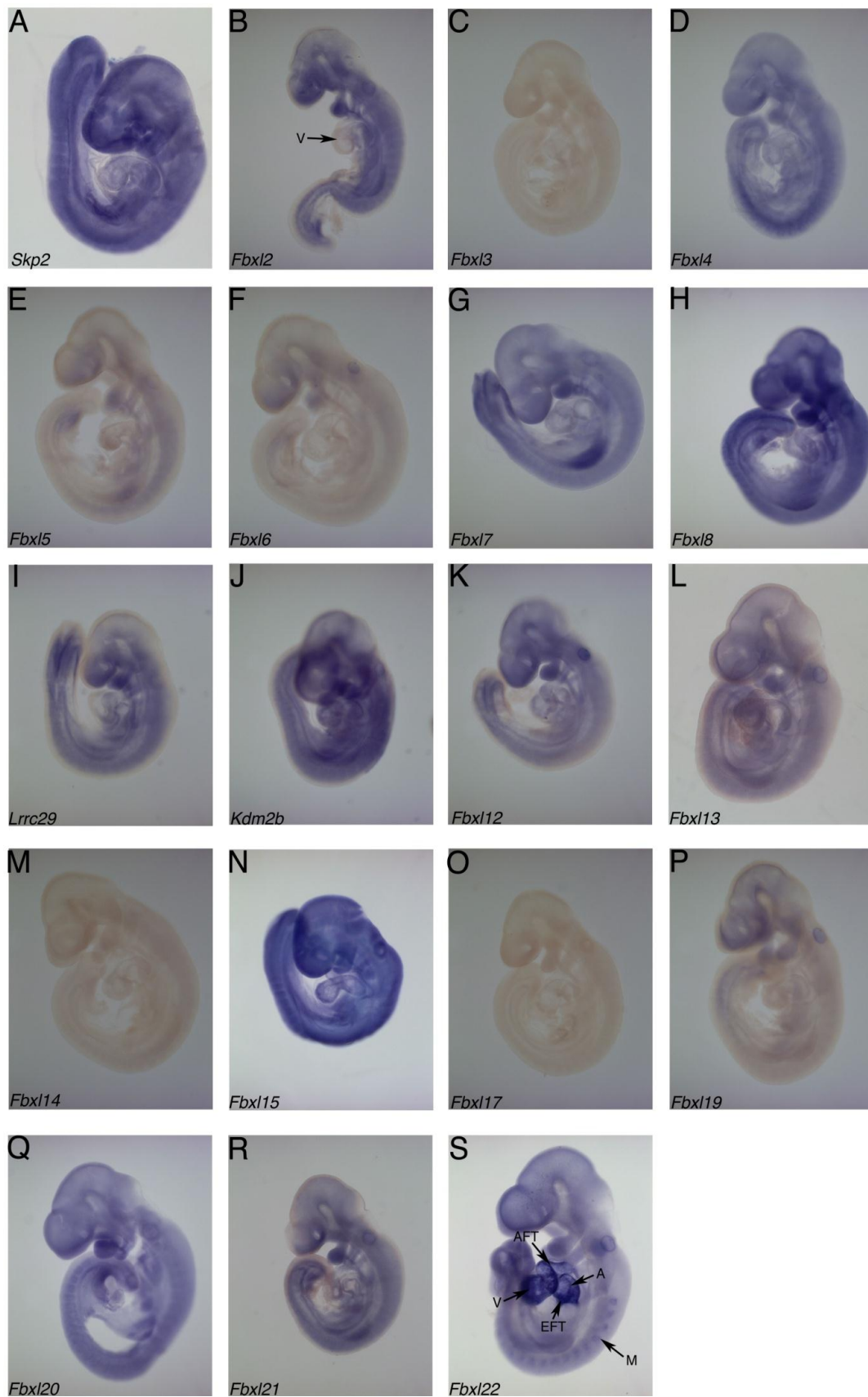


Abbildung 6: Expression der *FbxI*-Familie in ganzen Mausembryonen bei 10,5 d.p.c.

Expression der *F-Box*-Gene *Fbx1*-22 in E10,5 alten ganzen Embryonen (A-S). Zwei Gene zeigen spezifische Expressionsmuster. Während *Fbx122* (S) im Herzen und im Myotom exprimiert ist, zeigt *Fbx12* (B) ein ubiquitäres Expressionsmuster mit Ausnahme des Herzens. V = Ventrikel; A = Atrium; EFT = Einflusstrakt; AFT = Ausflusstrakt; M = Somiten

3.1.2 Analyse der Expression des Gens *Fbxl22*

Aufgrund der spezifischen Expression von *Fbxl22* wurde eine weiterführende Expressionsanalyse im Embryo während der embryonalen Entwicklung durchgeführt. Dafür wurden *in situ* Hybridisierungsexperimente an ganzen Embryonen gemacht. Am Tag E7,5 entstehen erstmals mesodermalen Zellen, die aus dem Primitivstreifen kommen und zum späteren Herzen beitragen. Diese Zellen migrieren entlang der anterioren ventralen Seite des Embryos und bilden ein symmetrisches Herzfeld, die sogenannte kardiogene Sichel. Zu diesem Zeitpunkt konnte keine Expression von *Fbxl22* in der kardiogenen Sichel detektiert werden (s. Abb. 7A,B). Um den Tag E8,0 treffen sich die Zellen in der Mittellinie des Embryos, wo sie fusionieren und den linearen Herzschlauch bilden. Der lineare Herzschlauch lässt sich in drei Bereiche unterteilen: dem Einflusstrakt, den primitiven Ventrikel und den Ausflusstrakt. Die Expressionsanalyse zeigte in allen drei Kompartimenten starke Expression von *Fbxl22* (s. Abb. 7C,D). Zwischen den Tagen E8,5 und E9,5 beginnt das Herz eine komplizierte morphologische Verwindung durchzuführen. Während der Verwindung rückt der Einflusstrakt nahe an den Ausflusstrakt. Am Tag E9,5 ist die Verwindung abgeschlossen. Zu diesem Zeitpunkt war *Fbxl22* im Einflusstrakt, dem Ventrikel, dem Atrium und Ausflusstrakt zu detektieren (s. Abb. 7E). Zusätzlich zu den Bereichen im Herzen entsteht eine neue Expressionsdomäne. Die anterioren Somiten, genauer gesagt der myotomale Bereich der Somiten, zeigten eine schwache Expression (s. Abb. 7E) (A. Moon 2008). Das Myotom ist der Ausgangspunkt für die Rumpf- und Gliedmaßenmuskulatur. Am Tag E10,5 erstreckt sich die Expression von *Fbxl22* über alle Somiten. Die Expression im Ventrikel verblieb stark, während sie im Atrium und Ausflusstrakt schwächer wurde (s. Abb. 7F). Ab dem Tag E10,5 beginnt die Separierung der Atrien und der Ventrikel, sowie ein Umbau des Ausflusstrakt aus dem sich dann die Aorta und die Pulmonalarterie bilden (High & Epstein 2008). Am Tag E11,5 bleibt die Expression in den Somiten bestehen. Im Ventrikel war zu diesem Zeitpunkt noch eine schwache Expression zu detektieren (s. Abb. 7G).

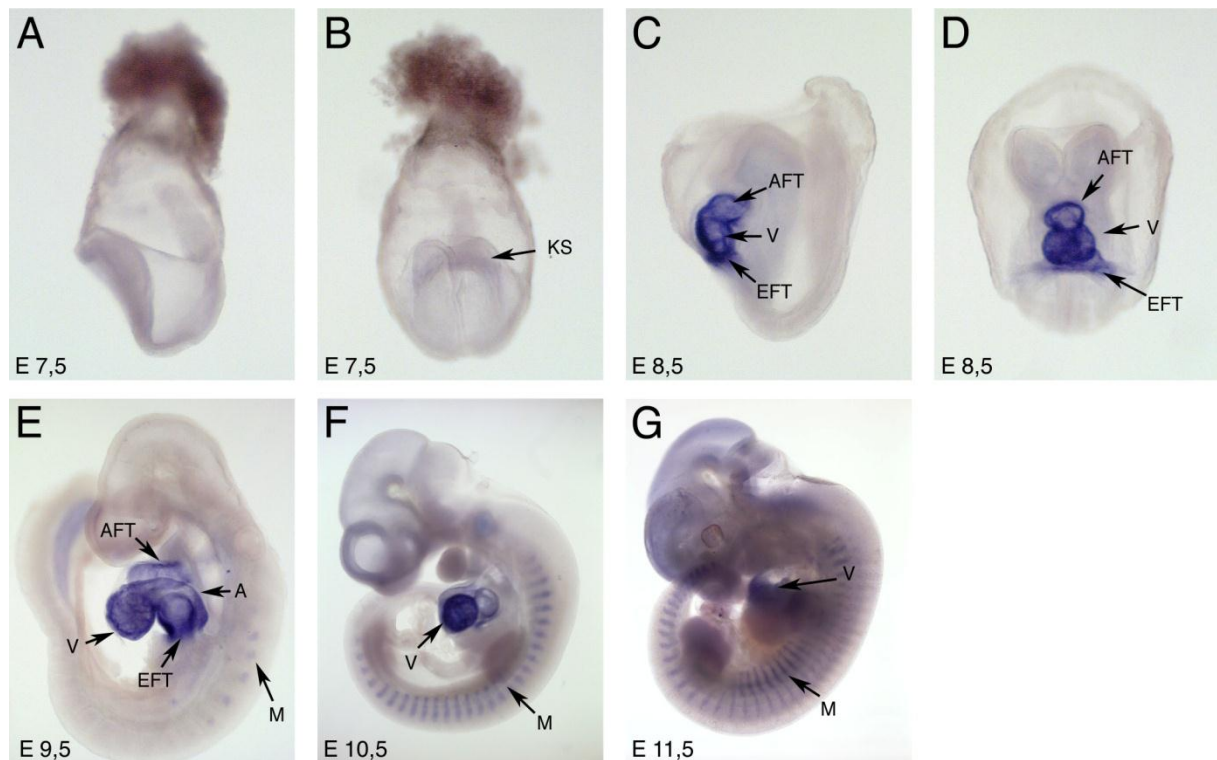


Abbildung 7: *Fbx122*-Expression im zeitlichen Verlauf auf ganzen Embryonen.

7,5 d *p.c.* Embryo, der für *Fbx122* gefärbt wurde (A, laterale Ansicht; B, frontale Ansicht). Zu diesem Zeitpunkt ist keine Expression erkennbar. Die Bilder C und D zeigen einen 8,5 d *p.c.* alten Embryo (C, laterale Ansicht; D, frontale Ansicht). *Fbx122* ist im linearen Herzschlauch in den Bereichen des EFT, V und AFT exprimiert. (E), 9,5 d *p.c.* Embryo. *Fbx122* ist weiterhin im Herzen in den Bereichen AFT, V, EFT, und nun auch im A und schwach im M exprimiert (s. Pfeile). (F), 10,5 d *p.c.* Embryo. Die Expression ist weiterhin stark im V und im M wird jedoch im A schwächer. (G), 11,5 d *p.c.* Embryo. Die Expression nimmt weiterhin ab. Die Expression ist jetzt nur noch leicht im V zu erkennen bleibt jedoch gleichstark im M. KS = Kardiogene Sichel; AFT = Ausflusstrakt; V = Ventrikel; EFT = Einflusstrakt; A = Atrium; M = Myotom

Um die zelluläre Verteilung besser auflösen zu können, wurden Gewebeschnitte vom Herzen verschiedener Stadien angefertigt und auf ihre Gewebe spezifische Expression von *Fbx122* hin untersucht. Während der Herzentwicklung differenziert das Myokard in zwei distinkte Gewebe. In eine Kompaktzone und in eine innere trabekulären Zone, welche sich sowohl morphologisch als auch genetisch von der Kompaktzone unterscheidet. Die Trabekel formen sich aus einem Blatt ähnlichen Auswuchs aus dem ventrikulären Myokard. Die Trabekel selbst bestehen aus einer inneren myokardialen Schicht und einer äußeren endokardialen Schicht (High & Epstein 2008). Am Tag E9,5 exprimieren *Fbx122* sowohl myokardiale Zellen des Kammermyokards, der sich entwickelnden Trabekel sowie myokardiale Zellen des Atriums (s. Abb. 8A). Während der frühen kardiogenen Morphogenese entsteht eine Grenze zwischen der arteriellen und der ventrikulären Region im Herzen, die als atrioventrikulärer Kanal bezeichnet wird. An diesem Kanal bilden sich endokardiale Kissen, Vorläuferstrukturen der späteren Klappen (High & Epstein 2008). Am Tag

E9,5 war keine Expression in dem endokardialen Kissengewebe sichtbar. Ab E10,5, wenn das Herz die komplizierte morphologische Verwindung beendet hat, waren weiterhin myokardiale Zellen des Kammernmyokards, der Trabekel und des Ausflusstraktes gefärbt. Wohingegen endokardiale Zellen des Ventrikels und endokardiale Zellen des Kissengewebes keine Expression aufwiesen (s. Abb. 8B). Vor der Kissenformierung liegen Endokardium und Myokardium noch nahe beieinander, sind aber durch die sogenannte Herzgallerte, eine dicke extrazelluläre Matrix Schicht, von einander getrennt. Aus dem Myokard induzierende Signale führen zu einer epithelialen-mesenchymalen Transition wodurch mesenchymale Zellen entstehen (High & Epstein 2008). Am Tag E12,5 war keine Expression in den mesenchymalen Zellen des interventrikulären Septums und des atrioventrikulären Septums detektierbar. Die Expression im myokardialen Anteil der Trabekel im Bereich des Apex, der Herzspitze, war stark verringert. Myokardiale Zellen der Ventrikel und Atrien zeigten weiterhin starke Expression von *Fbxl22* (s. Abb. 8C). In 14,5 d alten Embryonen (s. Abb. 8D) haben sich *Fbxl22* positive myokardiale Zellen in der Kompaktzone des ganzen Herzens verbreitet. Auch im Myokard der Atrien war eine Expression detektierbar, während die Expression in den Trabekeln nicht mehr vorhanden war. Auch der Bereich um die Aorta herum, der ursprünglich aus endokardialen Kissengewebe gebildet wurde zeigte keine Expression mehr. Der äußere Bereich des interventrikulären Septums zeigte hingegen eine Expression.

Zur näheren Charakterisierung der Expressionsdomänen im gesamten Embryo wurden Gewebeschnitte ganzer Embryonen vom Tag E16,5 angefertigt und auf Expression hin untersucht. Innerhalb des Embryos wurden zusätzlich zum Herzen noch weitere distinkte Kompartimente sichtbar. Am Tag 16,5 *p.c.* exprimierten alle myokardialen Strukturen *Fbxl22* (s. Abb. 8E). Die Stärke der Expression variierte zwischen den Organen. Die glatten Muskelzellen der Blase zeigten eine starke Expression, während die Skelettmuskelzellen des Septum Transversums, des Ösophagus und der Zunge eine mittlere Expressionsstärke aufwiesen (s. Abb. 8E).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das *F-Box*-Gen im frühen Embryo in zwei distinkten Strukturen exprimiert ist. Im Herzschlauch und etwas später in den Somiten wird *Fbxl22* früh exprimiert. Am Tag 16,5 *p.c.* kann die Expression

zusätzlich in glatten Muskelzellen Zellen des Urogenital Systems und Muskelzellen myotomalen Ursprungs detektiert werden.

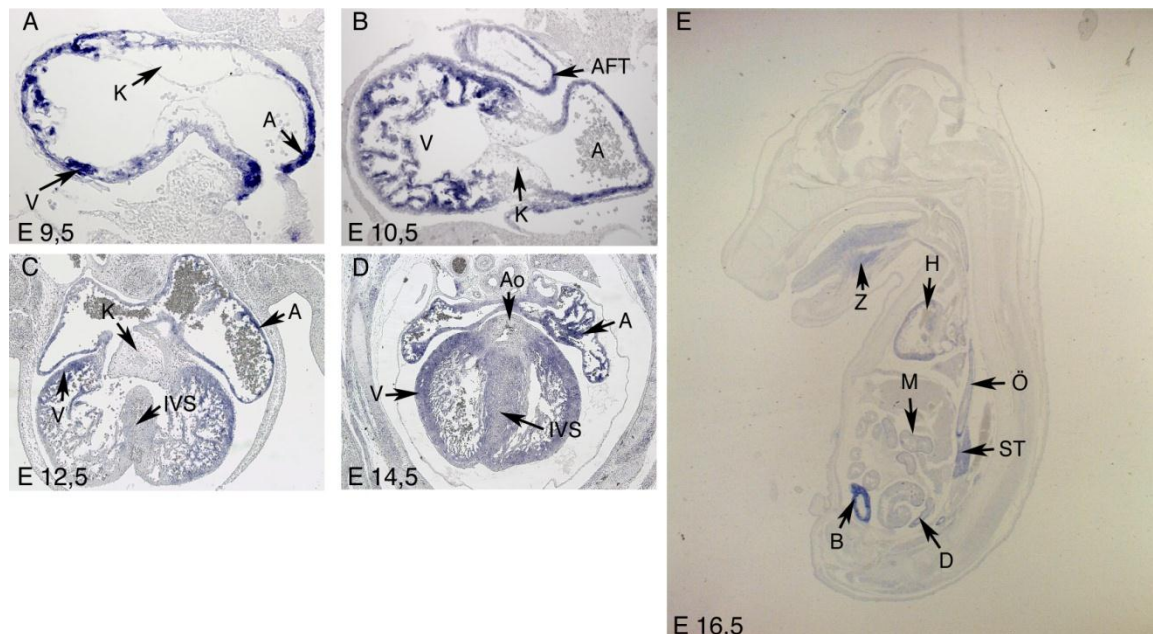


Abbildung 8: *Fbx122*-Expression in histologischen Schnitten während verschiedener Entwicklungsstadien des Embryos. (A-B), Schnitte durchs Herz zu verschiedenen Stadien der Herzentwicklung. *Fbx122* ist allen myokardialen Zellen des Herzen exprimiert (V,A,AFT). Es besteht jedoch keine Expression in endokardialen Zellen der Trabekel und des Kissengewebes (K). (C), Schnitt eines 12,5 d p.c. Herzens. Die Expression bleibt in den myokardialen Zellen bestehen und bleibt den endokardialen Zellen fern. Teile des noch nicht vollständig geschlossenen IVS zeigt *Fbx122* Expression. (D), Schnitt eines 14,5 d p.c. Herzens. *Fbx122* ist weiterhin in den myokardialen Zellen des V, A und IVS exprimiert. Im medialen Bereich des IVS ist ein kleiner Streifen ohne Expression zu sehen. Auch der Bereich um die A herum zeigt ein Erliegen der Expression. (E), Schnitt durch einen 16,5 d p.c. Embryo. *Fbx122* ist in myogenen Zellen der Z, des H, des M, des Ö, des ST, der B und des D exprimiert. V = Ventrikel; A = Atrium; K = Kissengewebe; AFT = Ausflusstrakt; IVS = Interventrikuläres Septum; Ao = Aorta; Z = Zunge; H = Herz; M = Magen; Ö = Ösophagus; ST = Septum Transversum; B = Blase; D = Darm

3.1.3 Analyse der Expression des Gens *Fbx122* während der myogenen Differenzierung

Wie die Expressionsanalyse der Gewebeschnitte zeigen konnte, ist *Fbx122* in verschiedenen Muskelzelltypen des Embryos exprimiert. Um eine möglichst nähere zeitliche Analyse myogener Differenzierung durchzuführen, wurden Untersuchungen in Zellkultur durchgeführt. Durch die Verwendung der Zelllinie C2C12, einer Myoblastenzelllinie, welche in der Lage ist, durch Induktion Myotuben zu bilden, sollte ein weiterer Einblick in die mögliche Funktion von *Fbx122* in der Entwicklung des Herzens gewonnen werden. Um die myogene Differenzierung zu starten, wurde anstelle von 15% FCS 2% Pferdeserum verwendet (Fanzani et al. 2007). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung wurden Proben entnommen und

die Expressionsniveaus durch semiquantitative RT-PCR Analyse gemessen. Um die relative Expression zu bestimmen, wurden die gemessenen Expressionen mit der Expression des Haushaltgens *Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase* (HPRT) normalisiert.

Um die myogene Differenzierung besser verfolgen zu können, wurden bei der Expressionsanalyse jeweils ein früher und ein später Differenzierungsmarker verglichen. *MyoD1* ist einer der Hauptregulatoren in der Skelettmuskelentwicklung aufgrund seiner Fähigkeit, das myogene Programm in Myoblasten, Fibroblasten und weiteren Zellen zu initiieren. Dafür etabliert *MyoD1* ein spezifisches und temporär geordnetes Genexpressionsprogramm, dass zu multinukleären Myotuben führt (Aziz et al. 2010). Ein weiterer myogener Marker ist die Isoform des Gens *Myosin leichte Kette 1*, das Gen *Mlc3f*. *Mlc3f* ist ein weiterer Marker der für die myogene Differenzierung von C2C12 Myoblasten beschrieben ist (Cabane et al. 2003). In undifferenzierten Myoblasten war die Expression von *Fbxl22* äußerst gering. Zu diesem Zeitpunkt waren sowohl der frühe Marker *MyoD1* als auch der spätere Marker *Mlc3f* nur schwach exprimiert. Die Expressionsniveaus aller drei Gene wurde jeweils auf 1 gesetzt und die darauf folgenden Werte relativ zu diesen verglichen. Nach Serumentzug induzierte Differenzierung begann die Expression des *F-Box*-Gens stark anzusteigen. Beide Vergleichsmarker zeigten einen Anstieg im Expressionsniveau, dass den Beginn der myogenen Differenzierung anzeigt. Nach 2 Tagen myogener Differenzierung hatte *Fbxl22* sein höchstes Expressionsniveau erreicht, mit dem fast 14-fachen Expressionsniveau, verglichen mit dem undifferenzierten Zustand. Der frühe Marker *MyoD1* erreichte zu diesem Zeitpunkt ebenfalls sein höchstes Expressionsniveau, während der späte Marker *Mlc3f* weiter anstieg. Nach 4 Tagen Differenzierung schwächte sich die Expression des *F-Box*-Gens ab und fiel bis zum 6 Tag auf das 6-fache Expressionsniveau im Vergleich zum undifferenzierten Zustand zurück. Die Expression des frühen Markers fällt ab dem zweiten Tag kontinuierlich, bis sie einen Tiefpunkt am 6 Tag erreichte. Der späte Marker hingegen stieg weiterhin kontinuierlich an und erreichte sein höchstes Expressionsniveau am Ende des Untersuchungszeitraums (s. Abb. 9).

Die nähere zeitliche Analyse der myogenen Differenzierung zeigte einen frühen Anstieg der Expression von *Fbxl22*, der sein höchstes Niveau am 2 Tag der

Differenzierung erreichte. Differenzierte Myotuben wiesen ein ca. 6-fach erhöhtes Expressionsniveau auf.

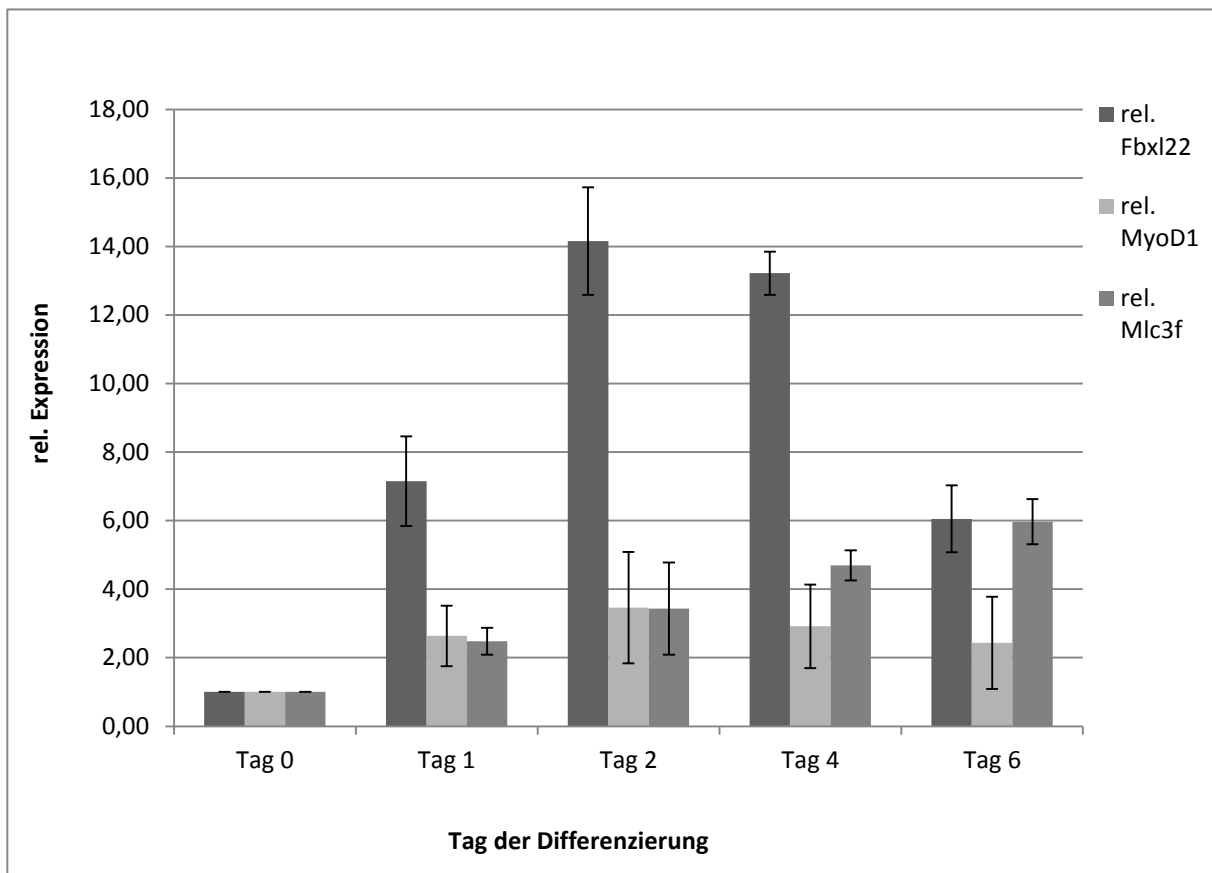


Abbildung 9: Expressionsanalyse des *F-Box*-Gens *FbxI22* und der Vergleichsmarker *MyoD1* sowie *Mlc3f* während der myogenen Differenzierung. Semiquantitative RT-PCR Analyse von *FbxI22* während der Differenzierung von C2C12 Myoblasten in Myotuben. Das Gen *MyoD1* ist ein früher myogener Marker, *Mlc3f* dient als später Marker. Die myogene Differenzierung ist nach 6 Tagen vollständig abgeschlossen. Die Expression wurde immer mit der Expression des Gens *Hprt* normalisiert.

3.1.4 Analyse der Expression des Gens *FbxI22* in adulten Organen

Da die Expressionsanalyse von *FbxI22* zeigte, dass es während der frühen Entwicklung des Herzens und anderer Organe exprimiert ist, sollte als weiterer Teilaspekt die Expression in adulten Organen näher bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden Organe adulter Mäuse gewonnen und die RNS daraus isoliert (s. 2.6.1.1). Mit Hilfe der semi-quantitativen RT-PCR Analyse wurden die Organe auf die Expression hin untersucht.

In den folgenden Organen wurde entweder keine oder eine schwache Expression gemessen: Gehirn (1), Lunge (4), Niere (2) und Leber (2). Während in den folgenden

Organen eine starke Expression detektiert wurde: Darm (8), Herz (23) und Blase (41) nachgewiesen werden. Die Expression in der Blase war um das ca. 40 fache höher als im Gehirn und knapp doppelt so hoch wie im Herzen (s. Abb. 10). Diese starke Expression konnte schon in den Gewebeschnitten nachgewiesen werden (s. 2.9.11.1.).

Die gemessenen relativen Expressionen korrelieren mit den Anteilen an Muskelzellen in den Organen. Die Lunge z.B., die nur wenige glatte Muskelzellen in der *Lamina propria* hat, zeigte nur eine schwache Expression. Im Gegensatz dazu zeigten Organe, die einen großen Anteil an Muskelzellen haben, wie Herz, Blase und Darm ein relativ hohes Expressionsniveau (s. Abb. 10).

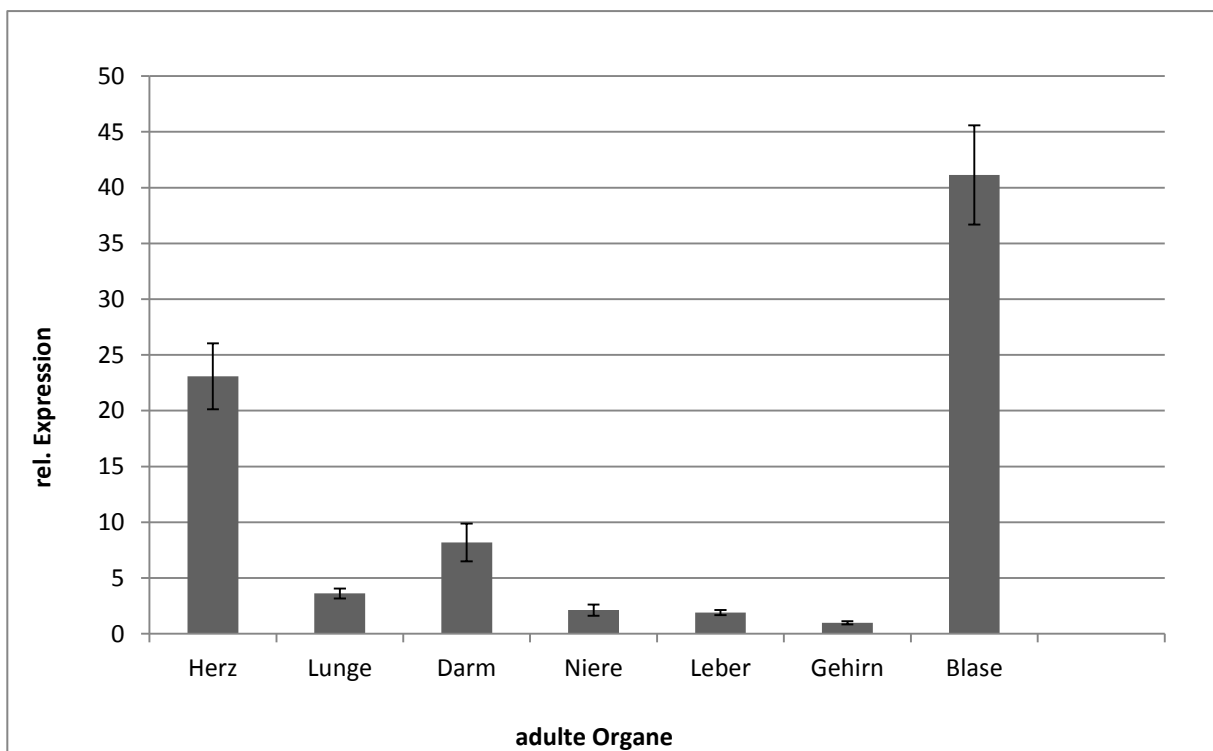


Abbildung 10: Adulte Organen zeigen *Fbxl22* Expression . Semiquantitative RT-PCR Analyse von *Fbxl22* in adulten Organen. Die Expression des Gehirns wurde als 1 definiert und alle anderen Expressionen mit dieser verglichen. Die Expression wurde mit der Expression des Gens *Hprt* normalisiert.

3.2 Funktionelle Analyse von *Fbxl22*

3.2.1 *In vitro* Analyse von *Fbxl22*

3.2.1.1 Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen das *Fbxl22* Protein der Maus

Für die räumliche und zeitliche Auflösung der Proteinexpression sowie für biochemisch-funktionelle Untersuchungen ist der Nachweis des Proteins mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers von großem Vorteil. Eine der gängigen Methoden zur Gewinnung eines spezifischen Antikörpers ist die Injektion von bakteriell exprimierten Protein in Kaninchen.

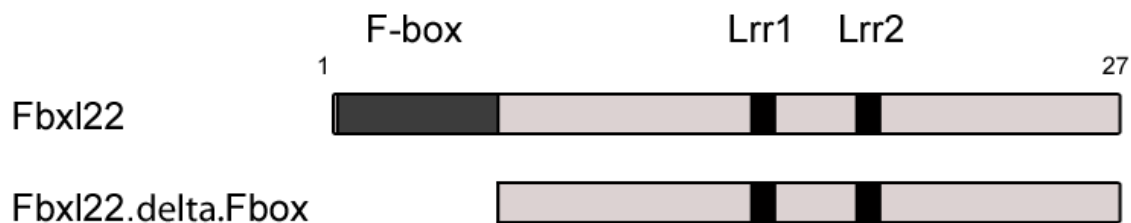


Abbildung 11: Gewinnung eines Antiserums gegen das murine *Fbxl22* Protein. Die beiden Balken schematisieren das vollständige *Fbxl22* Maus Protein und die Deletionsmutante. Immunisiert wurde mit dem aus dem pGEX.Fbxl22 und pGEX.Fbxl22.d.F-Box kodierten Fusionsprotein. Zur Aufreinigung wurden die selben beiden Fusionsproteine benutzt.

Dazu wurden die offenen Leseraster des vollständigen Proteins und der delta F-Box (d.F) *Fbxl22* Variante in den pGEX4T-3 (GE Healthcare) Vektor kloniert (s. Abb. 11). Dabei handelt es sich um einen Glutathion-S. Transferase Fusions Vektor mit dessen Hilfe man an sein Protein von Interesse die Glutathion-S. Transferase fusioniert. Über diese Funktion kann das exprimierte Protein spezifisch durch GSH-Affinitäts-Kugeln aufgereinigt werden. Die Expression des Fusionsproteins steht unter der Kontrolle des *tac* Promoters, welcher sich durch die Zugabe des Laktose Derivats Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzieren lässt.

In Vorversuchen wurden sowohl die Konzentration an IPTG, als auch die Induktionszeiten bestimmt. Eine Konzentration von 2 mM und eine Induktionszeit von 12 h bei 16°C stellte sich als optimal heraus. Das heißt, dass so die größte Menge an löslichem Protein erhalten wurde. Um eine möglichst hohe Spezifität des Antikörpers zu erreichen, wurden zwei Ansätze gewählt. Es wurden sowohl das vollständige

Fusionsprotein, als auch das d.F.Fbxl22 Fusionsprotein in dem Bakterienstamm BL21 (GE Healthcare) exprimiert. BL21 ist ein *E.coli* Stamm der sich gut für die Expression von GST-Fusionsproteinen eignet (s. 2.5.4.2.1). Beide GST-Fusionsproteine wurden über ihre GST-Funktion mittels GSH-Affinitäts-Kugeln aufgereinigt. Die GSH-Affinitäts-Kugeln wurden in 4x Ladepuffer aufgenommen, gekocht und über ein präparatives SDS-PAA-Gel aufgereinigt. Das Gel wurde in eiskaltem 3 M KCl geschwenkt, wodurch die Proteine in dem Gel gefällt wurden und als weiße Banden sichtbar wurden. Es wurde ein Stück des präparativen Gels massenspektrometrisch analysiert, um sicherzustellen, dass das richtige Protein exprimiert und aufgereinigt wurde. Danach wurde der Firma Eurogentec eine Kombination aus beiden Fusionsproteinen geschickt, welche die Injektion und das Ausbluten der Tiere vorgenommen hatte. Die Antiseren wurden über die selben beiden Proteine aufgereinigt, die auch in die Kaninchen injiziert wurden. Damit wurden Affinitätssäulen hergestellt, welche der Antikörperaufreinigung dienen sollten.

3.2.1.2 Analyse der Spezifität des polyklonalen Antikörpers

Die Firma Eurogentec hatte den Kaninchen die Fusionsproteine bis zu 5 mal injiziert, um die Konzentration an Antikörper zu erhöhen. Nach jeder Injektion wurde dem Tier eine Blutprobe abgenommen und das Serum zurückgeschickt. Nach der 5. Injektion fand schließlich die finale Blutung statt, d.h., dass Tier wurde getötet und das gesamte Blut aufgefangen. Das Blut wurde von seinen zellulären Bestandteilen befreit (Serum) und zurückgeschickt.

Um die Spezifität und Funktion des Antikörpers zu testen, wurden Western Blots, Immunpräzipitationen und Immunfluoreszenz-Färbungen von Zellen gemacht. Abbildung 12 zeigt, dass weder das endogene, noch transfizierte exogene Protein (Fbxl22.myc Fusionsprotein) in Western Blot Analysen detektiert wurde. Als Positivkontrolle diente das über das Fusionsprotein detektierte exogene Protein. Während die Positivkontrolle eine einzelne Bande mit dem apparenten Molekulargewicht von 28 kDa zeigte, konnte kein Protein mit Hilfe des generierten Antikörpers gegen Fbxl22 detektiert werden. Auch in den Immunpräzipitationsexperimenten konnte der α -Fbxl22 Antikörper kein überexprimiertes Protein immunpräzipitieren. Die Positivkontrolle konnte mit dem α -myc Antikörper detektiert werden (s. Abb. 13). Selbst der Versuch, das bakteriell

überexprimierte Fusionsprotein mit Hilfe des spezifischen Antikörpers im Western Blots nachzuweisen, brachte keine positiven Resultate. Nach Analyse der Firma Eurogentec, welche die Konzentration an Antikörpern per ELISA gemessen hatte, zeigte sich lediglich eine sehr geringe Konzentration an Antikörpern. Die durchgeführten Versuche zeigen somit, dass kein funktioneller Antikörper gewonnen werden konnte.

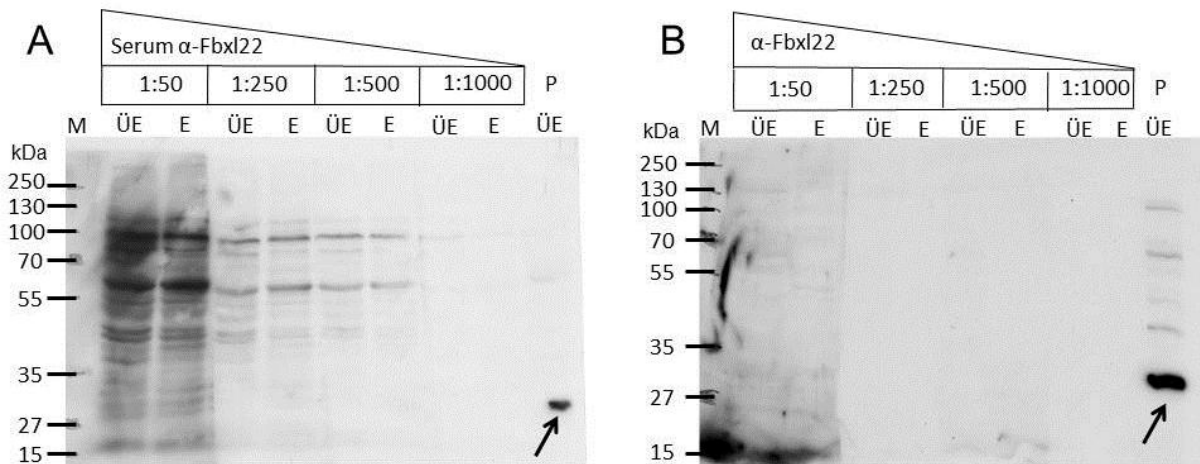


Abbildung 12: Spezifität des α -Fbxl22-Antiserum und des aufgereinigten Antikörpers in der Western Blot Analyse. Die Abbildung zeigt in Zellkultur überexprimiertes (+myc) sowie endogenes Fbxl22 Protein. (A) Antiserum in 4 unterschiedlichen Konzentrationen für die Detektion des exogenen und endogenen Fbxl22 Proteins. Das Antiserum konnte Fbxl22 nicht detektieren. (B), Aufgereinigter Antikörper in 4 Konzentrationen zur Detektion des exogenen und endogenen Proteins. Der Antikörper detektiert kein Fbxl22 Protein. Als Positivkontrolle wurde überexprimiertes Fbxl22.myc Protein mittels α -myc Antikörper detektiert (Pfeil). Links sind Größenstandards abgebildet (molekulare Masse in kDa). M = Marker; ÜE = überexprimiertes Protein; E = endogenes Protein; P = Positivkontrolle

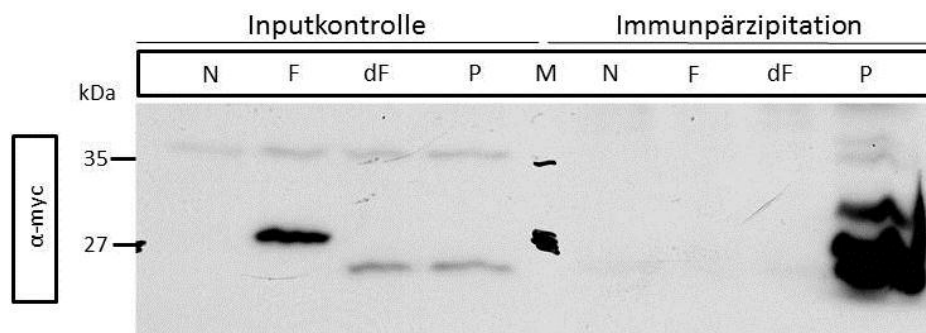


Abbildung 13: Spezifität des α -Fbxl22 Antikörpers in Immunpräzipitationsexperimenten. Zellkulturlysate mit überexprimierten Fbxl22.myc Fusionsprotein und d.F.Fbxl22.myc Fusionsprotein. In den Inputkontrollen sind beide Proteine, sowie die Positivkontrolle mit dem α -myc Antikörper detektierbar. Nach Immunpräzipitation mit dem α -Fbxl22 Antikörper ist kein Protein mit dem α -myc Antikörper zu detektieren. Die Positivkontrolle wurde mit dem α -myc Antikörper immunpräzipitiert. N = Negativkontrolle; F = Fbxl22; dF = d.F.Fbxl22; P = Positivkontrolle

3.2.1.3 Nachweis der intrazellulären Lokalisierung nach Überexpression

Um zu testen, ob die richtigen Proteine durch die Expressionsplasmide kodiert werden, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. In beiden Fällen wurden

einzelne Bande mit dem scheinbaren Molekulargewicht von 28 kDa und bei dem d.F.Fbxl22 Protein von 26 kDa, detektiert. Als Positivkontrolle diente Tbx18.myc mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 72 kDa und als Negativkontrolle wurde EGFP überexprimiertes Protein benutzt (s. Abb. 14).

Um Informationen über die mögliche Funktion eines unbekanntes Proteins zu erlangen, bietet es sich an, die intrazelluläre Lokalisierung dieses Proteins zu untersuchen. Dadurch wird es einem ermöglicht, funktionelle Untersuchungen auf bestimmte Fragestellungen zu konzentrieren. Da es keinen Antikörper gibt, der das endogene Fbxl22 Protein detektieren kann, wurde auf ein Zellkultursystem zurückgegriffen. Verschiedene Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid transfiziert, welches für das vollständige Fbxl22 Protein kodiert. In einem zweiten Ansatz wurde d.F.Fbxl22 Protein, bei welchem das F-Box-Motiv entfernt wurde, transfiziert. Beiden Konstrukten wurde für die spätere Detektion ein Fusionsprotein angefügt. Als Kernfärbung wurde der DNS interkalierende Farbstoff DAPI verwendet. Zuerst sollte die Lokalisierung in NIH3T3 und in HEK293 Zellen durchgeführt werden. Bei der NIH3T3 Zelllinie handelt es sich um eine adherent wachsende murine Fibroblastenzelllinie. Bei den HEK293 handelt es sich dagegen um eine epithelial humane Zelllinie (<http://lgcstandards-atcc.org/Default.aspx?base>). Beide Zelllinien wurden entweder mit dem pcDNA3.Fbxl22.myc oder dem pcDNA3.dF.Fbxl22.myc Konstrukten transient transfiziert. Die Proteine wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz detektiert und im Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Dabei stellte sich heraus, dass die exogene Expression des vollständigen Proteins in NIH3T3 und HEK293 Zellen zu einer ubiquitären Lokalisierung führte (s. Abb. 15A,B). Die Expression im Kern erschien dabei etwas stärker zu sein. Es zeigte sich, dass die exogene Expression des dF.Fbxl22 Proteins auch zu einer ubiquitären Lokalisierung führte, wenngleich die Expression im Kern deutlich geringer war (s. Abb 15A,B). Zusätzlich zu den beiden vorangegangenen Zelllinien, sollte die Lokalisierung der beiden Fusionsproteine in den Zelllinien C2C12 und HL-1 untersucht werden. Bei den HL-1 Zellen handelt es sich um eine abgeleitete Kardiomyozyten Zelllinie, die viele ihrer kardiogenen Charakteristika behalten hat. Sie exprimiert z.B. die Gene „ *α -cardiac myosin heavy chain, α -cardiac actin, and connexin43*“ (Claycomb et al. 1998).

In den C2C12 Myoblasten lokalisierte das vollständige überexprimierte Protein und das dF.Fbxl22 Protein zytoplasmatisch (s. Abb. 16A). In den HL1 Kardiomyozyten

lokalisierte das vollständige überexprimierte Protein auch zytoplasmatisch, während das dF.Fbxl22 Protein eine ubiquitäre Lokalisierung zeigte (s. Abb. 16B). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Lokalisierung von überexprimierten Fbxl22 von den jeweiligen Zelltypen abhängt. Während überexprimiertes Fbxl22 in der Fibroblastenzelllinie (NIH3T3) und der epithelialen Zelllinie HEK293 ubiquitär bis nuklear lokalisierte, zeigte sich in der Myoblastenzelllinie (C2C12) und der Kardiomyozytenzelllinie (HL-1) eine rein zytoplasmatische Lokalisierung. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich die möglichen Funktionen von Fbxl22 zwischen Muskelzellen und nicht Muskelzellen unterscheiden.

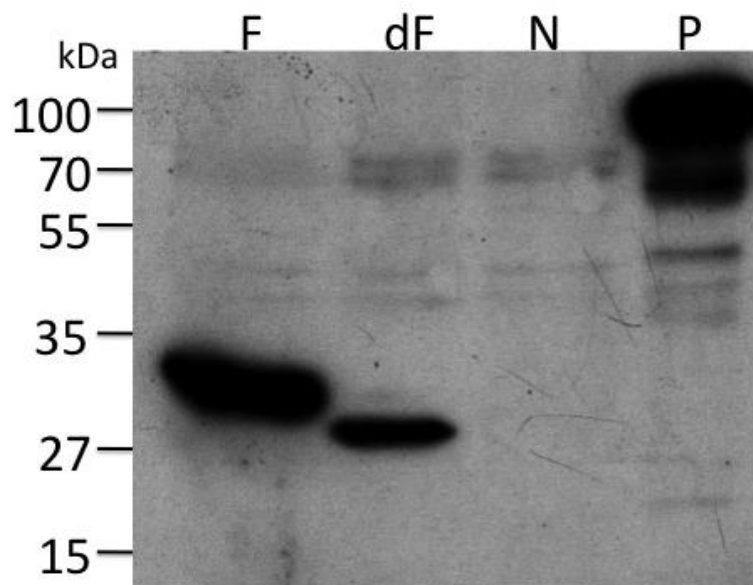


Abbildung 14: Western Blot Analyse der Expressionsplasmide. Die Abbildung zeigt in HeLa Zellen überexprimiertes vollständiges Fbxl22 und das d.F.Fbxl22 Protein, welches über ein 12 % iges SDS-PAA-Gel aufgetrennt wurde. In beiden Fällen werden einzelne Banden mit einem Molekulargewicht von 28 kDa oder im Falle von d.F.Fbxl22.myc mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 26 kDa detektiert. Als Positivkontrolle diente Tbx18.myc mit einem Molekulargewicht von 72 kDa. In der Negativkontrolle war EGFP. F = Fbxl22; dF = d.F.Fbxl22; N = Negativkontrolle; P = Positivkontrolle

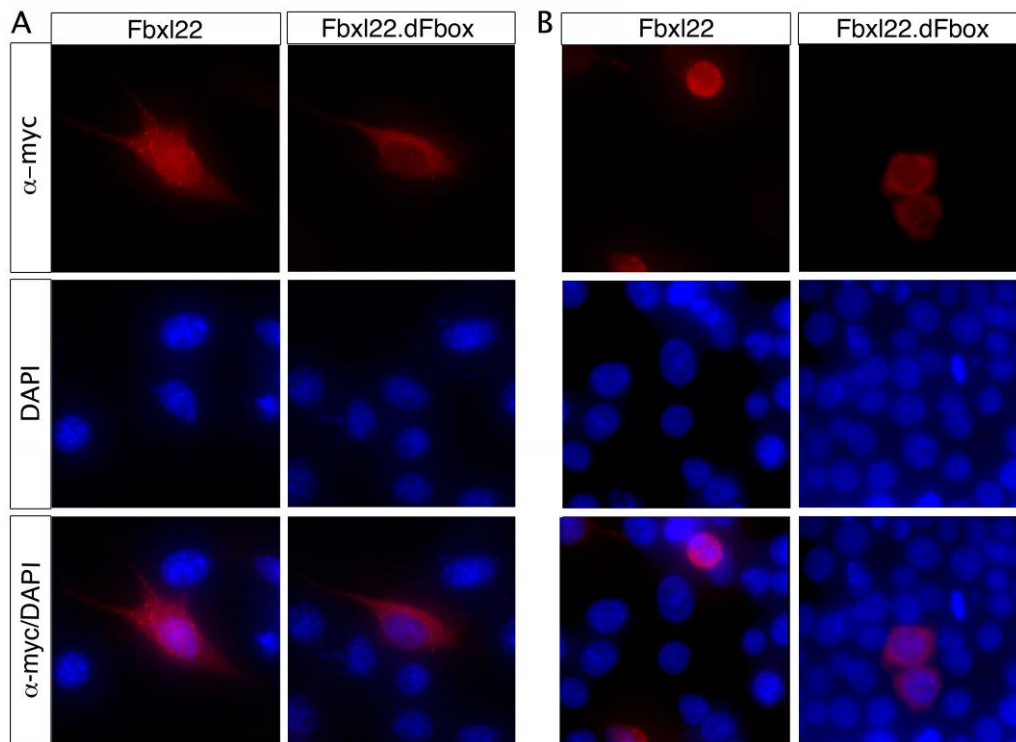


Abbildung 15: Transfektionsexperimente zur Lokalisierung von exogenen Fbxl22. Verschiedene Zellen (A = NIH3T3; B = HEK293) wurden mit pcDNA3-Konstrukten, die für das vollständige Fbxl22 und für das d.F.Fbxl22 kodieren, transfiziert. 2 Tage nach der Transfektion wurden die Proteine mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen. Das vollständige Protein lokalisiert in beiden Zelltypen ubiquitär mit einer etwas stärkeren Expression im Kern. Das d.F.Fbxl22.myc lokalisiert auch ubiquitär, jedoch verstärkt im Zytoplasma.

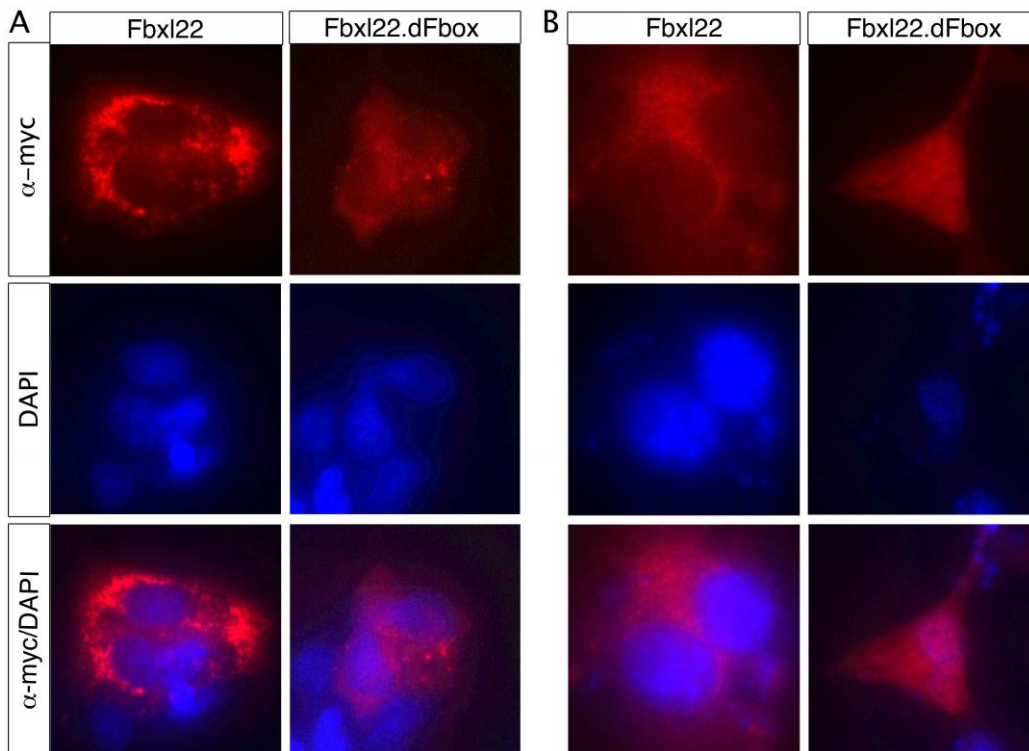


Abbildung 16: Transfektionsexperimente zur Lokalisierung von überexprimierten Fbxl22 in C2C12 und HL1 Zellen. Verschiedene Zellen (A = C2C12; B = HL1) wurden mit pcDNA3-Konstrukten, die für das

vollständige Fbxl22 und für das d.F.Fbxl22 kodieren, transfiziert. 2 Tage nach der Transfektion wurden die Proteine mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen. Das vollständige Protein lokalisiert in beiden Zelltypen zytoplasmatisch. Das d.F.Fbxl22 lokalisiert in den C2C12 Zellen zytoplasmatisch während es in den HL-1 Zellen eine ubiquitäre Lokalisierung zeigte.

3.2.1.4 Fbxl22 als Teil des SCF-Komplexes

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die strikte Kontrolle der Proteinstabilität für die Zellphysiologie entscheidend. Der SCF-Komplex ist Teil eines kontrollierten Abbauweges, wobei dass über das F-Box-Motiv an den Komplex gebundene F-Box-Protein die Substratspezifität vermittelt (T. Cardozo & M. Pagano 2004). Um zu klären ob Fbxl22 ein Teil dieses Komplexes ist, sollte im nächsten Versuch die Frage geklärt werden, ob es in der Lage ist, über seine F-Box als Teil eines SCF-Komplexes zu wirken. Zu diesem Zweck wurden Transfektionsexperimente mit zwei verschiedenen Expressionsplasmiden (pcDNA3.Fbxl22.myc und pcDNA3.Fbxl22.dF.myc) in HeLa Zellen durchgeführt. Bei der dF.Fbxl22 wurde die komplette F-Box, die als Bindemotiv für den SCF – Komplex benötigt wird, deletiert. HeLa-Zellen exprimieren alle Teile der SCF-Komplex endogen und eignen sich aus diesem Grunde für die co-immunpräzipitations Experimente. Die transient transfizierten Zellen wurden mittels Lysepuffer aufgeschlossen und die zellulären Bestandteile abzentrifugiert. Das Lysat wurde mit einem anti-Myc Antikörper inkubiert und mit Hilfe von ProteinA-Agarose-Kugeln, diese binden spezifisch an die Fc Region von Immunglobulin Molekülen, aufgereinigt. Danach wurden die ProteinA-Agarose Kugeln mit den gebundenen Proteinen in Ladepuffer aufgekocht. Die Auftrennung der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nylonmembran transferiert und mit anti-Myc-, anti-Cul1- und anti- Skp1- Antikörper inkubiert. Während überexprimiertes Myc Fbxl22 in der Lage ist, die SCF Untereinheiten Cul1 und Skp1 zu präzipitieren, konnten diese in der Negativ-Kontrolle (Leerplasmid) und der dF.Fbxl22 Mutante nicht nachgewiesen werden (s. Abb. 17). In der immunpräzipitierten Fraktion tauchte immer eine Bande mit der molekularen Molmasse von 27 kDa auf. Dies war die leichte Kette der Antikörper, die immer mit detektiert wurde.

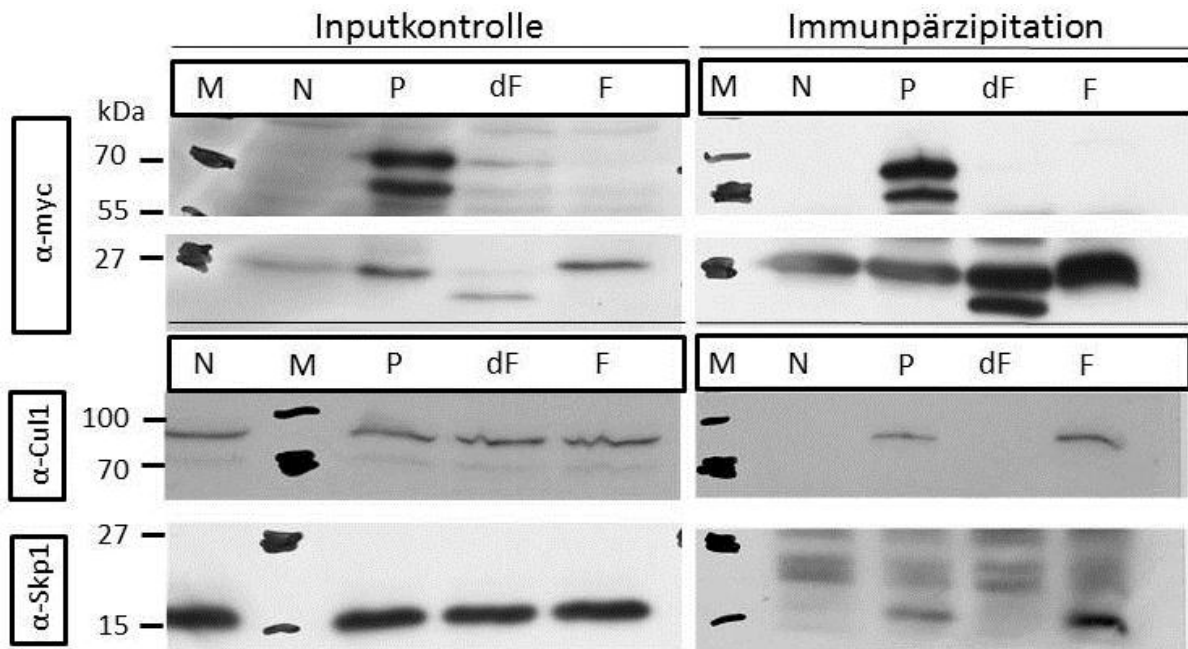


Abbildung 17: Identifizierung von Fbxl22 als Teil des SCF-Komplexes. Lysate aus HeLa Zellen, die Fbxl22.myc, Fbxl22.d.F-Box.myc, Fbxw5.myc oder Myc Leerkontrolle exprimieren, wurden mit anti-Myc Antikörper immunpräzipitiert (s. Tabelle). Präzipitierte Proteine wurden mittels Natriumdodexylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und anschließend nach einem Western Blot mit anti-Myc, anti-Cul1 und anti-Skp1 Antikörper inkubiert (s. Tab. 1). Fbxl22 immunpräzipitiert beide Teile des SCF-Komplexes. M = Marker; N = Negativekontrolle; P = Positivkontrolle; d.F.Fbxl22 = delta.F-Box.Fbxl22; F = vollständiges Fbxl22.

3.2.1.5 Fbxl22 Proteinabbau durch den APC/C

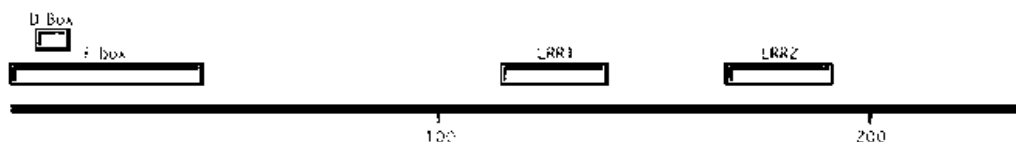


Abbildung 18: Schematische Darstellung des Proteins Fbxl22 mit Motiven. Die Abbildung zeigt den Aufbau des Proteins Fbxl22 mit den beiden vorhergesagten LRR Motiven, der D-Box und der F-Box. Die D-Box liegt in mitten der F-Box. LRR = Leuzin-reiche-Wiederholungen; D-Box = „Destruction-Box“

Eine *in silico* Analyse durchgeführte Motivsuche (<http://elm.eu.org/>) identifizierte die „Destruction-Box“ (D-Box) als ein mögliches Motiv im Protein Fbxl22 (s. Abb. 18). Die D-Box ist ein Motiv, welches von den co-Aktivatoren Cdc20 und Cdh1 erkannt wird. Wie im Abschnitt 1.2.1 beschrieben kann der APC/C-Komplex Substrate erkennen und für Abbau durch das 26S Proteasom markieren. Um den Einfluss des APC/C auf Fbxl22 zu testen, wurden HeLa Zellen mit dem pcDNA3.Fbxl22.myc Überexpressionskonstrukt transfiziert und die Zellen mit dem spezifischen Proteasominhibitor MG132 für mehrere Stunden kultiviert (s. Abb. 19). Nach der

entsprechenden Zeit wurden die Zellen lysiert und die Proteinmenge mittels BCA-Assay (s. 2.11.1) bestimmt. Dabei beruht der BCA-Assay auf der Reduktion von Cu^{2+} Ionen zu Cu^{1+} Ionen, die dann mit Bicinchion-Säure einen violetten Farbkomplex bilden, der über einen Photometer gemessen werden kann (http://www.chemie.uni-hamburg.de/bc/BC_Praktikum_Proteinchemie_II.pdf).

Es wurden gleiche Mengen Protein über eine SDS-PAGE aufgetrennt und Fbxl22.myc mittels Antikörper im Western Blot detektiert. Durch den Proteasominhibitor erhöhte sich mit zunehmender Zeit auch die Menge an Protein (s. Abb. 19).

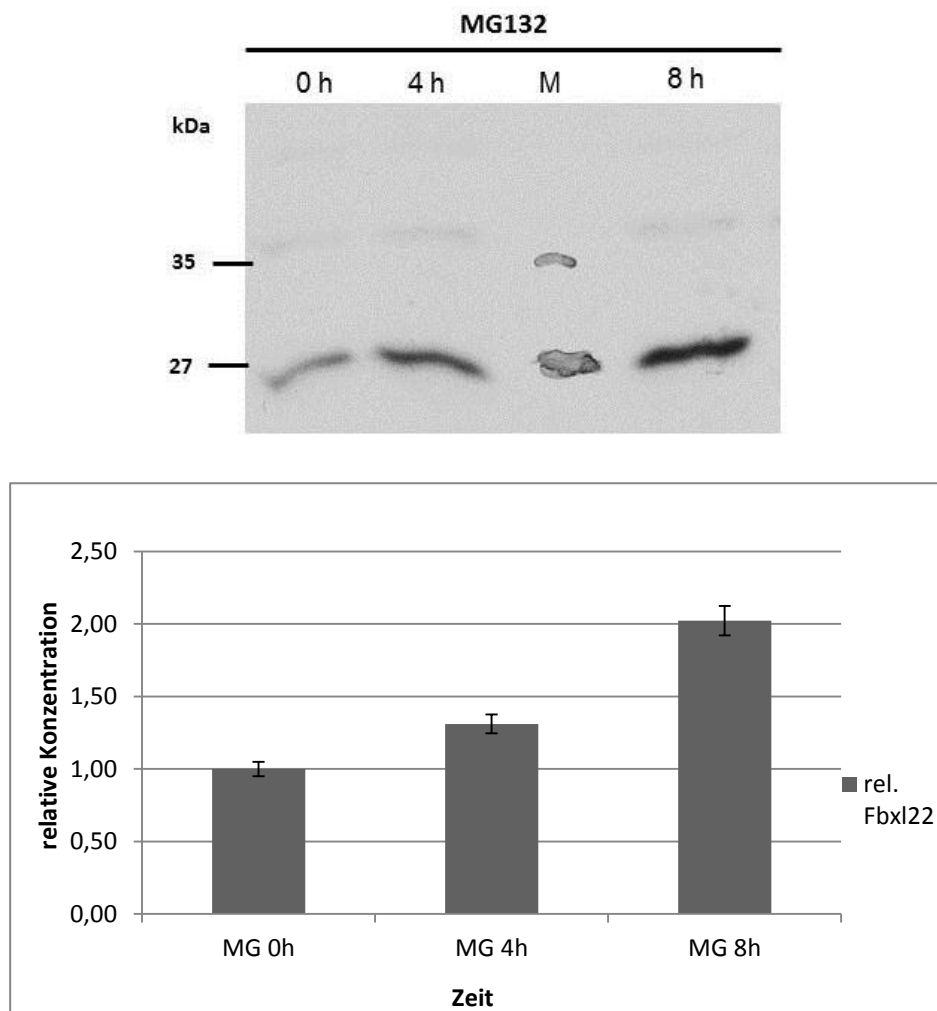


Abbildung 19: Fbxl22.myc Proteinniveau nach Behandlung mit dem Proteasominhibitor MG132. HeLa Zellen wurden mit jeweils 5 μg Fbxl22.myc Plasmid transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen mit 25 μM MG132 kultiviert. Alle 4h wurden Proben entnommen und die daraus erhaltenen Proteinlysate wurden auf ihre Proteinmenge mittels BCA-Assay quantifiziert und gleiche Mengen Protein mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Für die Detektion des Proteins wurde ein anti-Myc Antikörper verwendet (s. Tab. 1). Die untere Abbildung zeigt die Quantifizierung des Fbxl22 Proteinniveaus. Normalisiert wurde gegen β -Aktin.

Um den Effekt der Zellproliferation auf die Proteinmenge während der 8h Inkubation auszuschließen, wurden erneut HeLa Zellen mit dem pcDNA3.Fbxl22.myc Konstrukt transfiziert, die eine Gruppe mit 25 μ M MG132 behandelt und eine Kontrollgruppe mit 25 μ M DMSO. Anschließend wurden alle 4h Proben entnommen und die Proteinmenge mittels BCA-Assay bestimmt. Danach wurden gleiche Mengen Protein über eine SDS-PAGE augetrennt und im Western Blot mittels α -myc und β -Aktin Antikörper detektiert. Beta-Aktin ist ein Strukturprotein, das in allen eukaryontischen Zellen vorkommt. Daher eignet es sich sehr gut für die Normalisierung von Proteinen. Die Quantifizierung der detektierten Banden erfolgte über die Software Quantity One (Biorad). Nach der Quantifizierung der Banden erfolgte die Normalisierung mit β -Aktin. Wie in Abb. 20 zu erkennen ist, verursachte die Zugabe von MG132 einen deutlichen zeitabhängigen Anstieg des Fbxl22 Niveaus. Dieser Effekt wurde jedoch in der mit DMSO behandelten Kontrollgruppe nicht beobachtet. Dieses bestätigt die bereits aufgestellte Hypothese, dass das Protein proteasomal abhängig abgebaut wird.

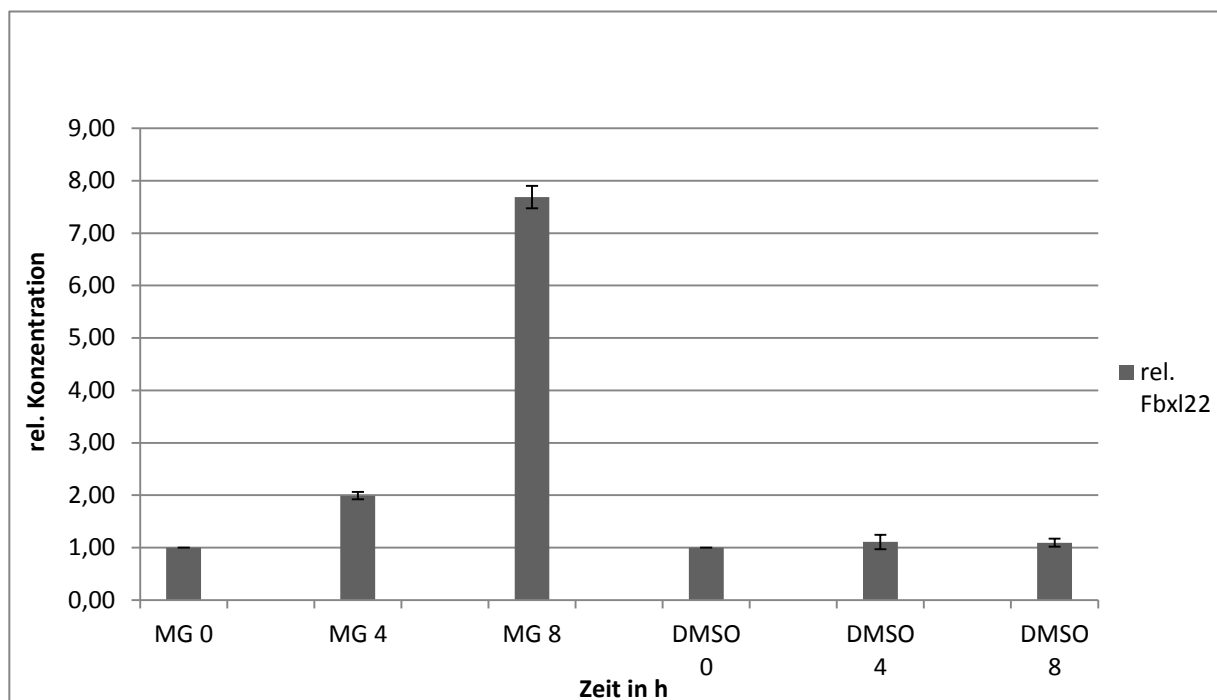


Abbildung 20: Proteinniveau von Fbxl22 nach MG132 oder DMSO Behandlung. HeLa Zellen wurden mit jeweils 5 μ g Fbxl22.myc Plasmid transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen mit 25 μ M MG132 oder mit 25 μ M DMSO kultiviert. Alle 4h wurden Proben entnommen und die daraus erhaltenen Proteinlysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Für die Detektion des Proteins wurde ein anti-Myc Antikörper verwendet (s. Tab. 1). Zur Bestätigung der gleichen Auftragsmenge und Relativierung der Konzentration wurde ein β -Aktin Antikörper verwendet (s. Tab. 1). MG = MG132; DMSO = Dimethylsulfoxid

3.2.1.6 Einfluss von Cdc20 und Cdh1 auf die Stabilität von Fbxl22

Wie bereits unter 1.2.1 erwähnt, kann der APC/C mit zwei unterschiedlichen Adaptoren assoziieren, um verschiedene Substrate abzubauen. Wie im vorherigen Versuch gezeigt werden konnte, kann Fbxl22 durch das 26S Proteasom degradiert werden. Um zu überprüfen, über welche E3-Ligase Fbxl22 markiert wird, wurden zunächst die vermittelnden Co-Faktoren des APC/Cs untersucht. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden Kotransfektionsexperimente mit verschiedenen Expressionsplasmiden durchgeführt. Für die transiente Expression wurden die Plasmide pcDNA3.Fbxl22.myc, pcDNA3.Fbxl22.Ha, pCS.Cdc20.Ha und Cdh1.myc benutzt. HeLa Zellen wurden mit gleichen Mengen an Fbxl22.Myc Plasmid und unterschiedlichen Konzentrationen an Cdc20.Ha Plasmid transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen lysiert, ihre Proteinmenge mittels BCA-Assay gemessen und gleiche Mengen Protein über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden im Western Blot mittels α -myc und α -Ha Antikörper detektiert. Derselbe Versuch wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cdh1.myc aber gleichen Mengen Fbxl22.Ha durchgeführt.

Mit zunehmender Konzentration an Cdh-1 nahm die Konzentration an Fbxl22 zu, bis ein Maximum im Verhältnis von 1:2 (Fbxl22 : Cdh-1) erreicht war und die Konzentration bei weiterer Erhöhung von Cdh1 leicht abnahm (s. Abb. 21A). Demnach hat die Expression des Co-Faktors Cdh-1 eine stabilisierende Wirkung auf die Proteinstabilität von Fbxl22. Mit zunehmender Konzentration an Cdc-20 zeigte sich zuerst ein Anstieg des Proteinniveaus, fiel dann aber auf ein verringertes Niveau ab (s. Abb. 21B). Damit konnte sich die These, dass einer der beiden Co-Aktivatoren die proteasomale Degradierung von Fbxl22 vermitteln würde, nicht bestätigt werden.

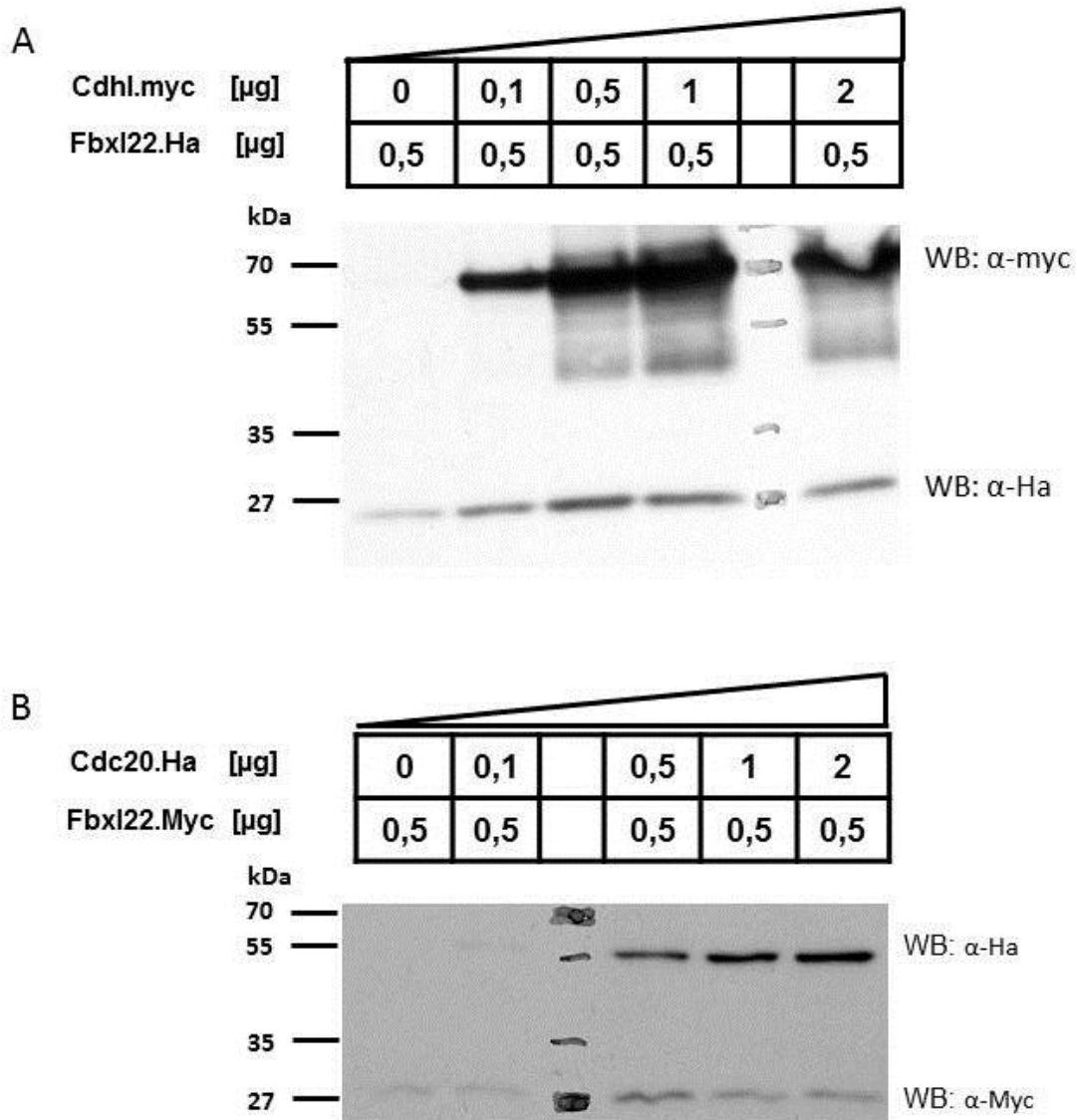


Abbildung 21: Quantitative Auswertung des Einflusses der Co-Faktoren des APC auf die Proteinstabilität von Fbxl22. HeLa Zellen wurden mit jeweils 0,5 µg Fbxl22.myc/Haund unterschiedlicher Konzentrationen eines der beiden Co-Aktivatoren transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen lysiert und ihre Proteinmenge mittels BCA-Assay quantifiziert und gleiche Menge Protein mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Für die Detektion des Proteins wurden ein anti-Myc Antikörper und ein anti-Ha Antikörper verwendet (s. Tab. 1). WB = Western Blot

3.2.1.7 Identifizierung möglicher Substrate

Um einen weiteren Einblick in die Funktion von Fbxl22 zu gewinnen, ist es von Vorteil, Substrate zu kennen, die von Fbxl22 zum Abbau markiert werden. Die Substrate könnten aufgrund ihrer Lokalisierung und ihrer Funktion neue Ideen über die mögliche Funktion von Fbxl22 in der Muskelentwicklung liefern. Um native Proteinkomplexe isolieren zu können, und diese massenspektrometrisch untersuchen zu können, wurden in der Vergangenheit verschiedene Methoden

etabliert. Eine dieser Methoden ist die „tandem affinity purification“ (TAP) Methode, die ursprünglich entwickelt wurde, um Proteininteraktionen in Hefe untersuchen zu können. Bei TAP handelt es sich um die Kombination zweier nacheinander gekoppelter Anhänge, die an verschiedene Matrices binden können (Rigaut et al. 1999). Durch die Kombination zweier Anhänge kann die Bindung falsch-positiver Proteine minimiert werden. Das ursprüngliche TAP-Motiv bestand aus einem Protein A-Motiv, gefolgt von einer TEV (tobacco etch virus) Protease Schnittstelle und einem Calmodulin-Bindungs-Peptid-Motiv. Das gesamte Motiv ist jedoch relativ groß (21 kDa) und kann zu verschiedenen Problemen führen wie zum Beispiel sterische Hindernisse, Exprimierbarkeit und Probleme bei der proteolytischen Spaltung (Gloeckner et al. 2009). Eine von Gloeckner et al. modifizierte Variante sollte diese Problematik umgehen: Das Strep/FLAG TAP (SF-TAP) Motiv kombiniert ein Tandem Streptavidin II Motiv (Skerra & T. G. Schmidt 2000) und ein FLAG-Motiv, was zu einem nur 4,6 kDa kleinen Tag führt. Das Streptavidin II Motiv hat eine hohe Affinität zu dem synthetisch hergestellten Streptavidin Derivat Strep-Tactin. Wird der gebundene Streptavidin II-Strep-Tactin Komplex mit Desthiobiotin inkubiert, Desthiobiotin ist ein Derivat von Biotin, kompetetieren beide Proteine um die Biotin Bindungsstelle des Strep-Tactin. Ist die Konzentration an Desthiobiotin sehr hoch, wird das TAP Fusionsprotein von dem Strep-Tactin eluiert. Das so aufgereinigte Fusionsprotein kann nun über den zweiten Anhang weiter aufgereinigt werden. Durch die Antikörper-Antigen-Wechselwirkung zwischen FLAG und α -FLAG wird das Fusionsprotein erneut gebunden. Wird dem Antikörper-Antigen Komplex ein FLAG Oktapeptid hinzugefügt, bindet der Antikörper mit höherer Affinität das Oktapeptid und das Fusionsprotein wird eluiert.

Es wurden 6 verschiedene Fbxl22 SF-TAP Fusionsproteine kloniert. Zwei vollständige Proteine, zwei Deletionsmutanten, welchen das F-Box-Motiv fehlt, und zwei weitere Deletionsmutanten, welchen die leuzin-reiche Domäne fehlte (s. Abb. 22A). Bei dreien wurde der Anhang am c-terminalen Ende den anderen dreien wurde der Anhang am n-terminalen Ende angefügt (s. Abb. 22A). Den n-terminalen Fusionsproteinen wurde zusätzlich ein myc Anhang angefügt um überprüfen zu können, ob die Proteine wirklich vollständig exprimiert werden. Durch Verwendung der beiden Deletionsmutanten sollte sichergestellt werden, dass keine falsch-positiven Substrate in die weiterführenden Analysen übernommen werden.

Alle 6 Konstrukte wurden im Zellkultursystem auf ihre Exprimierbarkeit hin untersucht. Die Konstrukte wurde in HeLa Zellen transfiziert und nach 48h lysiert. Die Proteine wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mittels α -myc oder α -flag Antikörper detektiert. Alle Fusionsproteine, bis auf das N-SF-TAP.Fbxl22(Δ C-Terminus) Fusionsprotein wurden im Western Blot detektiert und ihre vorhergesagten molekularen Massen stimmen mit den im Western Blot bestimmten molekularen Massen überein (S. Abb. 22B,C). Als nächstes wurde überprüft ob die Fusionsproteine aufgereinigt werden konnten. Dazu wurden HeLa Zellen mit den Expressionsplasmiden transient transfiziert und die Zellen nach 48h auf Eis lysiert. Die lysierten Fusionsproteine wurden nach Protokoll (2.11.3) aufgereinigt (s. Abb. 23).

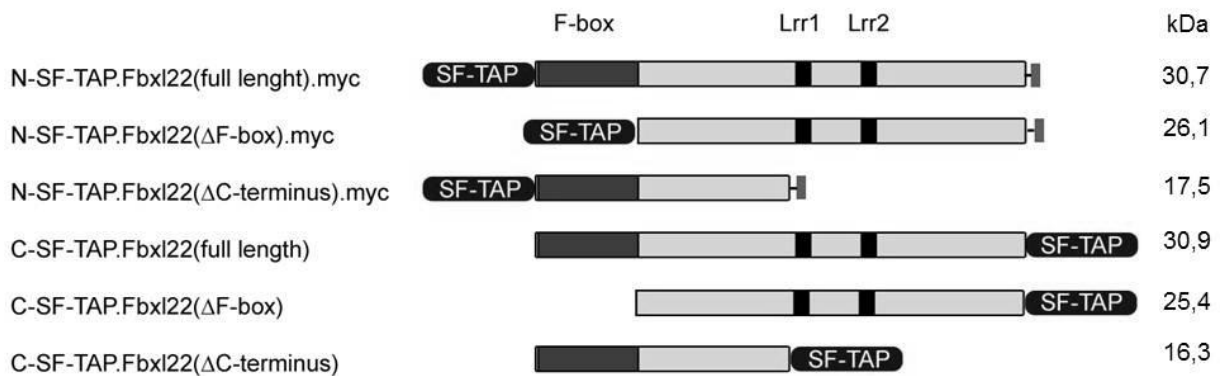
Die Expressionsanalyse der Gewebeschnitte aus Abschnitt 3.1.2 und die Analyse myogener Differenzierung aus 3.1.3 wiesen auf einen Zusammenhang zwischen *Fbxl22* und der Muskelentwicklung hin. Aus diesem Grund wurde entschieden, die folgenden Experimente in C2C12 Myoblasten durchzuführen. Aufgrund ihres Potenzials sich durch Serumentzug in Myotuben zu differenzieren, stellte diese Zelllinie das optimale System dar. Es sollte gleichzeitig dazu dienen, Unterschiede zwischen undifferenzierten Myoblasten und differenzierten Myotuben aufzuzeigen. In vorangegangenen Transfektionsexperimenten wurde die Transfektionsrate in C2C12 Zellen bestimmt. Diese lag bei nur ca. 5-10 %. Für eine massenspektrometrische Analyse sind jedoch größere Proteinmengen von Nöten um sie signifikant identifizieren zu können.

Um die benötigte Anzahl an transfizierten Zellen zu erhalten, sollten stabile Zelllinien hergestellt werden. Da die SF-TAP Expressionsplamide eine Resistenzkassette enthielten, konnte nach stabilen Klonen selektioniert werden. Die Plasmide wurden linearisiert und mit Lipofectamine 2000 in C2C12 Zellen transfiziert. Zusätzlich wurde eine Platte mit einem EGFP-Reporter-Plasmid transfiziert um die Transfektionseffizienz kontrollieren zu können. Die Transfektionsrate lag bei ca. 10 %. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Selektionsmarkers selektioniert. Die nach der Selektion übrig gebliebenen Zellen sollten das Plasmid aufgenommen haben Die wenigen Zellen wurden weiter unter Selektionsdruck gehalten, damit sie das Plasmid in ihr Genom integrieren. Nach ca. 14 Tagen haben sich aus den einzelnen Zellen große Kolonien gebildet.

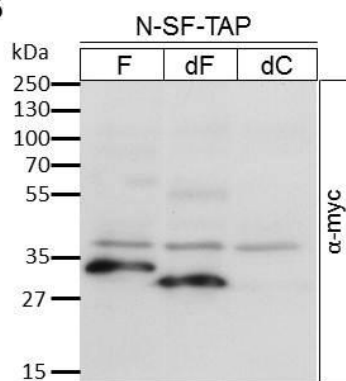
Von jedem Konstrukt wurden 5 stabile Klone gepickt und auf ihre Expressionsstärke hin untersucht. In keinem Klon der 5 Konstrukte konnten die Fusionsproteine im Western Blot detektiert werden. Daraufhin wurde eine zweite Runde gestartet in der der Selektionsdruck erhöht wurde. Aber auch in diesem Fall konnte in keinem der Klone das Fusionsprotein detektiert werden.

Um doch noch mögliche Substrate zu finden, wurde entschieden, HeLa Zellen transient zu transfizieren. 48h nach der Transfektion wurden die Zelllysate aufgereinigt. Die erhaltenen Proteineluate wurden mit der TCA-Methode gefällt, in Ladepuffer aufgenommen und über eine SDS-PAGE separiert. Das Gel wurde mit Commassie gefärbt, die sehr schwachen Banden ausgeschnitten und für die Massenspektrometrie vorbereitet (s. Abschnitt 2.11.5). Es konnten jedoch nichts mit der nötigen Signifikanz identifiziert werden.

A



B



C

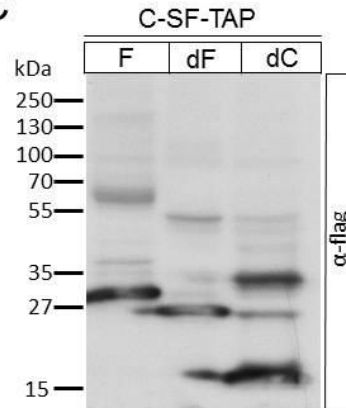


Abbildung 22: Darstellung der SF-TAP Fusionsproteine und ihrer Expression. (A), Schematische Darstellung der 6 SF-TAP Fusionsproteine und ihrer vorhergesagten molekularen Größen. Den Fusionsproteinen, die ihre Anhänge am n-Terminale Ende sitzen haben, wurden zusätzlich das myc-Anhang angefügt (kleiner grauer Balken). (B), zeigt die Expression der N-SF-TAP Fusionsproteine im Zellkultursystem welche mittels α -myc Antikörper im Western Blot sichtbar gemacht wurden. Das N-SF-TAP.Fbxl22(Δ C-Terminus) konnte nicht exprimiert werden. (C), zeigt die Expression der C-SF-TAP Fusionsproteine, welche im Western Blot mittels α -FLAG Antikörper detektiert wurden. Alle vorhergesagten molekularen Größen stimmen mit den im Western Blot detektierten überein. F = vollständige Protein; dF = delta F-Box; dC = delta c-Terminus

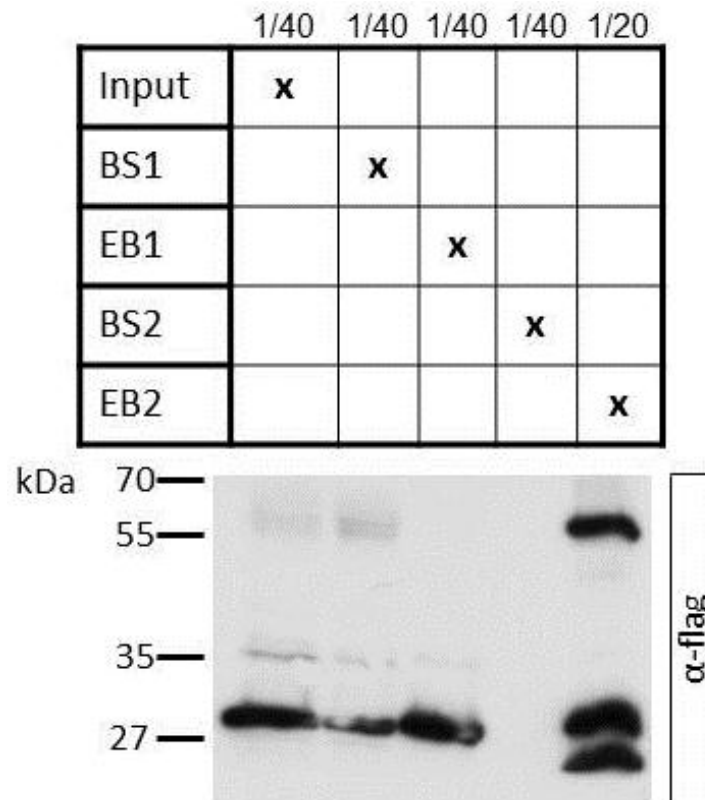


Abbildung 23: Western Blot Analyse der unterschiedlichen Fraktionen während der Aufreinigung. Die Abbildung zeigt die einzelnen Fraktionen in der Western Blot Analyse die während der Aufreinigung abgenommen wurden. In der Input Kontrolle konnte eine Bande bei 30 kDa detektiert werden (1/40 Auftragsvolumen). Die nächste Spalte zeigt die Menge an Protein, die übrig geblieben ist, nachdem über das erste Motiv aufgereinigt wurde. Es wird weiterhin eine Bande detektiert. Die 3. Spalte zeigt die Proteinmenge der über Desthiobiotin eluierten Fraktion. Die nächste Spalte zeigt den Überstand nach Bindung über das zweite Motiv. Es ist keine Bande detektierbar. Die letzte Spalte zeigt das letztendliche Eluat. 1/20 des gesamten Eluats wurde aufgetragen und das Fusionsprotein ist gut zu detektieren. Die beiden anderen Banden (unter 27 kDa und bei über 55 kDa) sind die leichte und schwere Kette der Antikörper. Hier wurde beispielhaft nur die Aufreinigung des C-SF-TAP.Fbx122 Proteins gezeigt. Die anderen Fusionsproteine verhielten sich gleich. BS1 = „bead“-Überstand 1; EB1 = Elution von „bead“ 1; BS2 = „bead“-Überstand 2; EB2 = Elution von „bead“ 2

3.2.2 *In vivo* Analyse von *Fbx122*

3.2.2.1 Klonierung eines „Knock-in“ Konstrukts

Klassische und konditionelle Gen Verlust Strategien sind eine weitverbreitete Methode, um menschliche Krankheiten oder Genfunktionen im Tiermodell untersuchen zu können. Für die Generierung einer Verlustmutante muss das Gen im Genom gelöscht oder durch ein anderes Gen ersetzt werden. Für die Herstellung eines konditionellen Verlustallels wurde eine „knock-in“ Strategie entworfen, die in den *Fbx122* Gen Locus eingebracht werden sollte. Der Zielvektor für die homologe Rekombination, ein Prozess, bei dem homologe DNS-Bereiche ausgetauscht werden, wurde generiert um in das Start ATG des *Fbx122* Exon1 integriert zu werden, das ATG mit eingeschlossen. Der Zielvektor beinhaltet einen 2,9 kB großen 5'

Homologiearm, gefolgt von einer modifizierten Cre Rekombinase Kasette, einem poly Adenylierungssignal, einer Neomycin Kasette und einem 5,4 kb 3' Homologiearm. Während der homologen Rekombination kommt es zur Rekombination zwischen der Akzeptorsequenz im Genom und den homologen Sequenzen (Homologiearme) im Zielvektor. Damit vermitteln die Homologiearme die spezifische Integration eines ORF in den Ziellokus. Durch das Einfügen einer Selektionskasette, welche z.B. für eine Antibiotikaresistenz kodiert, kann nach Zellen selektioniert werden, die den Zielvektor integriert haben. Der Zielvektor beinhaltet zusätzlich eine Cre-Rekombinase-EGFP-Fusionsprotein. Das Cre-Protein katalysiert spezifisch die Rekombination von DNS, indem es zwei „locus of X-over P1 (loxP)“ Seiten erkennt. Wird ein Sequenzbereich von zwei solcher loxP Seiten flankiert, wird dieser Bereich durch die Cre-Rekombinase herausgeschnitten. Durch das EGFP-Fusionsprotein kann die Expression auf zellulärer Ebene verfolgt werden.

Grundlage des Zielvektors war der pKS-Vektor (Fermentas). Ein DNS Fragment, welches spezifische Schnittstellen besitzt, wurde synthetisiert und über die Schnittstellen Spe1/Sac1 in den pKS Vektor subkloniert. Danach wurde der 5' Homologiearm aus BAC DNS, welche die genomische DNS von *Fbxl22* enthielt, amplifiziert und in die Sal1/EcoR1 Schnittstelle des Zielvektors eingefügt. 3' davon wurde ein 1,8 kb großes Fragment, welches für das CreEGFP Fusionsprotein (Michael Koenen, MPIMF Heidelberg) kodiert, über die EcoR1 Schnittstelle in den Zielvektor eingefügt. 3' davon wurde der 5.4 kb Homologiearm, welcher aus der BAC DNS amplifiziert wurde, über die Schnittstellen Not1/Asc1 in den Zielvektor ligiert. 3' von der CreEGFP Kasette wurde über die Schnittstellen Bcl1/Not1 eine Neomycinresistenzkasette (Rannar Airik, MHH) in den Zielvektor subkloniert. Die Neomycinresistenzkasette beherbergte eine Sequenz für Neomycinresistenz, welche von „Flippase Recognition Target (FRT) sites“ flankiert war. Die FRT Seiten werden von der Flippase-Rekombinase erkannt und eine Sequenz, die zwischen zwei FRT Seiten liegt, durch sie herausgeschnitten. Analog dem Cre-loxP System. 5' von der Neomycinresistenz gelegen lag ein poly A Signal. Das poly A Signal dient der Polyadenylierung und damit der Stabilisierung von mRNA (s. Abb. 24). Der Zielvektor wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung verifiziert. Der Zielvektor wurde die Sal1 Schnittstelle linearisiert und in die 129 cast #3 (Karin Schuster-Gossler, MHH) embryonischen Stammzellen (ES) elektroporiert (s. 2.10.7.4). 24 h nach der Elektroporation wurde dem Medium 150 µg/ml G418

beigefügt. G418 ist ein aminoglykosid Antibiotika, welches die Polypeptidsynthese von Prokaryonten, als auch von Eukaryonten blockiert. Nach ca. 7 bis 14 tägiger Kultivierung im Selektionsmedium, wurden einzelne Kolonien gepickt und trypsiniert. Eine Hälfte der trypsinierten Klone wurde auf MEFs expandiert und anschließend bei -150°C weggefroren, während die andere Hälfte auf Gelatine beschichteten Zellkulturschalen expandiert wurde und ihre DNS schließlich isoliert wurde.

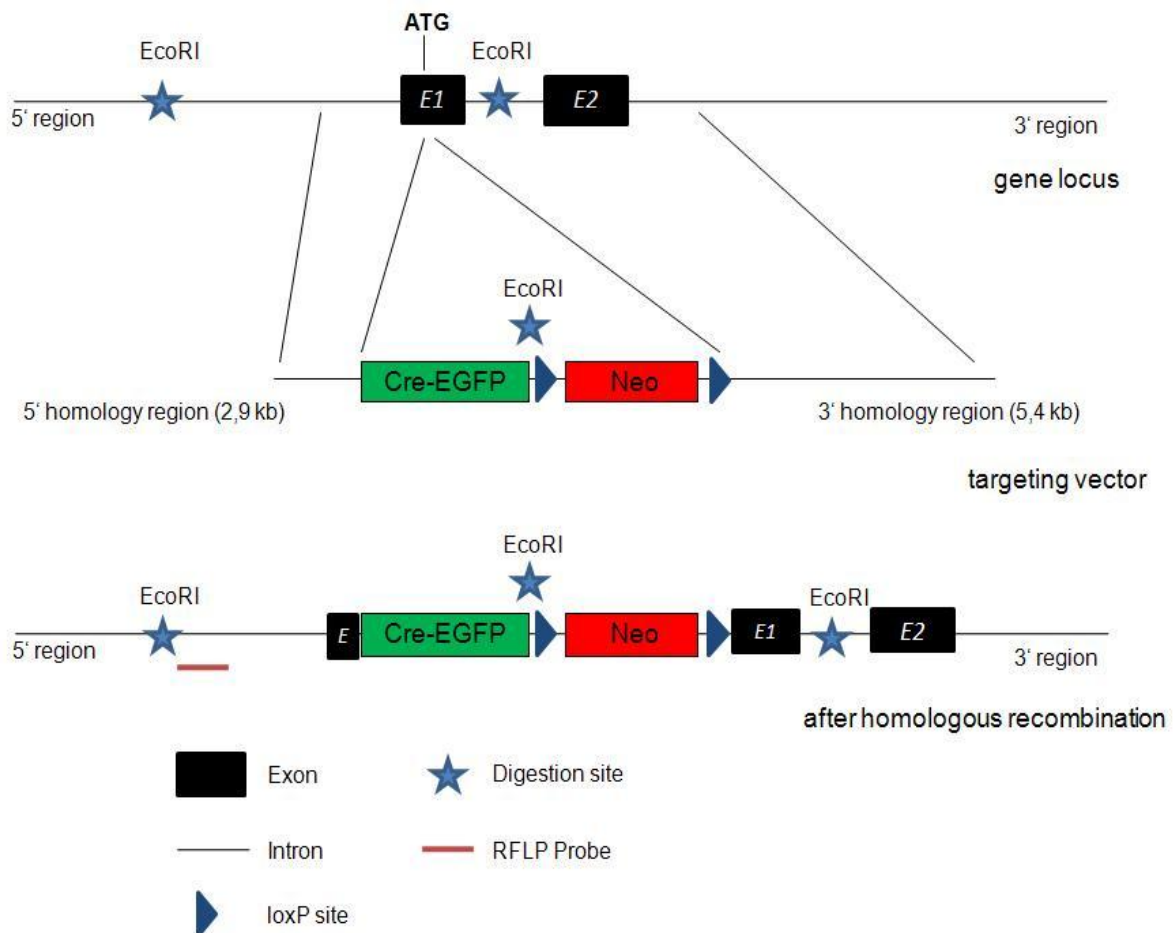


Abbildung 24: Schematische Darstellung der *Fbxl22* KI-Strategie Der obere Teil der Darstellung zeigt den murinen *Fbxl22* Locus. *EcoRI* zeigen die Restriktionsschnittstellen für die spätere RFLP Analyse. ATG kennzeichnet das für die Transkription erste Startcodon. Die mittlere Darstellung zeigt den Zielvektor mit seiner 5' Homologieregion, *CreEGFP* Fusionsprotein, welches in das vorhergesagte Startcodon integriert, gefolgt von einer Neomycin-Kassette und der 3' Homologieregion. Die untere Darstellung zeigt den *Fbxl22* Locus nach der homologen Rekombination. Die *EcoRI* Restriktionsschnittstellen zeigen die RFLP Analyse an.

3.2.2.2 Analyse embryonaler Stammzellen

Für die Suche nach korrekt integrierten Klonen wurden ca. 600 ES-Klone isoliert. Die Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) Analyse sollte korrekt integrierte Klone identifizieren. Bei der RFLP-Analyse handelt es sich um ein Verfahren, bei dem sich das Restriktionsfragmentmuster, das heißt durch

Endonukleasen Verdau erhaltene Fragmente verschiedener Größe, ändert. Dies kann z.B. durch Mutationen oder dem Austausch ganzer Chromosomenabschnitte geschehen. Dadurch wird die Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym verändert. Daraus resultiert eine Veränderung im Restriktionsfragmentmuster der verdauten DNS (Pearson 1985). Die isolierte DNS wurde mittels EcoR1 gespalten und die Fragmente auf eine Nylonmembran transferiert (Hybond XL, GE Healthcare). Die Detektion erfolgte mit einer radioaktiv markierten Sonde, einem Xho1-EcoR1-DNS-Fragment (571 bp), welches sich im 5' Bereich außerhalb des Konstruktes befand. Im 5'-Bereich sollte bei korrekt durchgeführter homologer Rekombination die RFLP Analyse zu einer Verschiebung der Fragmentlänge von 5 kb auf 3,4 kb führen. Für den 3' Bereich wurde die isolierte DNS mit EcoR5 gespalten und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion erfolgte mittels einer radioaktiv markierten Sonde, einem Afe1-Nhe1-DNS Fragment (828 bp), welches sich in der 3'-Region außerhalb des Konstrukts befand. Im 3'-Bereich führt die Verschiebung der Fragmentlänge dazu, dass aus einem 16 kb Fragment ein 5,2 kb Fragment. Bei den ca. 600 untersuchten Klonen war jedoch kein einzig korrekt rekombinierter dabei. Auch eine zweite Runde bei der ca. 550 Klone untersucht wurden, konnte kein korrekter rekombinierter Klon identifiziert werden (s. Abb. 25). Aus diesem Grunde sollten kaufbare KO-ES Zellen erworben werden. Die daraus gewonnenen Chimären erzeugten jedoch keinen chimären Nachwuchs.

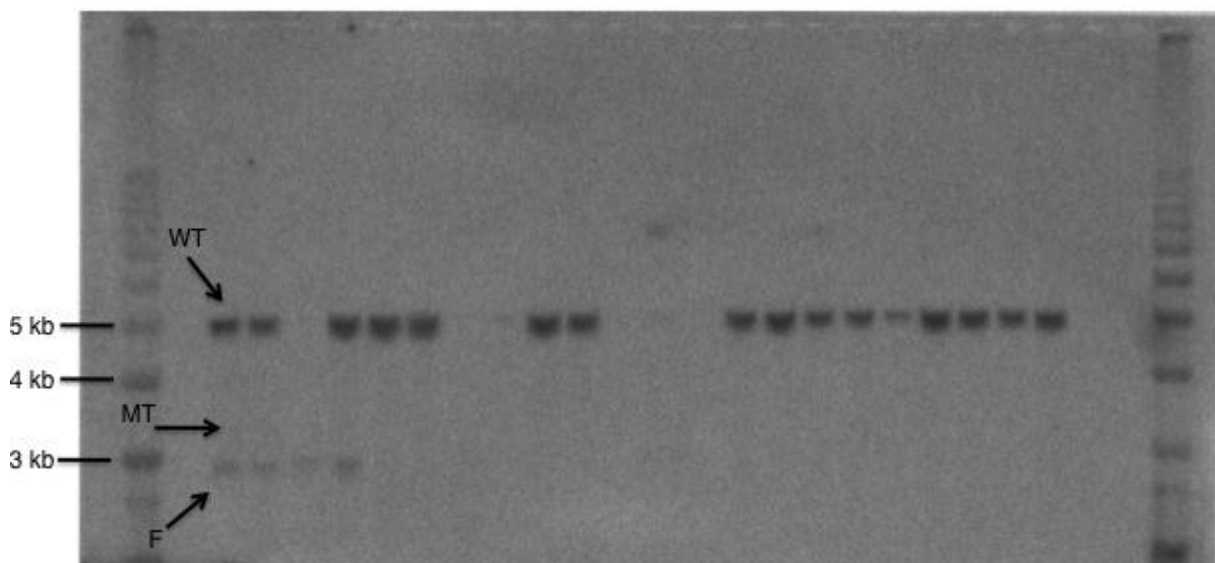


Abbildung 25: Southern Blot „Screen“. Die Abbildung zeigt einen Southern Blot der ES Zellen nach erfolgter Selektion. Die Bande bei 5 kb ist die Wildtypbande, bei 3,4 kb sollte die Mutantenbande laufen und die Bande unter 3 kb ist eine falsch-positive Bande. Außen links und rechts ist der Marker. WT = Wildtyp; MT = Mutante; F = falsch-positiv

3.2.2.3 Klonierung und Analyse zweier Misexpressionskonstrukte

Eine weitere Möglichkeit etwas über die Funktion von Genen zu erfahren ist der Ansatz der Misexpression. Hierfür wird das Gen in den Lokus eines ubiquitär exprimierenden Gens eingebracht. In diesem Fall, sollte der offene Leseraster des Gens *Fbxl22* und seine dominant-negative Form in den *Hprt* Lokus eingebracht werden. Zu diesem Zweck wurde eine spezielle Stammzelllinie benutzt, der das *Hprt* Gen fehlt (E14TG2Δ). Durch homologe Rekombination integriert der Vektor in die ES und stellt das *Hprt* Gene wieder her. Purine werden auf zwei Wegen in der Zelle synthetisiert. Zum einem *de novo* und der über den Salvage Weg. Die HPRT übernimmt bei dieser Aufgabe eine wichtige Schlüsselfunktion. Um nach Klonen zu suchen, die den Vektor korrekt rekombiniert haben, werden die Klone über HAT selektioniert. Aminopterin (A in HAT) ist eine aktive Komponente in diesem System. Es blockt die Aktivität des Enzym Dihydrofolatreduktase (DHFR), einem Schlüsselenzym im *de novo* Weg, und inhibiert damit die Purinsynthese über diesen. Dadurch verbleibt als einziger Weg für die Purinsynthese der Salvage Weg. Nur mit einer intakten *Hprt* zusammen mit den Vorläufermolekülen Hypoxanthin und Thymidin kann die Zelle Purine synthetisieren und damit überleben. Ein nicht korrekt wiederhergestelltes *Hprt* Gene führt zum Verlust der Salvage Weges und damit zum Verlust der Purinsynthese (Lehrbuch der Biochemie, Voet 2001).

Ein nach Dr. Henner Farin modifiziertes Konstrukt wurde als Grundlage für Klonierung benutzt. Mit den Oligonukleotiden AKO1804/AKO1806 oder AKO1804/AKO1806 wurden mittels PCR Amplifikation Fragmente der offenen Leseraster mit geeigneten Schnittstelle hergestellt. Diese wurden in den Shuttle Vektor psl.1180 (GE-Healthcare) über die Schnittstellen Nhe1/Nde1 subkloniert. Über die Schnittstellen Mlu1/Swa1 wurde ein 2,5 kB großes Fragment herausgeschnitten und in die Mlu1/Swa1 Seite des finalen Vektors pMP8.CAG-Stop (P03966) kloniert. Die beiden Konstrukte wurden über die Sal1 Schnittstelle linearisiert und in die ES elektroporiert. Die Selektion wurde über HAT/HT realisiert, 10 Klone gepickt und auf ihre korrekte Integration hin überprüft. Die Klone wurde über PCR Genotypisierung überprüft, indem der erste Primer (AKO2017) 5' zur 5' Homologieregion bindet und der zweite Primer (AKO1993) im CAG Promoter des Konstrukts. Nach homologer Rekombination und korrekter Integration sollte ein Fragment mit der Größe 4,4 kB entstehen (s. Abb. 26).

Das finale Konstrukt besteht aus einer bicistronischen Expressionskassette, welche aus dem offenen Leseraster von *Fbxl22*, gefolgt von einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) und einem Venus Reporter, besteht. Durch die umgedrehte Anordnung relativ zum CAG Promoter wird eine ungewollte Expression verhindert. Nur durch Cre-Rekombinase vermittelte Inversion, gefolgt von einem irreversiblen Schneideschritt zwischen dem loxP Paar und dem loxM Paar, führt zur Lokalisierung des offenen Leserasters in die richtige Orientierung bezüglich des CAG Promoters und damit zu einer ubiquitären Expression (s. Abb. 27).

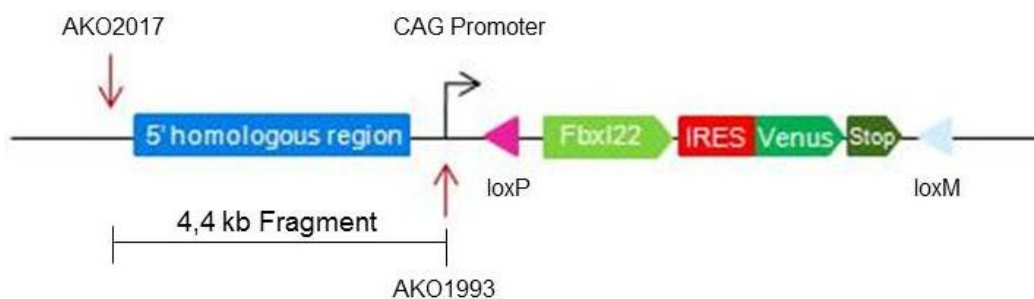


Abbildung 26: Schematische Darstellung der „Screening“-Strategie zur Identifizierung korrekter Klone. Gezeigt ist die Strategie zur Suche nach korrekten Klonen. Dabei bindet Primer AKO2017 im *Hprt* Locus und der zweite Primer im CAG Promoter. Das daraus entstehende Fragment hat eine Größe von 4,4 kb.

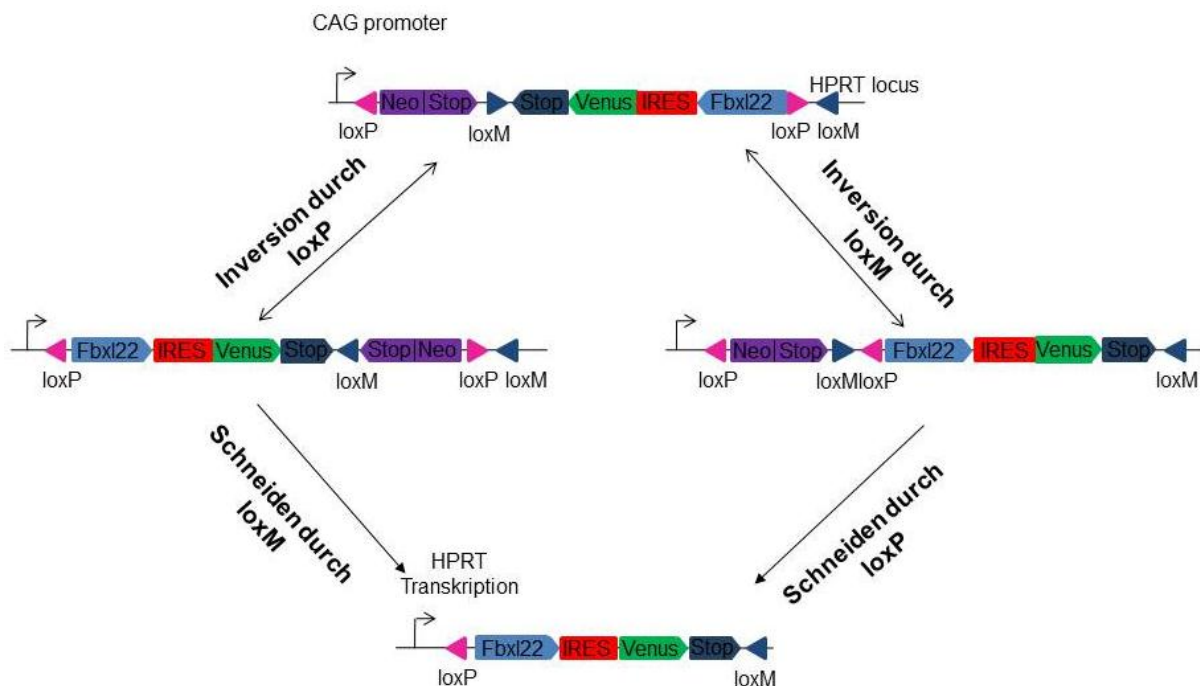


Abbildung 27: Schematische Darstellung der konditionellen Misexpression von *Fbxl22* vom *Hprt* Locus. Gezeigt ist der genomische *Hprt* Locus nach homologer Rekombination in ES. Das Konstrukt hat eine

bicistronischen Expressionskassette, welche aus dem offenen Leseraster von *Fbxl22* gefolgt von einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) und dem offenen Leseraster von Venus, besteht. Die umgedrehte Anordnung relativ zum CAG Promoter verhindert ungewollte Expression. Nur durch Cre-Rekombinase vermittelte Inversion, gefolgt von einem Schneideschritt, führt zu ubiquitäre Expression.

Um den Effekt der Misexpression auf bestimmte Gewebe zu beschränken, können Cre Linien benutzt werden, die unter dem Promoter spezifisch exprimierter Gene stehen. Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, gezielt Gene in unterschiedlichen Gewebetypen und zu bestimmten Zeitpunkten, zu exprimieren.

3.2.2.4 Misexpression des vollständigen Proteins in allen Zellen

3.2.2.4.1 Morphologische Analyse von *Tbx3^{cre/+}; Hprt^{Fbxl22/Fbxl22}* Mäusen bei P180

Um einen besseren Einblick in Rolle von *Fbxl22* zu erhalten, sollten die Auswirkung der Misexpression von *Fbxl22* untersucht werden. Für diesen Zweck wurde ein transgener Ansatz gewählt, bei der eine inaktivierte bicistronische Expressionskassette, die den offenen Leseraster von *Fbxl22* enthält, gefolgt von einer *IRES-GFP* Kassette die in den ubiquitär exprimierenden *Hprt* Lokus integriert wurde (s. Abb. 27). Durch Cre induzierte Rekombination wurde die Expressionkassette neu ausgerichtet, so dass *Fbxl22* stromabwärts des starken CAG Promoters lag, was zu einer starke Expression von *Fbxl22* und einer gleichzeitigen Expression von EGFP in Zellen führte. Die Expression von dem X-chromosomalen *Hprt*-Lokus resultiert in einem chimär transgenen Expression in heterozygoten Weibchen aufgrund der ungeordneten X-chromosomalen Inaktivierung während der frühen Embryogenese. Dieses genetische System ermöglicht die Analyse transgen exprimierender Zellen im Wildtyp Hintergrund, ähnlich dem *Drosophila*-Typ Mosaikmodell, während in hemizygoten Männchen das Transgene in allen Cre positiven Zellen exprimiert wird.

Für die Aktivierung der transgenen Expression, wurde die *Tbx3::cre* Mauslinie benutzt, in der die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des *Tbx3* Lokus steht und damit bereits in der Blastozyste exprimiert wird (Hoogaars et al. 2007). Dadurch wird die ubiquitäre Expression von *Fbxl22* sichergestellt. Die ubiquitäre Expression wurde mittels semiquantitativer RT-PCR Analyse in P180 alter Leber und Lunge nachgewiesen. In beiden Organen war die Expression in der Mutante um das ca.

1000-5000 fache höher als im Wildtyp (s. Abb. 28). Die Aktivierung mit Hilfe der *Tbx3::cre* Linie führt somit zu einer Misexpression in Organen, in denen normalerweise kein *Fbxl22* oder nur ein geringes Maß exprimiert ist.

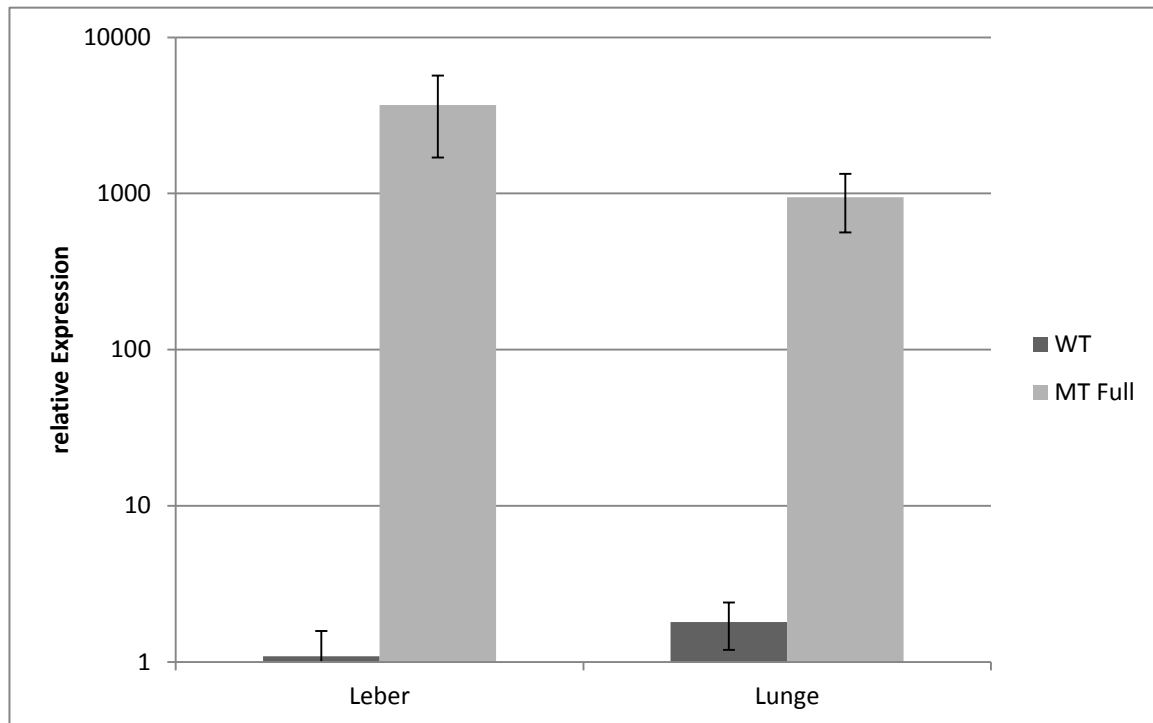


Abbildung 28: Darstellung der Expression von *Fbxl22* nach *Tbx3cre* induzierter Misexpression mit Hilfe der semi-quantitativen RT-PCR. Gezeigt sind semiquantitative RT-PCR Analysen von Leber und Lunge P180 alter Mutanten- und Kontrollmäuse. Die blauen Balken zeigen WT Expression, während die roten Balken MT Expression zeigen. Die Y-Achse ist logarithmisch skaliert. Die Mutantenmäuse exprimieren *Fbxl22* stark über. MT = Mutante; WT = Wildtyp

Diese *Tbx3^{cre/+}; Hprt^{Fbxl22/y}* Mäuse wurden überraschenderweise geboren und überlebten mindestens 6 Monate (P180). Da in den vorangegangenen Ergebnissen der Verdacht auf eine Zellzyklus abhängige Regulation aufkam, sollte als nächstes der Effekt der Misexpression auf das Wachstumsverhalten analysiert werden. Die Mäuse wurden alle 30 Tage gewogen und eine Wachstumskurve erstellt (s. Abb. 29). Die Transgenmäuse zeigten bei P30 eine 10 % ige Gewichtsreduktion verglichen mit der Kontrollgruppe. Dieser Effekt blieb bis zum Alter von 6 Monaten bestehen.

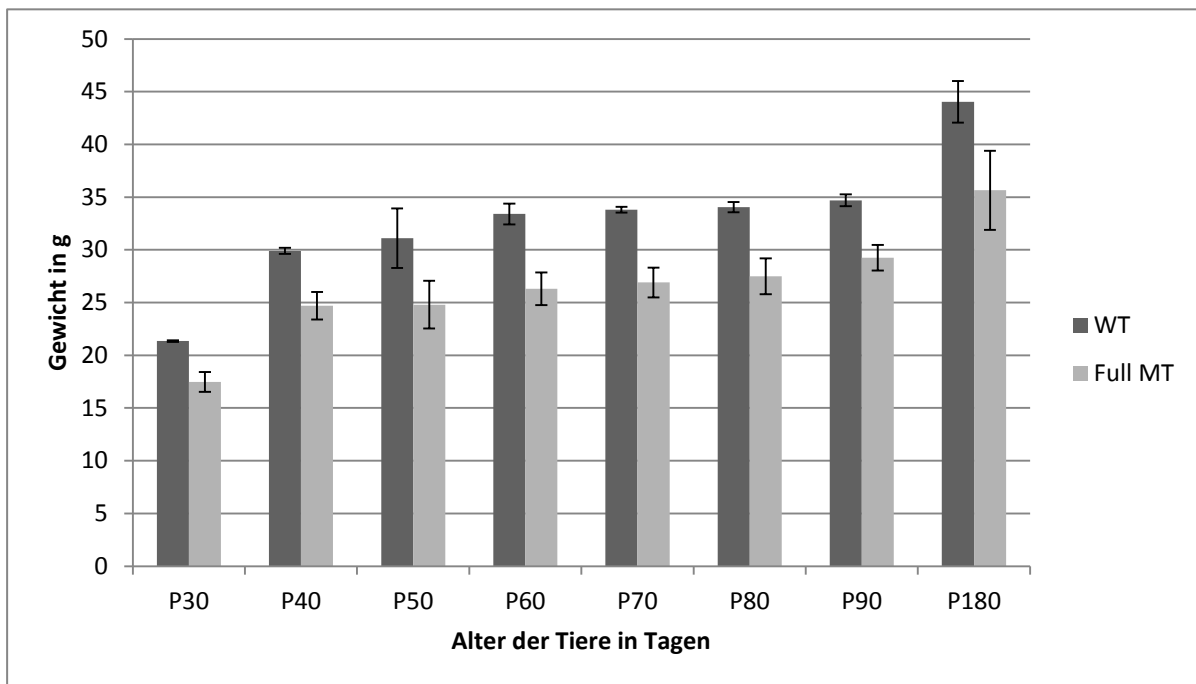


Abbildung 29: Gezeigt ist das Wachstumsverhalten *Tbx3cre* induzierter Misexpressionsmäuse. Die blauen Balken zeigen das Gewicht von Wildtyp-Mäusen und die roten Balken zeigen das Gewicht von Mutanten-Mäusen. Die Transgenmäuse zeigen eine Gewichtsreduktion um 10% vom Alter P30 an. Diese Gewichtsreduktion hält sich bis zum Alter P180. P steht für postnatal. MT = Mutante; WT = Wildtyp; Full = vollständige Protein

Um den Effekt der Misexpression auf die drei unterschiedlichen Muskeltypen zu untersuchen, wurden drei verschiedene Beispielorgane analysiert. Das Herz sollte Aussagen über Veränderungen in den Kardiomyozyten beantworten, während die Zunge einen Einblick in die Skelettmuskeln bieten sollte. Um den Einfluss auf glatte Muskeln untersuchen zu können wurde als drittes Organ die Blase gewählt. Um den maximalen Effekt eines Phänotyps zu erreichen, sollten die Mäuse zu einem möglichst späten Zeitpunkt untersucht werden. Begonnen wurde mit der morphologischen Untersuchung bei Tag P180. Während Blase und Zunge keine offensichtlichen Veränderungen zeigten (s. Abb. 30A,B), erschien das Herz kleiner zu sein (s. Abb. 31). Die Analyse des Gewichts des Herzens und zweier Kontrollorgane, der Leber und der Milz, ergab eine Gewichtsreduktion in der Mutante (s. Abb. 32). Das Herz zeigte eine Gewichtsreduktion von 26 %, die Leber von 35 % und die Milz von 20 %. Nachdem die Werte jedoch zum Gesamtgewicht der Mäuse relativiert wurden zeigten sich keine Unterschiede zu der Kontrollgruppe (s. Abb. 32). Weitere Einblicke sollten histologische Untersuchungen erbringen.

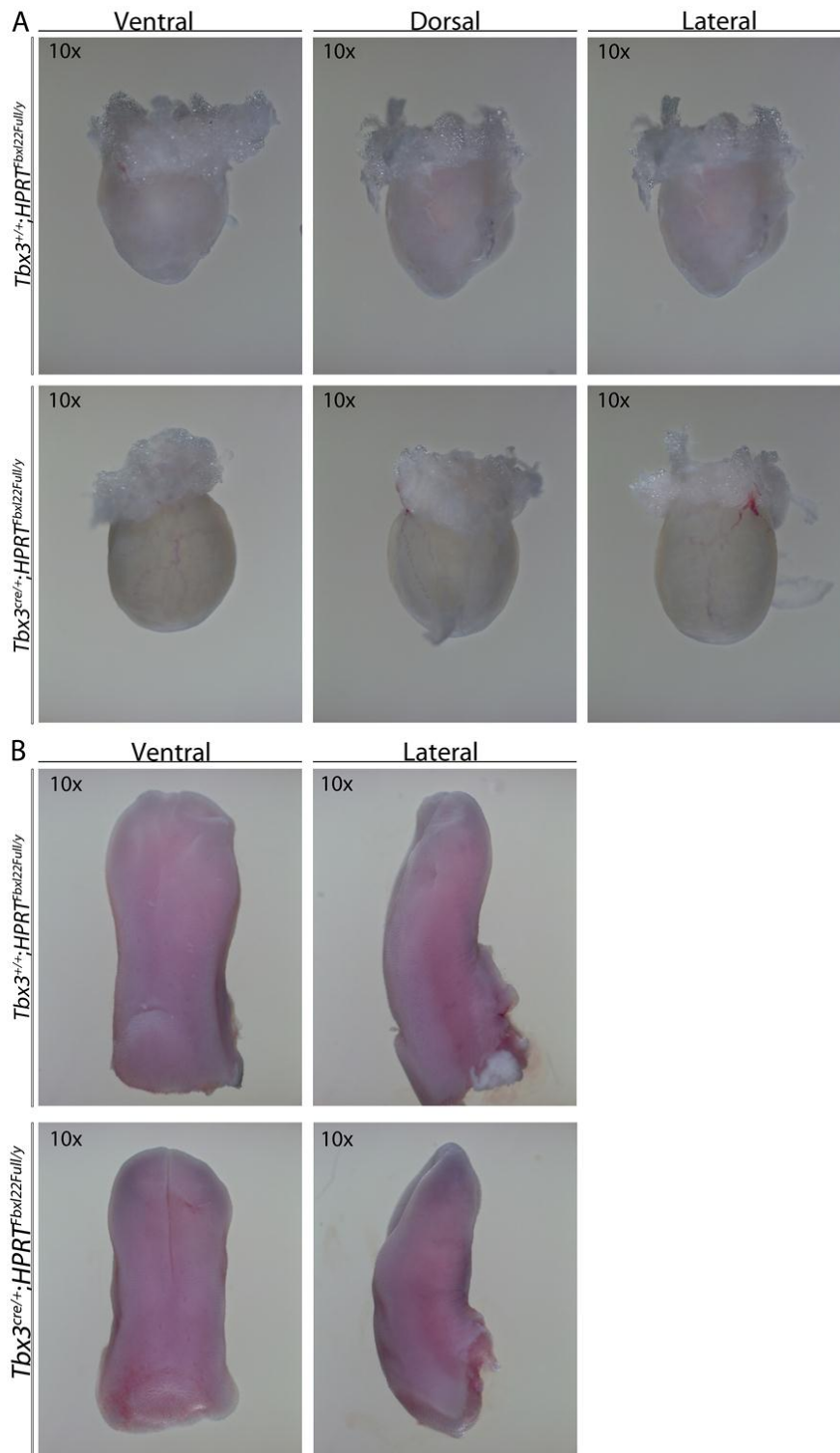


Abbildung 30: Die Misexpression von *Fbx122* in Blase und Zunge zeigt keine morphologischen Unterschiede. Die Organe Blase (A) und Zunge (B) im Alter P180 zeigen keine morphologischen Veränderungen. Die Blase wurde mit der Vergrößerung 10x aufgenommen und ventral, dorsal und lateral dargestellt (A). Die Zunge wurde mit der Vergrößerung 10x aufgenommen und ventral und lateral dargestellt.

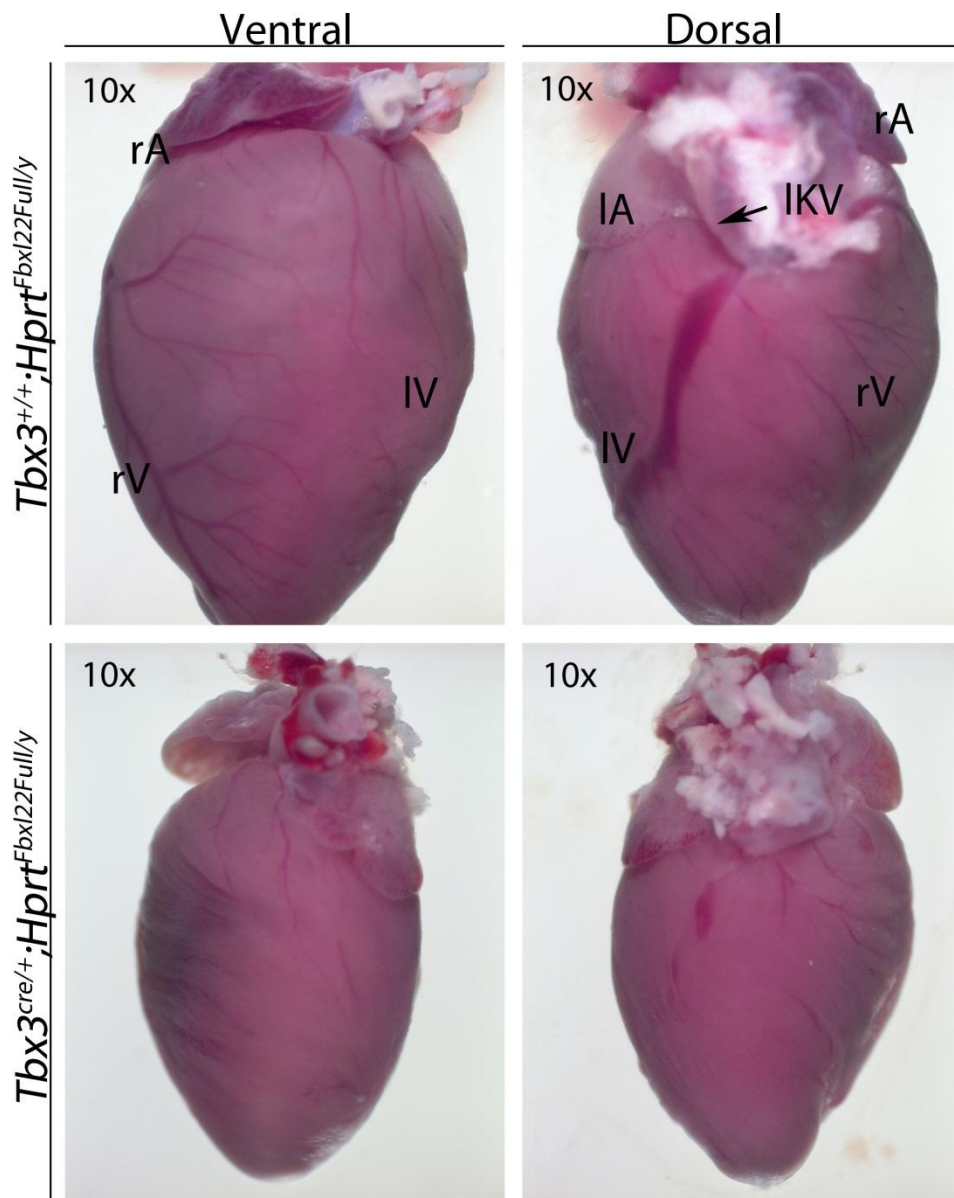


Abbildung 31: Sechs Monate alte Herzen zeigen einen Größenunterschied zur Kontrollgruppe. Gezeigt sind 6 Monate alte Herzen. Die Wildtyp-Herzen sind deutlich größer. Beide Organe wurden mit der Vergrößerung 10x aufgenommen. rV = rechter Ventrikel; IV = linker Ventrikel; rA = rechtes Atrium; IA = linkes Atrium; IKV = linke Kavalvene

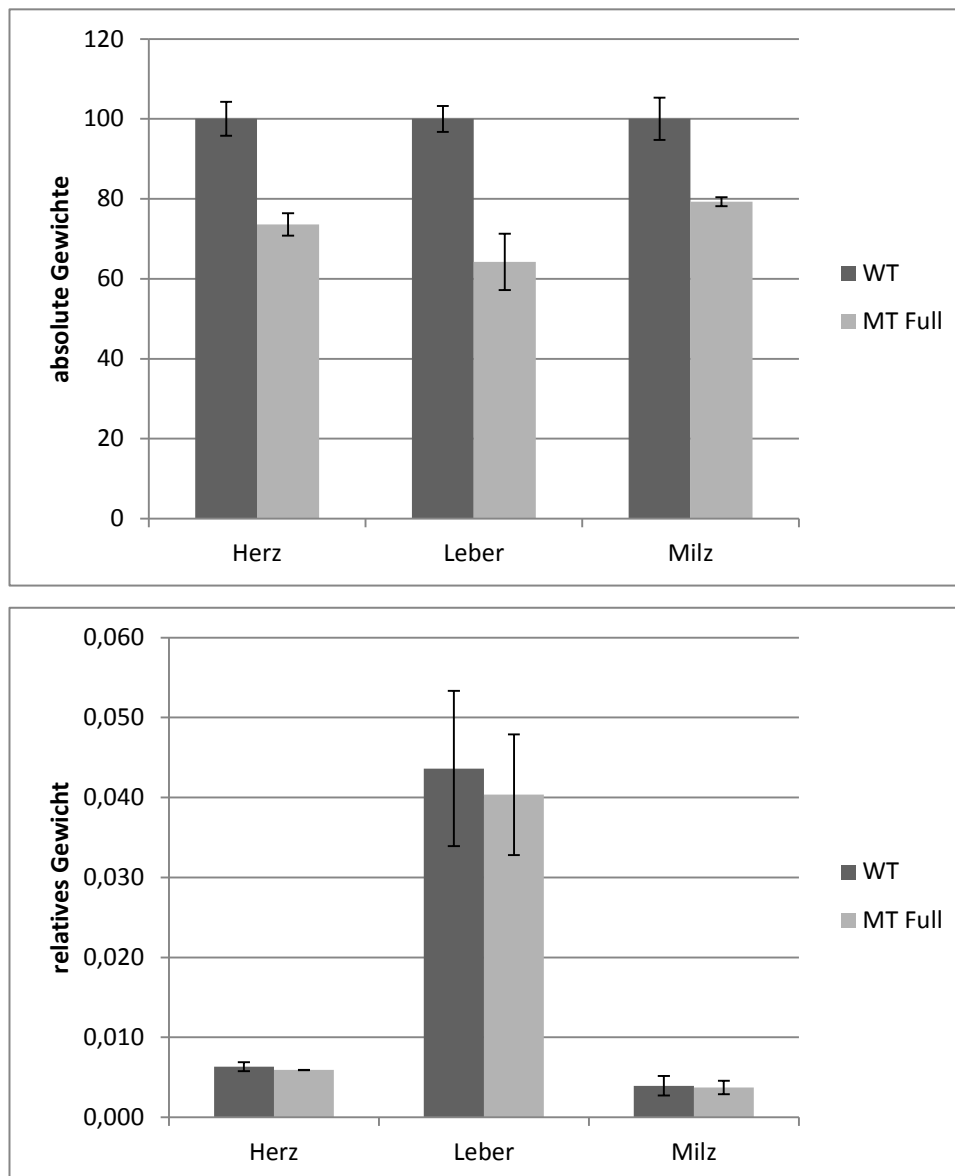


Abbildung 32: Das absolute Gewicht der Mutanten-Herzen unterscheidet sich um 26 % gegenüber den Wildtyp-Herzen. Obere Abbildung, das Gewicht der Mutanten-Herzen ist um 26 % kleiner als bei der Kontrollgruppe. Der Effekt ist noch deutlicher bei der Leber ausgeprägt. Die Gewichtsreduktion beträgt 35 %. Die Milz zeigt eine Gewichtsreduktion von 20 %. Untere Abbildung, gezeigt sind die relativen Gewichte, normalisiert auf das gesamte Körpergewicht. Die normalisierten Gewichte der Mutanten-Organen unterscheiden sich nicht von denen der Kontroll-Organen.

Die histologische Analyse des Herzens bei P180 zeigte in der Mutante eine normale Entwicklung der Ventrikel, Atrien, Septen und Klappen (s. Abb. 33). Zum Färben von Kollagenen wurden Sirius-rot Färbungen durchgeführt. Es konnte jedoch kein Unterschied zu den Kontrollmäusen festgestellt werden (s. Abb. 33). Eine weitere Färbemethode stellt die Masson-Tri-Chrome Färbung dar. Sie färbt nicht nur Kollagene, sondern Extrazellulär-Matrix-Proteine im Allgemeinen. Aber auch hier konnten keine Unterschiede festgestellt werden (s. Abb. 33). Die Analyse mittels

Sirius-rot oder Tri-Chrom Färbung der Blase und der Zunge zeigte keine Veränderungen (s. Abb. 34).

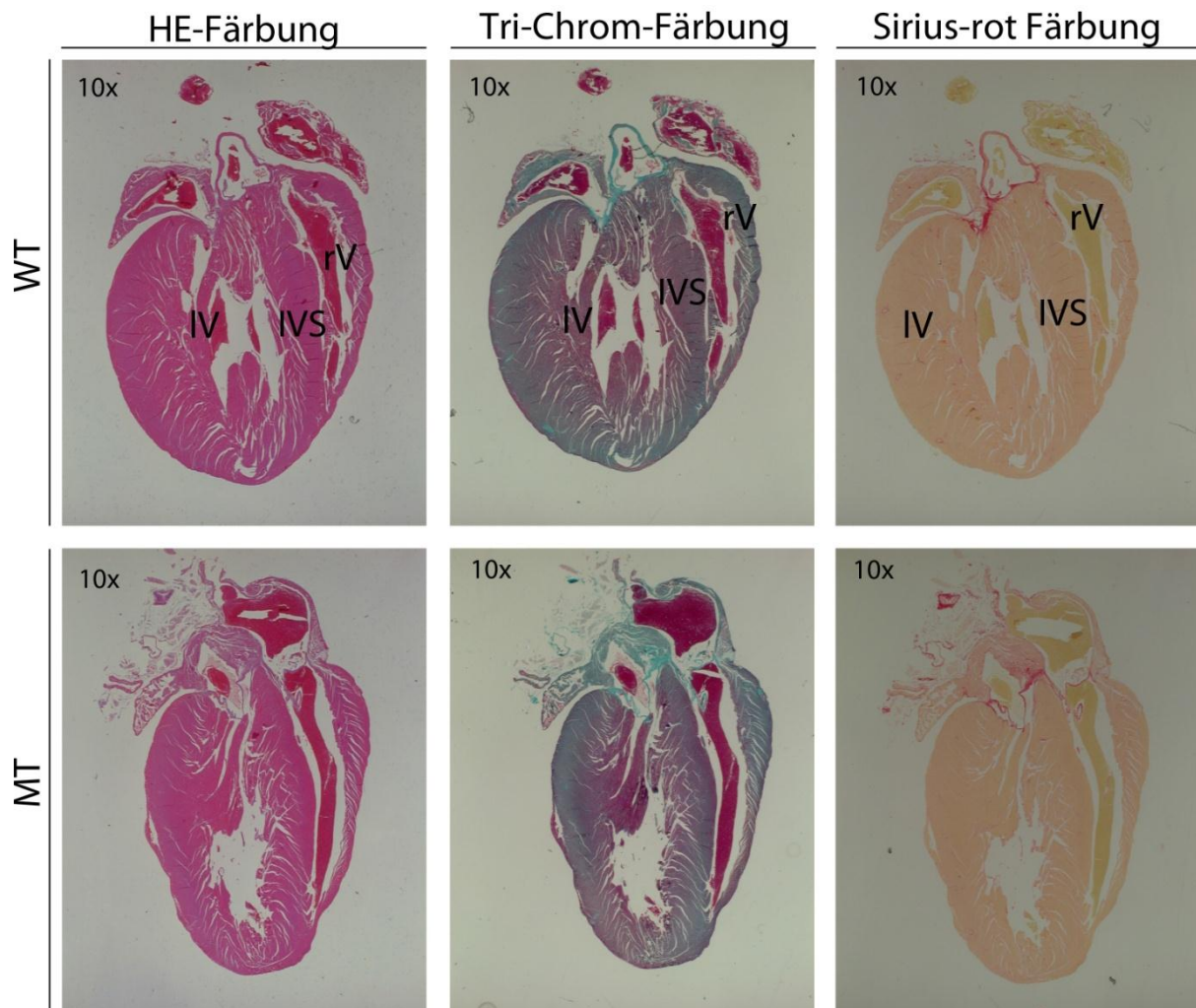


Abbildung 33: Histologische Färbungen zeigen keine Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp. Gezeigt sind histologische Färbungen sechs Monate alter transvers geschnittener Herzen. HE, Tri-Chrom und Sirius-rot Färbungen zeigen keine Unterschiede im Färbeverhalten. IV = linker Ventrikel; rV = rechter Ventrikel; IVS = interventikuläres Septum



Abbildung 34: Die Histologische Analyse mit Hilfe von drei Färbemethoden zeigen keinen Unterschied der Blase und Zunge. Obere Abbildung. Gezeigt sind sechs Monate alte Blasen transvers geschnitten und mit Hilfe von HE, Tri-Chrom und Sirius-rot gefärbt. Es sind keine morphologischen Unterschiede festzustellen. Untere Abbildung. Gezeigt sind sechs Monate alte Zungen transvers geschnitten. Keine der drei Färbemethoden zeigte Unterschiede in der Morphologie. D = Dertusor; U = Urothel; PL = Lamina Propria; PE = Plattenepithel; ZS = Zungenspitze; M = Muskulatur

3.2.2.4.2 Morphologische Analyse von $Tbx3^{cre/+}; Hprt^{Fbxl22/Fbxl22}$ Mäusen bei P90 und P30

Da die Wachstumsanalyse bereits Veränderung zu früheren Zeitpunkten zeigte, sollten Herz, Zunge und Blase bei Tag P90 analysiert werden, um einen möglichen frühen und transienten Phänotyp nicht zu verpassen. Die Analyse von Blase und Zunge zeigten keine morphologischen Veränderungen zu diesem Zeitpunkt (s. Abb. 35A,B). Die Morphologie des Herzens war jedoch leicht verändert (s. Abb. 35C). Wie schon beim Alter P180 war das Herz etwas kleiner. Wie zu erwarten war, ergab die Gewichtsmessung aller drei Organe eine Gewichtsreduktion verglichen mit der Kontrollgruppe (s. Abb. 36). Nachdem die Gewichte auf das Gesamtgewicht normalisiert wurden, ergaben sich keine Unterschiede (s. Abb. 36).

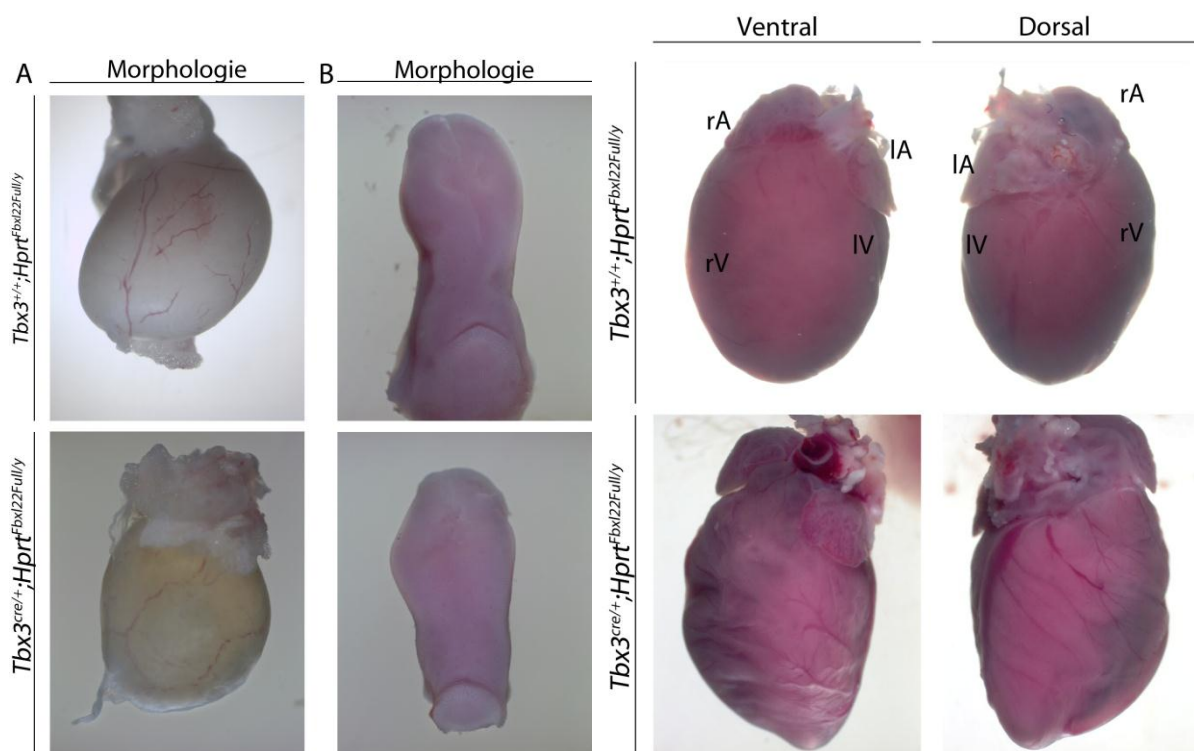


Abbildung 35: Morphologische Analyse von Blase (A), Zunge (B) und Herz (C). Gezeigt sind makroskopische Aufnahmen einer sechs Monate alten Blase (A), Zunge (B) und Herz (C). Gezeigt ist die laterale Ansicht der Blase (A) und Aufsicht der Zunge (B). Es sind keine morphologischen Unterschiede sichtbar.

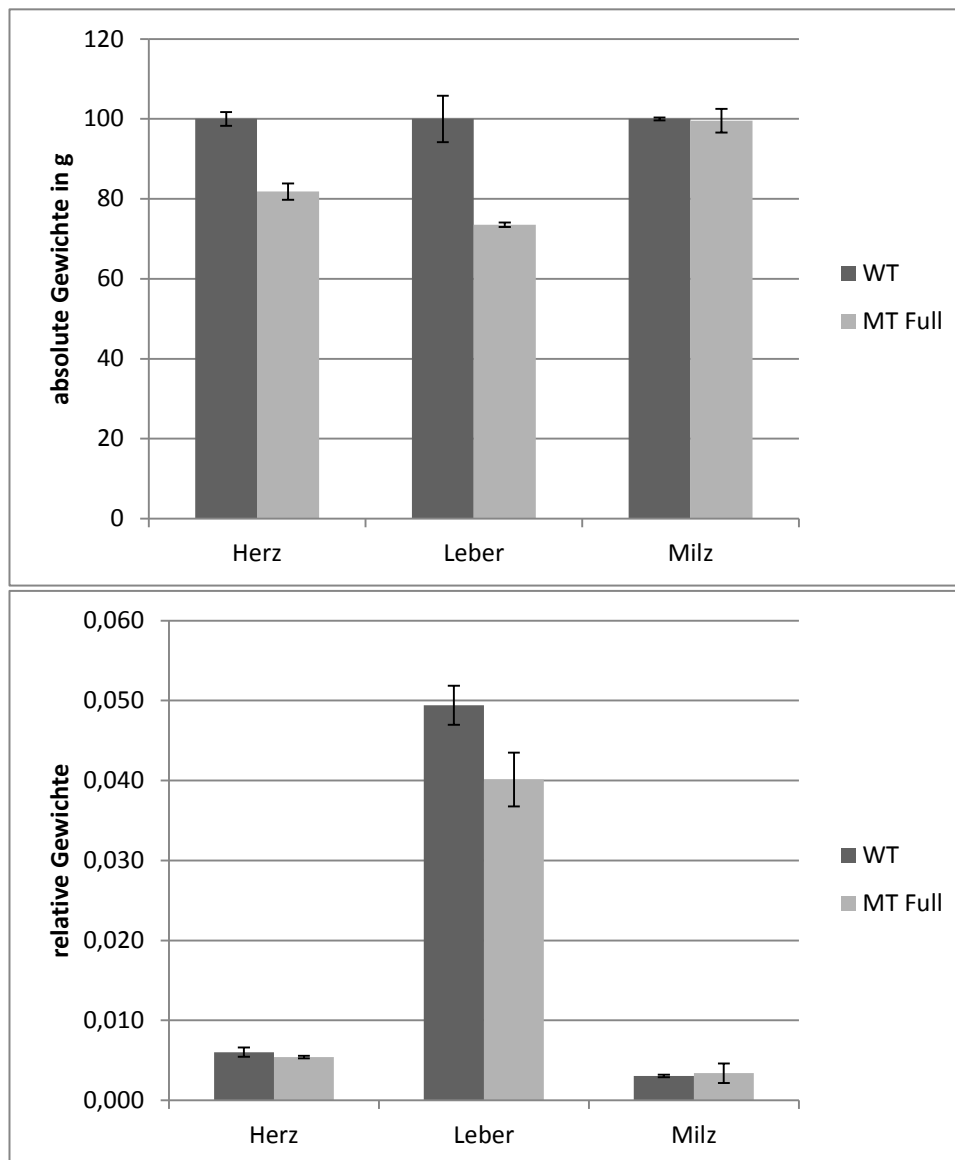


Abbildung 36: Gewichtsmessungen zeigen Unterschiede in den Absolutwerten, jedoch nicht in den Relativwerten von Herz, Leber und Milz. Obere Balkendiagramm. Gezeigt sind die absoluten Gewichte von Herz, Leber und Milz. Zwei Organe unterscheiden sich im Gewicht von den Kontrollen. Das Mutanten-Herz ist 18 % leichter und die Leber 22 % leichter als die Kontrollen, während die Milz keinen Gewichtsunterschied zeigt. Das untere Balkendiagramm zeigt die relativen Gewichte aller drei Organe. Bei den relativen Gewichten kann kein Unterschied festgestellt werden.

Die histologische Untersuchung von Zunge und Blase mittels HE, Tri-Chrom und Sirius-rot erbrachte keine neuen Erkenntnisse (s. Abb. 37). Das Herz hingegen zeigte eine leichte Größenreduktion (s. Abb. 38).

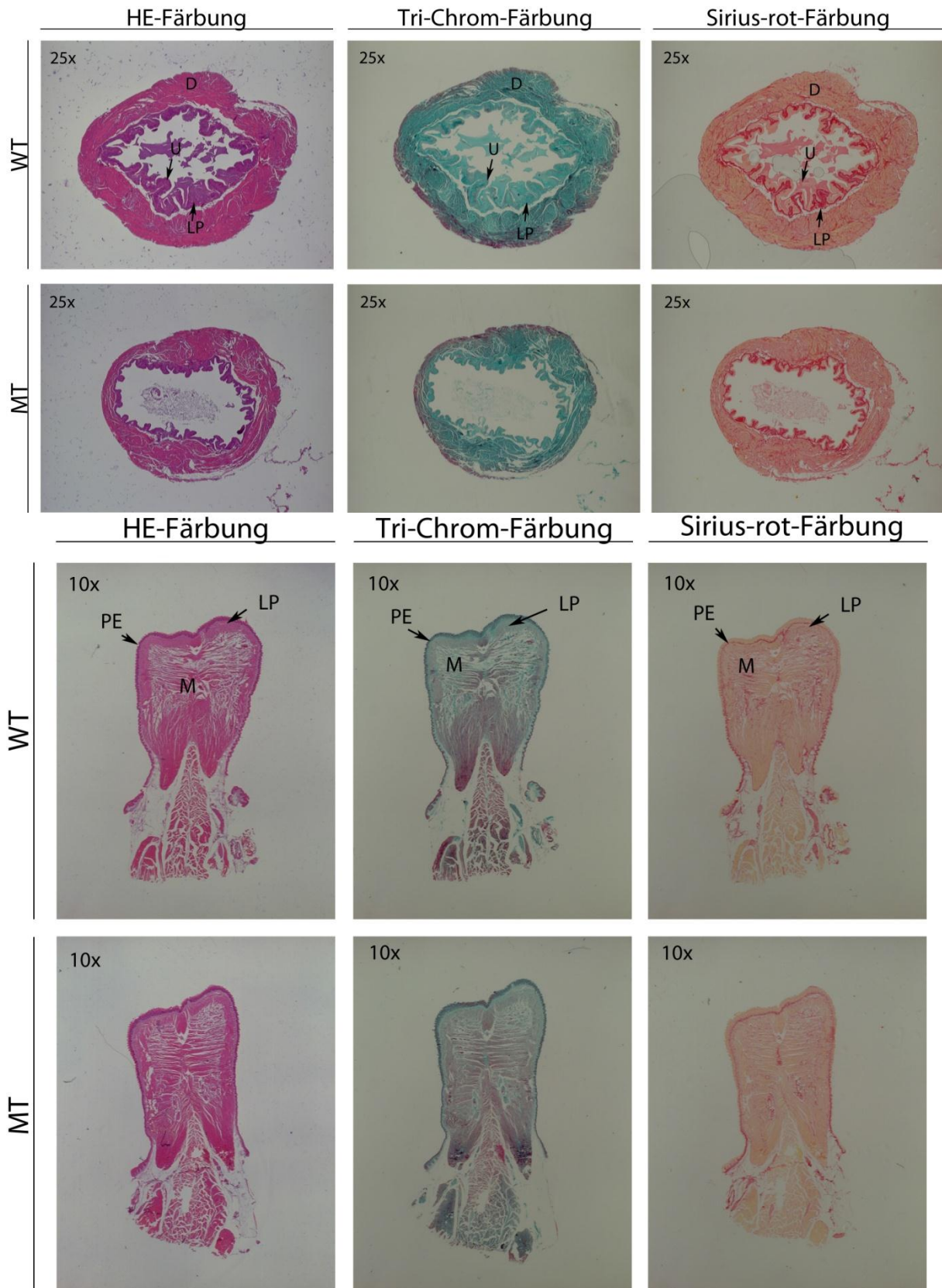


Abbildung 37: Die histologische Analyse von Blase und Zunge zeigt keine Unterschiede in den drei Färbemethoden. Obere Abbildung. Gezeigt sind drei Monate Blasen transvers geschnitten und mit HE, Tri-Chrom und Sirius-rot gefärbt. Es sind keine Unterschiede in der Morphologie zu sehen. Untere Abbildung. Gezeigt sind drei Monate alte transvers geschnittene Zungen, die mit HE, Tri-Chrom und Sirius-rot gefärbt wurden. Es lassen sich keine Unterschiede in der Morphologie feststellen. D = Detrusor; LP = lamina propria; U = Urothel; PE = Plattenepithel; M = Muskulatur



Abbildung 38: Die Größe der Mutanten-Herzen ist leicht verkleinert. Die Abbildung zeigt drei Monate alte Herzen, welche transvers geschnitten wurden und mit HE, Tri-Chrom und Sirius-rot gefärbt wurden. Gezeigt sind makroskopische Aufnahmen. Die Größe der Herzen ist leicht reduziert. Weitere Unterschiede sind nicht erkennbar. IV = linker Ventrikel; rV = rechter Ventrikel; IVS = interventrikuläres Septum

Von einigen F-Box-Proteinen ist bekannt, insbesondere MuRF1, ein Kandidat der MuRF Familie, dass sie eine Funktion bei der Degradierung einzelner Komponenten des myofibrillären Apparats haben (McElhinny et al. 2004). Um einen möglichen Effekt von *Fbxl22* auf die Myofibrillen untersuchen zu können, wurden Ultrastrukturanalysen durchgeführt (in Zusammenarbeit mit Pro. Dr. Schmiedl von der Funktionellen und Angewandten Anatomie, MHH). Wie aus Abbildung 39 ersichtlich ist, waren die Myofibrillen, Mitochondrien und die Verbindungen zwischen den Myofibrillen nicht verändert. Die Verteilung (Homogenität) der Myofibrillen zeigte keine Auffälligkeiten.

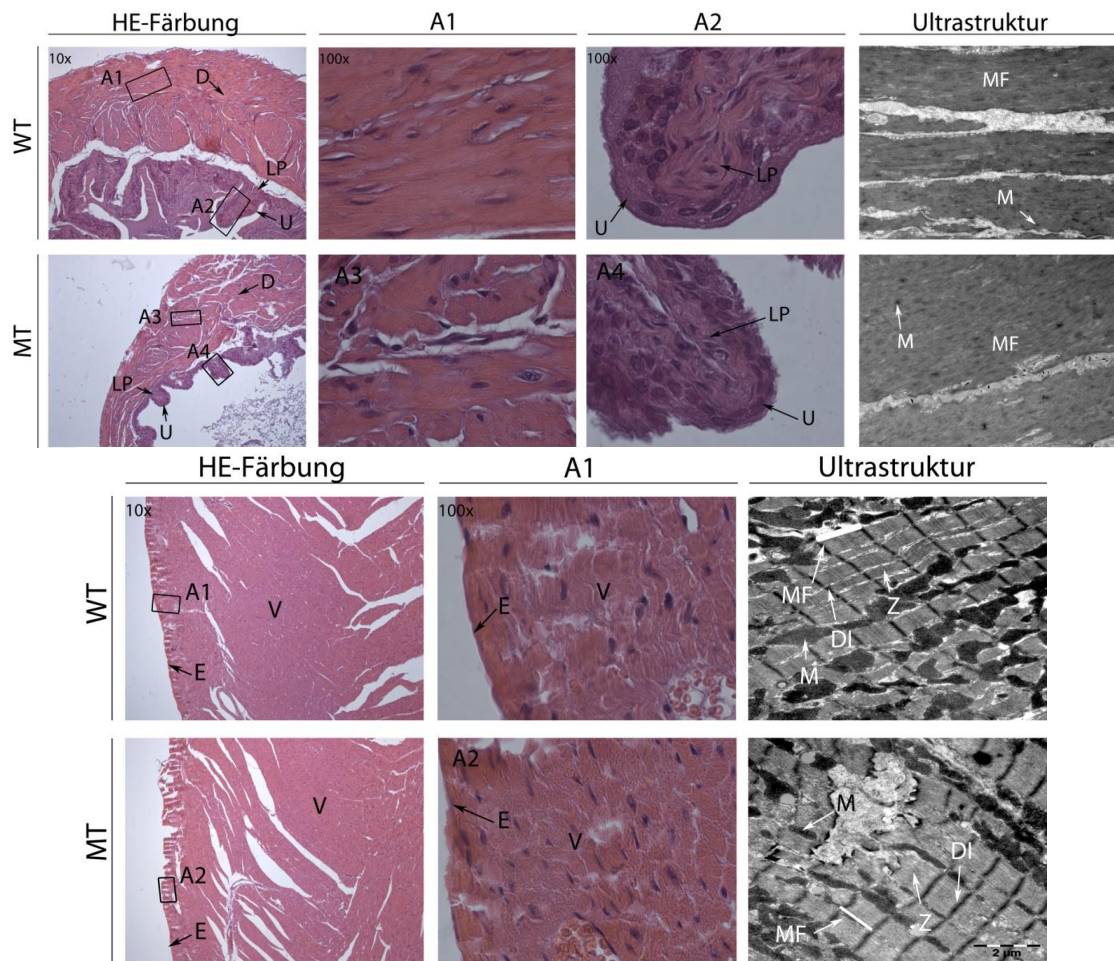


Abbildung 39: Mikroskopische Analyse von Blase und Herz zeigen keine Veränderungen. Obere Abbildung. Gezeigt sind mikroskopische Aufnahmen von drei Monate alten Blasen, die HE gefärbt sind. Zusätzlich ist eine Ultrastrukturaufnahme der Blase gezeigt. Es zeigen sich jedoch weder in den mikroskopischen Aufnahmen, noch in den Ultrstrukturbildern Abweichungen von den Wildtypen. Untere Abbildung. Gezeigt sind mikroskopische Aufnahmen, sowie Ultrastrukturbilder von drei Monate alten Herzen; transvers geschnitten.. Auch hier zeigen sich keine Unterschiede in der Morphologie. Die Kästen zeigen Vergrößerungen an. LP = lamina propria; U = Urothel; D = Detrusor; V = Ventrikel; E = Epikard; M = Mitochondrium; MF = Myofibrille; Z = M-Scheibe; DI =Z-Scheibe.

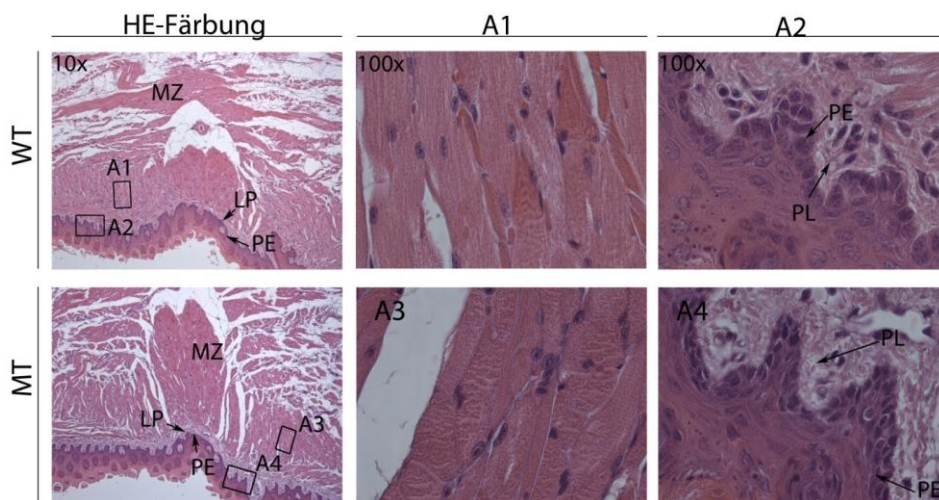


Abbildung 40: Mikroskopische Aufnahmen drei Monate alter Zungen zeigen keine morphologischen Unterschiede. Gezeigt sind mikroskopische Aufnahmen einer drei Monate alte Zunge, transvers geschnitten und mit HE gefärbt. In den hohen Vergrößerungen des Epithels und der Muskelfaser zeigen sich keine morphologischen Unterschiede. Die Kästen zeigen Vergrößerungen an.

Die mikroskopischen Aufnahmen der Zunge zeigten keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen (s. Abb. 40).

Da Veränderungen bislang nur im Herzen gefunden wurden, sollte das Herz weitergehend untersucht werden. Bei der Erstellung der Wachstumskurve war bereits bei P30 ein geringes Gewicht der Tiere festzustellen gewesen, so dass die Analyse des Herzens bei diesem Alter fortgesetzt werden sollte. Das Herz zeigt in der morphologischen Analyse eine geringfügige Größenreduktion (s. Abb. 43). Zur Verifizierung wurden die Herzen gewogen. Die absoluten Gewichte zeigten, dass das Herz ca. 9 % leichter war als die Kontrollgruppe (s. Abb. 41). Auch die Leber zeigte eine Gewichtsreduktion (ca. 14 %) (s. Abb. 41). Beim Gewicht der Milz hingegen zeigten sich keine Unterschiede (s. Abb. 41). Vergleicht man die relativen Gewichte, waren keine Unterschiede mehr feststellbar (s. Abb. 41). Wie in Abbildung 42 zu sehen ist, nehmen die Gewichtsunterschiede mit dem Alter immer weiter zu.

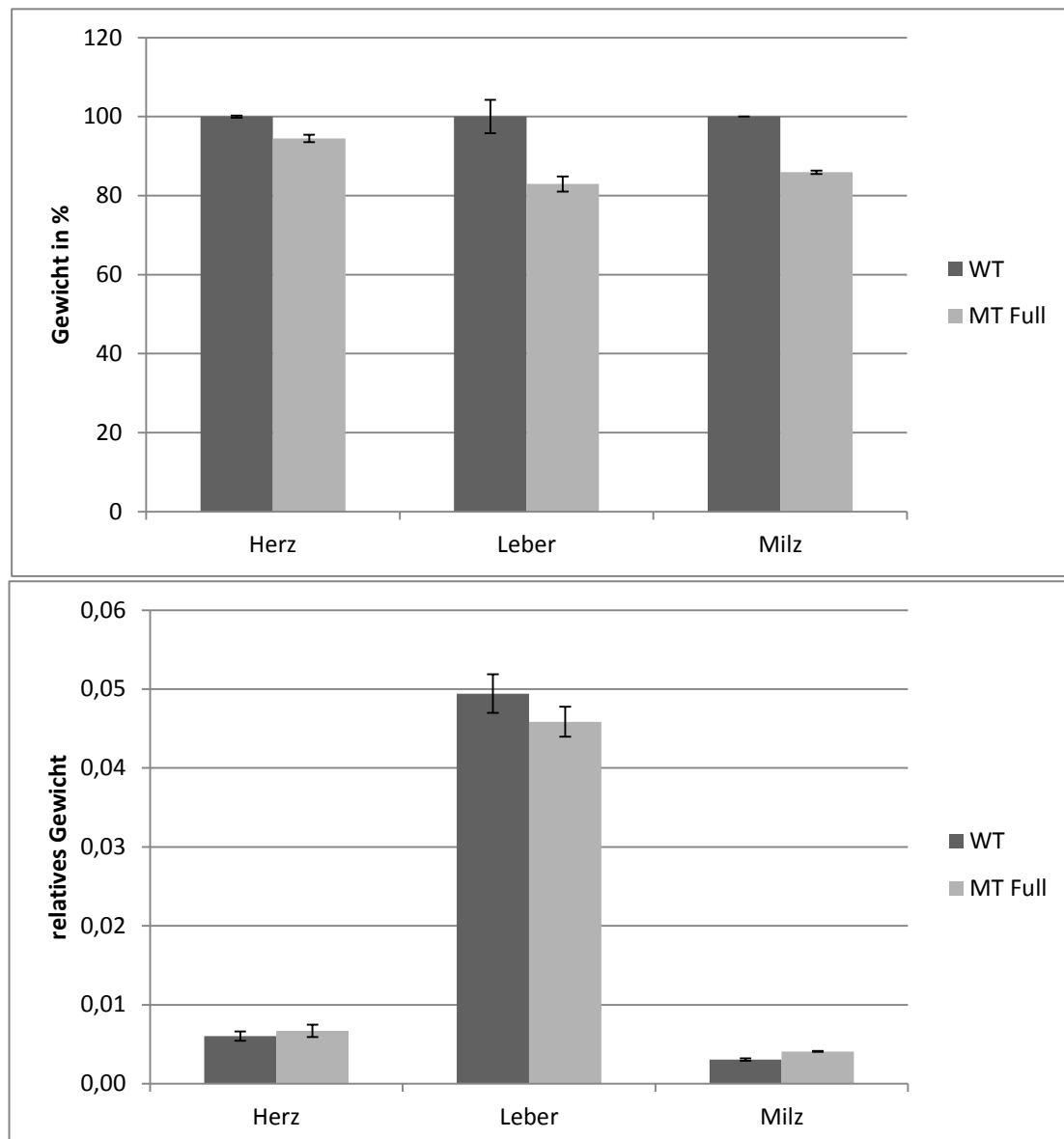


Abbildung 41: Herz und Leber zeigen eine Gewichtsreduktion im Alter von einem Monat. Obere Abbildung. Gezeigt sind die absoluten Gewichtswerte von Herz, Leber und Milz. Das Herz zeigt eine Gewichtsreduktion um 9 %, die Leber eine Gewichtsreduktion um 14 % und bei der Milz ist keine Veränderung festzustellen. Untere Abbildung. Gezeigt ist ein Balkendiagramm mit dem normalisierten Gewichtswerten von Herz, Leber und Milz. Es sind keine signifikanten Veränderungen festzustellen. WT = Wildtyp; MT = Mutante

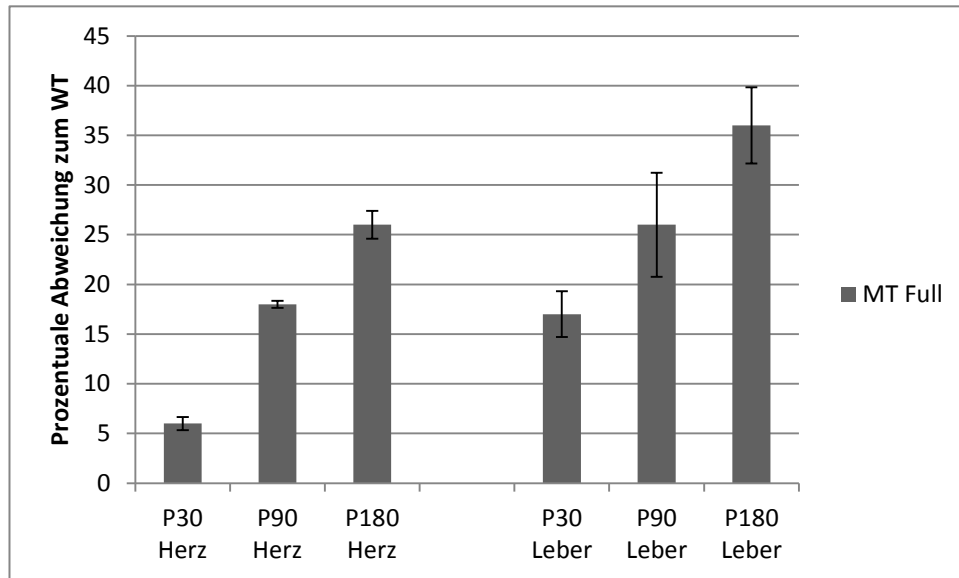


Abbildung 42: Zeitabhängige Veränderung der prozentualen Gewichtsabweichung zum WT nicht normalisiert. Gezeigt sind die prozentualen Gewichtsunterschiede, nicht normalisiert, die zum Alter hin immer stärker hervortreten. P = postnatal; MT = Mutante; WT = Wildtyp

In den histologischen Färbungen waren keine Veränderungen festzustellen (Daten nicht gezeigt).

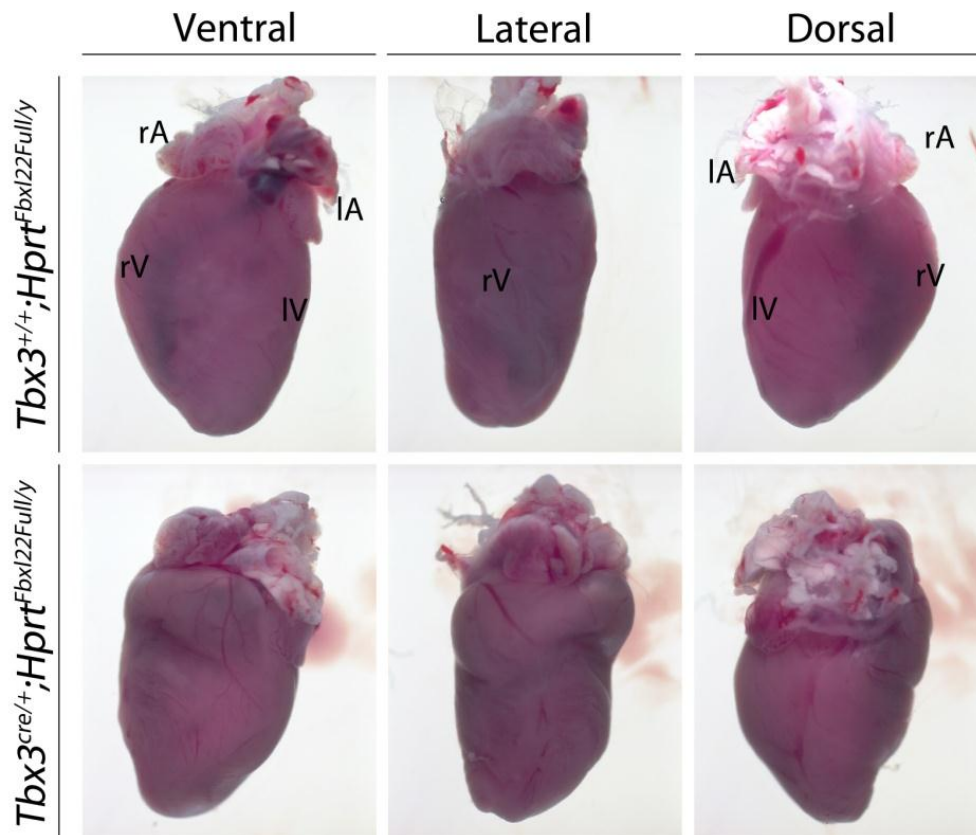


Abbildung 43: Einen Monat alte Mutanten-Herzen sind geringfügig kleiner als die Kontrollherzen. Die Abbildung zeigt makroskopische Aufnahmen von einem Monat alten Herzen. Die Herzen der Mutanten wirken etwas kleiner als die Wildtypen. IV = linker Ventrikel; rV = rechter Ventrikel; IA = linkes Atrium; rA = rechtes Atrium

Die Ergebnisse zeigen, dass die Misexpression im gesamten Embryo zu einem Gewichtsverlust der Tiere, sowie aller kontrollierten Organe führt. Mit steigendem Lebensalter wird dieser Effekt ausgeprägter. Es konnten aber keine Veränderungen in der histologischen Untersuchung mittels HE-Färbung, Tri-Chrom-Färbung und Sirius-rot-Färbung gefunden werden.

3.2.2.5 Misexpression der dominant-negativen Form in allen Zellen

3.2.2.5.1 Morphologische Analyse von $Tbx3^{cre/+}; Hprt^{Fbxl22.d.F-Box/Fbxl22.d.F-Box}$ Mäusen bei P180

Nicht nur der Effekt der Überexpression gibt Aufschluss auf die Funktion eines Gens, auch der Verlust kann Einblick in seine Funktion geben. Da eine Verlustmutante nicht zur Verfügung stand, sollte der Effekt der Misexpression einer dominant-negativen Form von *Fbxl22* untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde wieder die *Tbx3::cre* Linie zur Hilfe gezogen. Somit ließ sich die dominant-negative Variante in allen Zellen exprimieren und ihr Effekt untersuchen.

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Deletionsmutante überexprimiert wird. Zu diesem Zweck wurden Leber und Lunge aus P180 alten Tieren des Genotyps $Tbx3^{cre/+}; Hprt^{Fbxl22.d.F-Box/Fbxl22.d.F-Box}$ präpariert und ihre RNS extrahiert. Mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR wurden die Expressionslevel bestimmt. Die Expression in Leber und Lunge war nach der *Tb3::cre* Induktion um das ca. 1000-fache erhöht (s. Abb. 44).

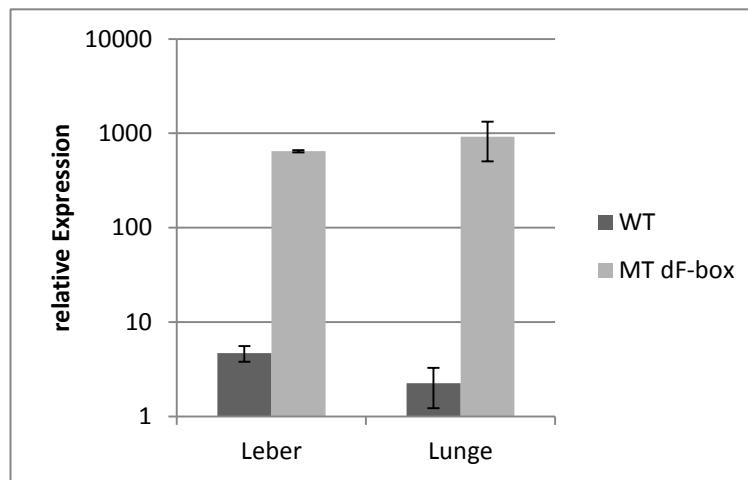


Abbildung 44: Darstellung der Expression von *Fbxl22.d.F-Box* nach *Tbx3cre* induzierter Misexpression mit Hilfe der semi-quantitativen RT-PCR. Gezeigt sind semi-quantitative RT-PCR Analysen von Leber und Lunge P180 alter Mutanten- und Kontrollmäuse. Die blauen Balken zeigen WT Expression, während die roten Balken MT Expression zeigen. Die Y-Achse ist logarithmisch skaliert. Die Transgenmäuse exprimieren *Fbxl22* stark über. MT = Mutante; WT = Wildtyp; Liver = Leber; Lung = Lunge; P = postnatal

Auch hier wurde zuerst eine Wachstumsanalyse durchgeführt, indem alle 30 Tage die Mäuse gewogen wurden. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen Mutantenmäusen und den Kontrollmäusen (s. Abb. 45). Um die Auswirkungen auf die verschiedenen Muskeltypen analysieren zu können, wurden Herz, Blase und Zunge als Beispielorgane untersucht. Die Gewichtsanalyse des Herzens und zweier Kontrollorgane (Milz und Leber), in Bezug auf das Gesamtgewicht der Maus und die absoluten Werte (s. Abb. 46), ergaben keine Veränderungen.

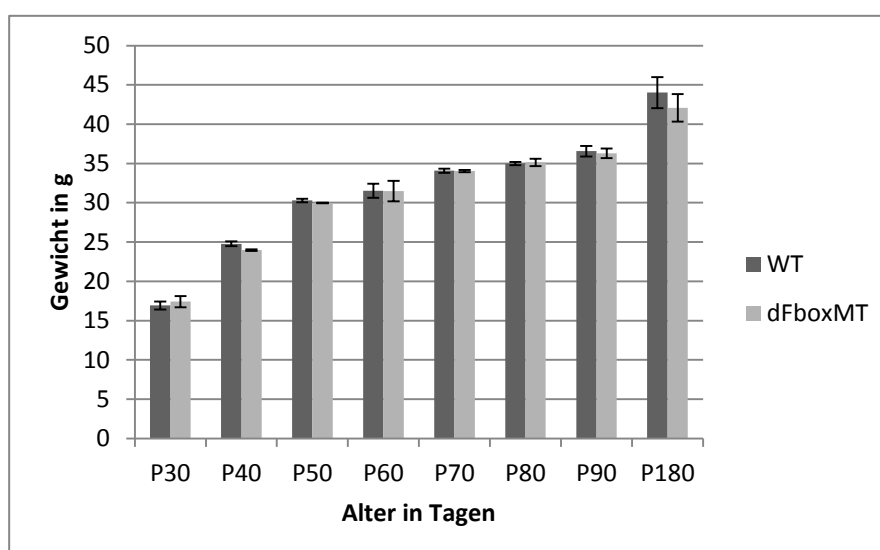


Abbildung 45: Gezeigt ist das Wachstumsverhalten *Tbx3cre* induzierter dominant-negativer Misexpressionsmäuse. Die dunkelgrauen Balken zeigen das Gewicht von Wildtyp-Mäusen und die hellgrauen

Balken zeigen das Gewicht der Transgenmäusen. Die Mutanten-Mäuse zeigen keine Gewichtsveränderungen während der gesamten gemessenen Wachstumsperiode. WT = Wildtyp; MT = Mutante; P = postnatal

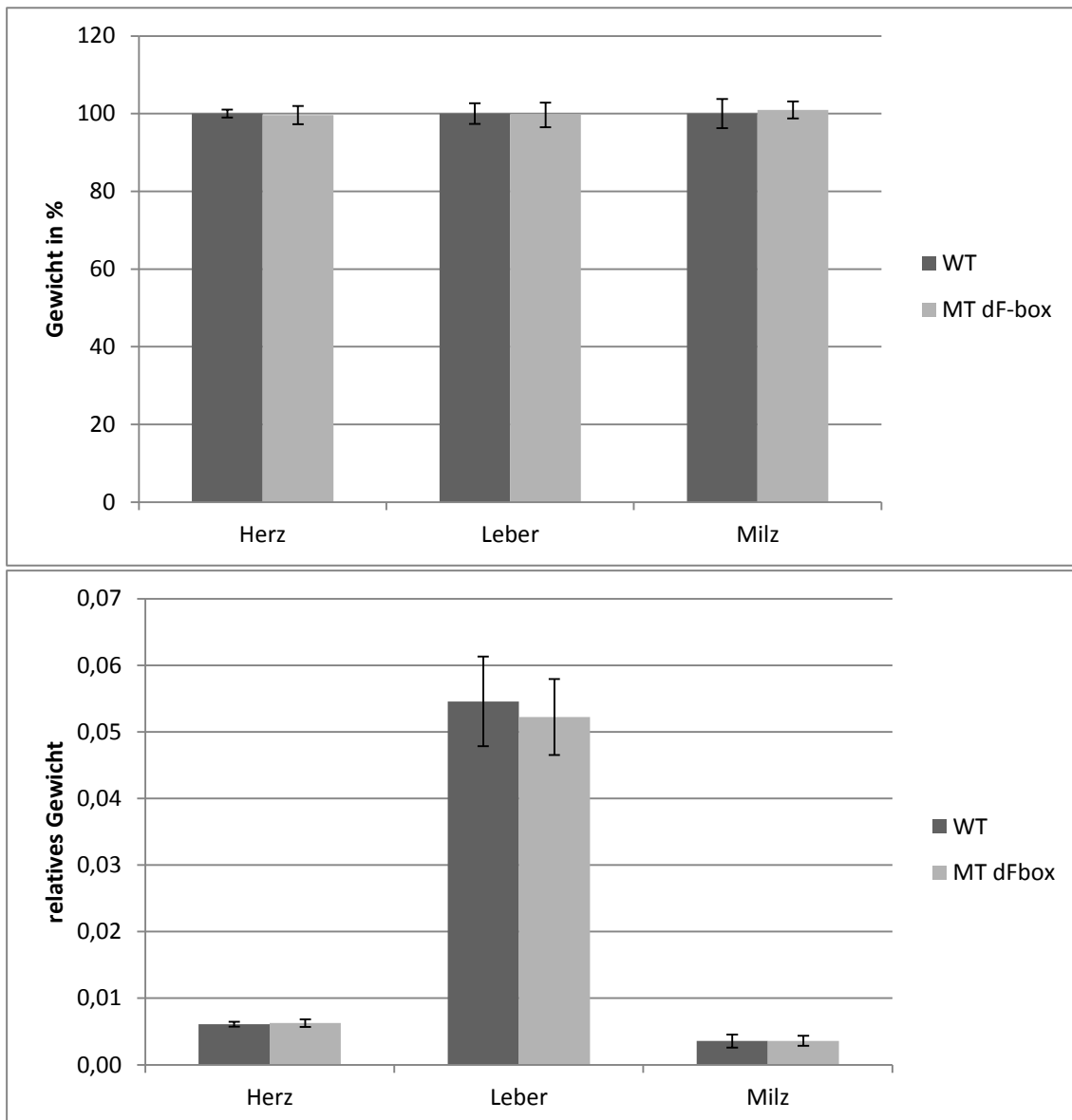


Abbildung 46: Gewichtsmessungen von Herz, Leber und Milz zeigten keine signifikanten Veränderungen. Obere Abbildung. Gezeigt ist ein Balkendiagramm, welches die Gewichte der gemessenen Organe wiedergibt. Die absoluten Werte zeigen keinen Unterschied zu den Kontrollwerten. Untere Abbildung. Gezeigt ist ein Balkendiagramm mit den relativen Gewichten, welches auf das Gesamtgewicht der Mäuse normalisiert wurde. Es sind keine signifikanten Unterschiede zu erkennen.

In der morphologischen Analyse konnten keine Veränderungen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). In der histologischen Analyse der Mutanten zeigten sich keine Unterschiede in der Entwicklung des Herzens oder der Zunge (s. Abb. 47A,B). Die Tri-Chrom-Färbung der Blase zeigte jedoch einen kleinen Unterschied des Blasenurothels (s. Abb. 48). In der mikroskopischen Untersuchung des Urothels konnten mittels der Tri-Chrom-Färbung stellenweise Unterschiede in der Färbung gefunden werden. Während das Urothel in Wildtypen eine durchgehend gräuliche

Färbung aufwies, zeigte die Mutante an manchen Stellen eine äußere violette Färbung (s. Abb. 49).

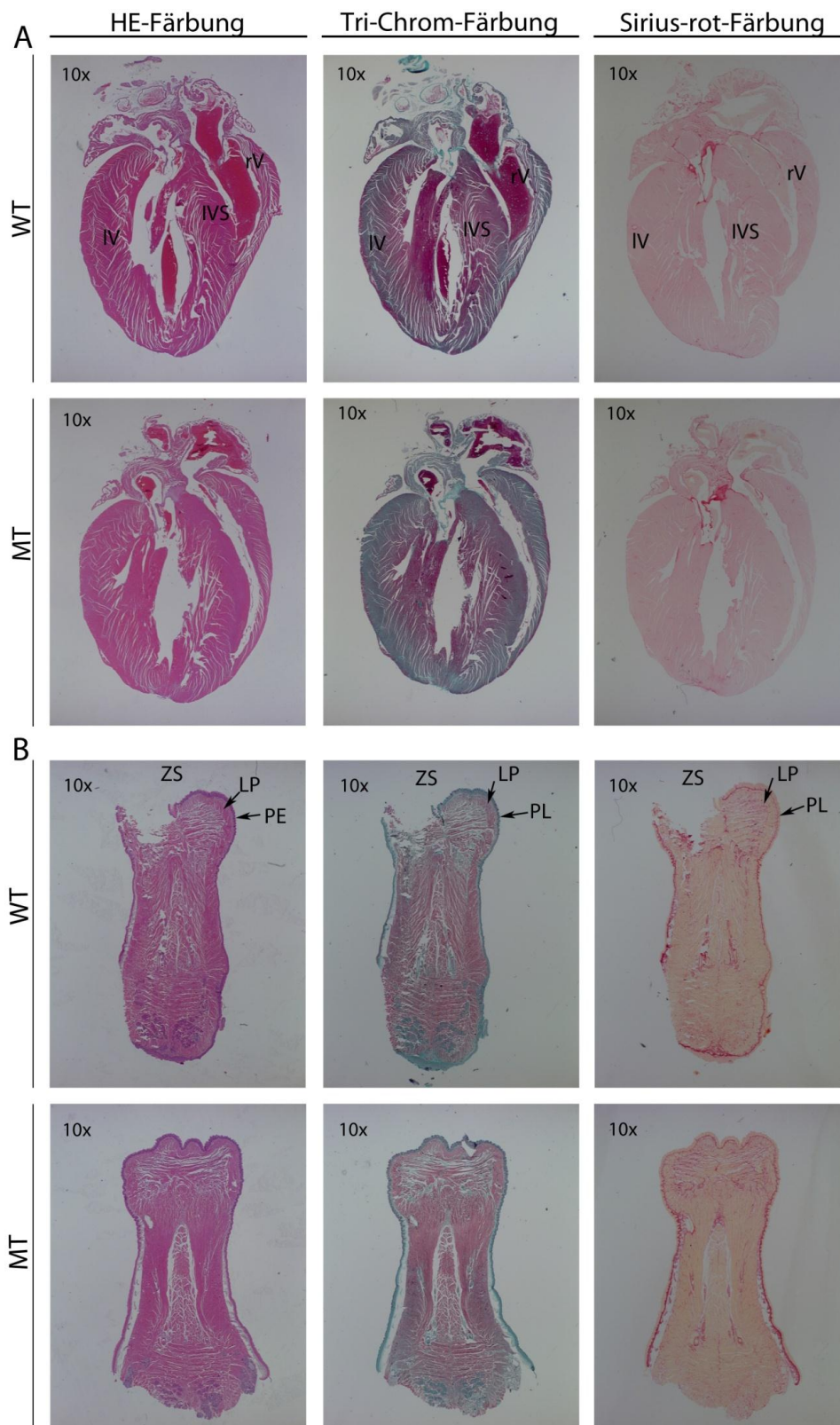


Abbildung 47: Die histologische Untersuchung des Herzens (A) und der Zunge (B) zeigten keine Veränderungen. A, zeigt die histologische Analyse des Herzens mit Hilfe der Färbemethoden HE-Färbung, Tri-Chrom-Färbung und Sirius-rot Färbung. Es sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen. B, zeigt die histologische Untersuchung der Zunge. Mit Hilfe der drei Färbemethoden sind keine Veränderungen zu

detektieren. IV = linker Ventrikel; rV = rechter Ventrikel; IVS = interventrikuläres Septum; ZS = Zungenspitze; PE = Plattenepithel; LP = lamina propria

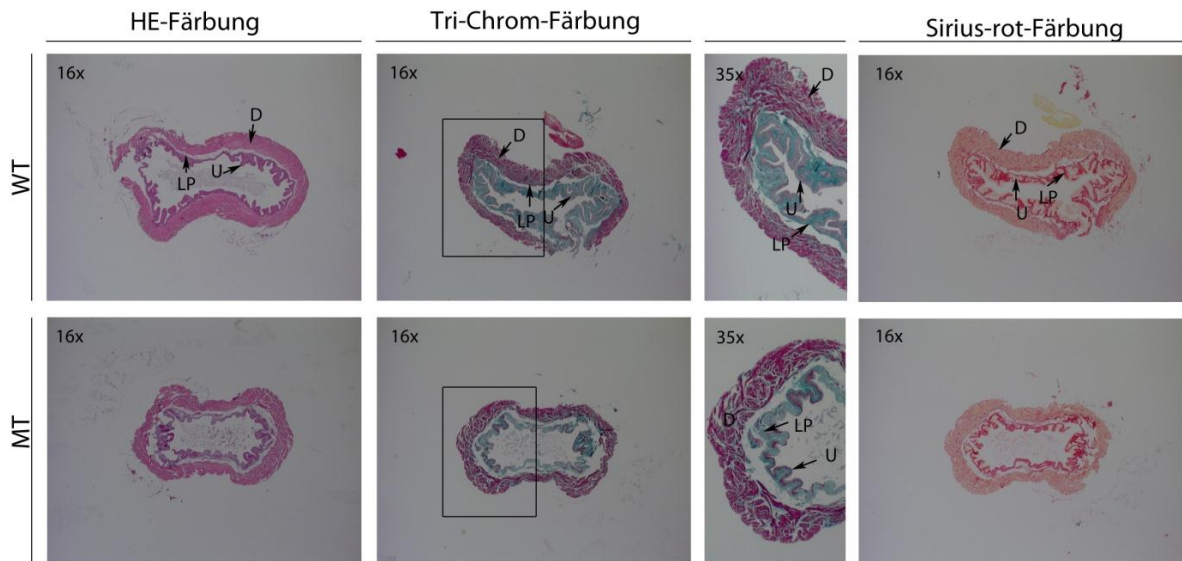


Abbildung 48: Die Tri-Chrom-Färbung zeigt eine Veränderung des Urothels. Gezeigt ist die histologische Untersuchung sechs Monate alter Blasen, transvers geschnitten und mittels HE-Färbung, Tri-Chrom-Färbung und Sirius-rot-Färbung sichtbar gemacht. Eine Veränderung ist im Blasenurothel zu erkennen. Die Kästen zeigen den Bereich der Vergrößerung an. D = Detrusor; LP = lamina propria; U = Urothel

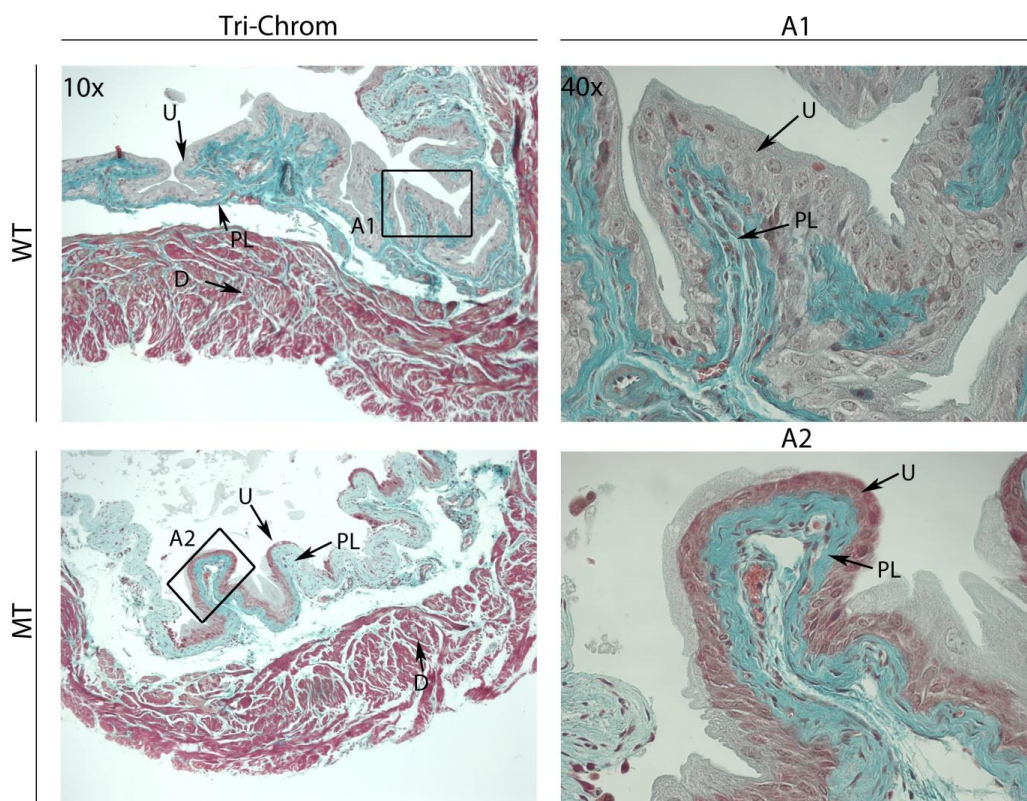


Abbildung 49: Mikroskopische Aufnahmen verdeutlichen die Unterschiede im Blasenurothel. Gezeigt ist die mikroskopische Analyse des mittels Tri-Chrom-Färbung sichtbar gemachten Unterschieds des Blasenurothels. Das Urothel der Mutante zeigt eine starke rötliche Färbung, während das Urothel der Wildtypen gräulich ist. Die Kästen markieren den Bereich der vergrößert wurde. PL = lamina propria; U = Urothel; D = Detrusor

3.2.2.5.2 *Tbx3^{cre/+}; Hprt^{Fbxl22.d.F-Box/Fbxl22.d.F-Box}* Mäuse zeigen eine deregulierte Zellproliferation und Apoptose im Blasenurothel bei P180

Durch die histologische Analyse des Blasenurothels in der Mutante und der Verdacht, es könnte sich um zusätzliches Gewebe handeln, ließ auf einen regulatorischen Einfluss der Zellproliferation schließen. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde mit Hilfe eines BrdU-Inkorporationsassays die relative Proliferation aller Zellen in der Mutante analysiert. Die Proliferation im Urothel war stark verändert. Während in Wildtypen der Markierungsindex des Urothels bei ca. 66 % lag, konnte in der Mutante keine proliferierende Zelle im Urothel detektiert werden. Im restlichen Gewebe konnten weder in der Mutante noch in Wildtypen proliferierende Zellen gezählt werden (s. Abb. 50, 51).

Apoptotische Zellen wurde mittels TUNEL Experiment detektiert. In Wildtypen war keine Apoptose detektierbar, während in der Mutante 46 % der Blasenurothel-Zellen apoptotisch waren (s. Abb. 50, 52). Damit zeigt sich ein genau komplementäres Ergebnis zu den Proliferationsdaten. In Wildtypen proliferiert das Urothel stark, zeigte jedoch keine Apoptose. In der Mutante, welche keine Proliferation zeigt, war jedoch verstärkte Apoptose im Urothel zu detektieren.

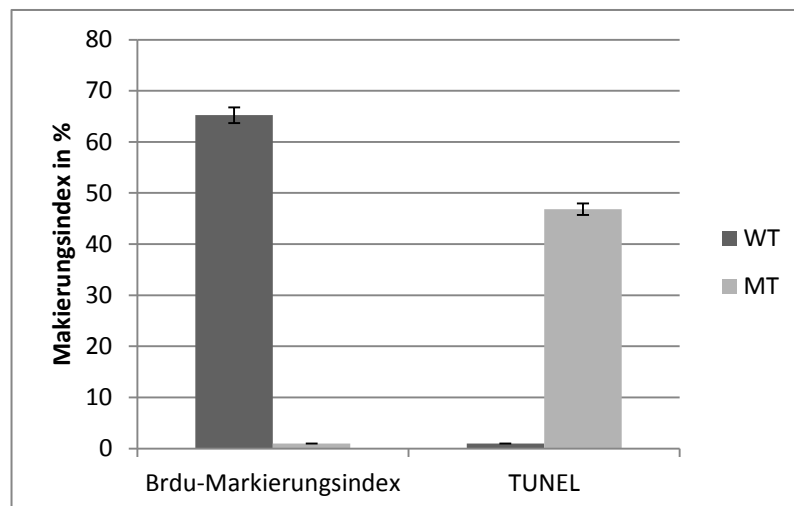


Abbildung 50: Das Blasenurothel von *Tbx3^{cre/+}; Hprt^{Fbxl22.d.F-Box/Fbxl22.d.F-Box}* zeigt Veränderung in Proliferation und Apoptose. Im Balkendiagramm sind der BrdU-Markierungsindex sowie die Apoptoserate von Wildtypmäusen und Transgenmäusen dargestellt. Die Proliferations im Wildtypurothel liegt bei 65 % während sie in der Mutante bei 0 % liegt. Im Gegensatz dazu, liegt die Apoptoserate in Wildtypen bei 0 %, während sie in der Mutante bei 46 % liegt. WT = Wildtyp; MT = Mutante

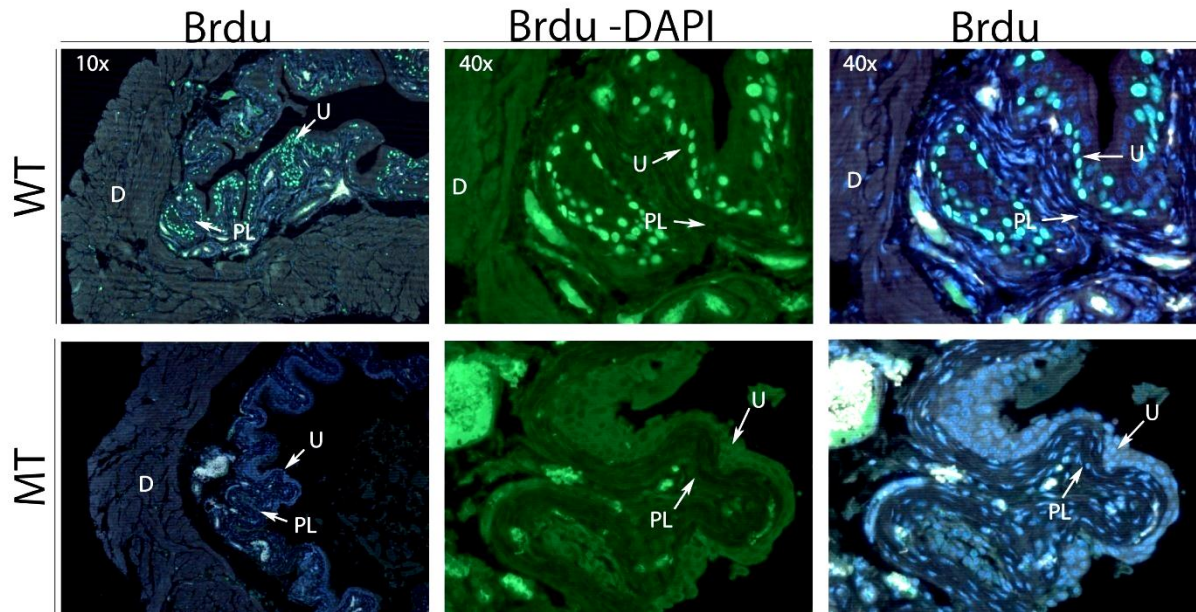


Abbildung 51: Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen den Brdu-Markierungsindex im Blasenurothel. Zelluläre Analyse der Proliferationsrate in WT und MT Mäuse. Mit Hilfe eines Brdu Antikörpers wurden die Zellen sichtbar gemacht, welche während der Proliferation Brdu in die DNS eingebaut haben. In grün sind proliferierende Zellen dargestellt und blau zeigt die Zellkerne an (DAPI) WT Mäuse zeigen starke Proliferation, während in der MT keine proliferierende Zelle detektiert werden kann. WT = Wildtyp; MT = Mutante; U = Urothel; PL = lamina propria; D = Detrusor

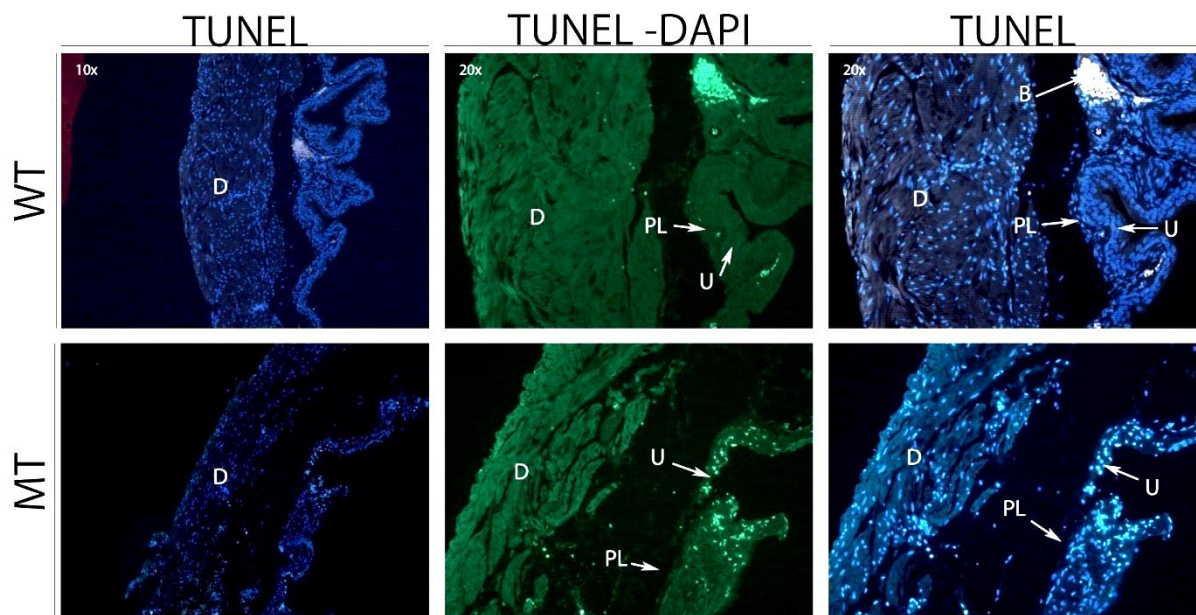


Abbildung 52: Durch TUNEL sichtbar gemachte apoptierende Zellen im Blasenurothel. Zelluläre Analyse der Apoptose im Blasenurothel. Durch TUNEL sichtbar gemachte apoptotische Zellen sind in grün dargestellt. Zellkerne sind mit Hilfe der Substanz DAPI markiert wurden (blau). Die MT zeigt ein erhöhtes Maß an apoptierenden Zellen. Im WT sind keine apoptotischen Zelle zu erkennen. B = Blut; D = Detrusor; PL = lamina propria.

3.2.2.5.3 Morphologische Analyse der Blase von $Tbx3^{cre/+}$; $Hprt^{Fbx122.d.F-Box/Fbx122.d.F-Box}$ Mäusen bei P90 und P30

Nachdem eine Veränderung im Urothel der Blase gefunden wurde, stellte sich die Frage, wann diese Veränderung eintritt. Um diese Frage zu klären, wurden die Blase der Stadien P90 und P30 untersucht. In der morphologischen Untersuchung konnten keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden (s. Abb. 53). In der histologischen Untersuchung mittels HE- und Sirius-rot-Färbung wurden keine Unterschiede festgestellt (s. Abb. 54). Beim Alter P90 zeigte sich in der Tri-Chrom-Färbung ein Unterschied im Urothel (s. Abb. 54). Dieselbe abweichende Färbung, die bereits bei P180 zu sehen war. In der mikroskopischen Untersuchung des Blasenurothels zeigte sich die Färbung besonders deutlich (s. Abb. 55).

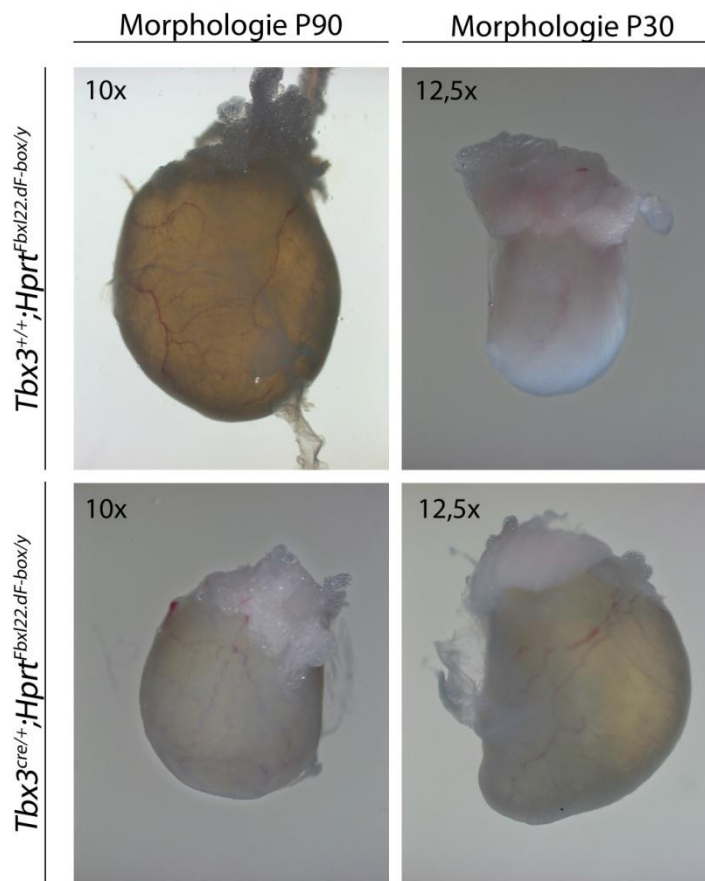


Abbildung 53: Es sind keine morphologischen Veränderungen der Blasen des Alters P30 und P90 zu erkennen. Analyse der Blase in $Tbx3^{cre/+}$; $Hprt^{Fbx122.d.F-Box/Fbx122.d.F-Box}$ Mäusen bei P30 und P90 anhand der Morphologie von ganzen Blasen.

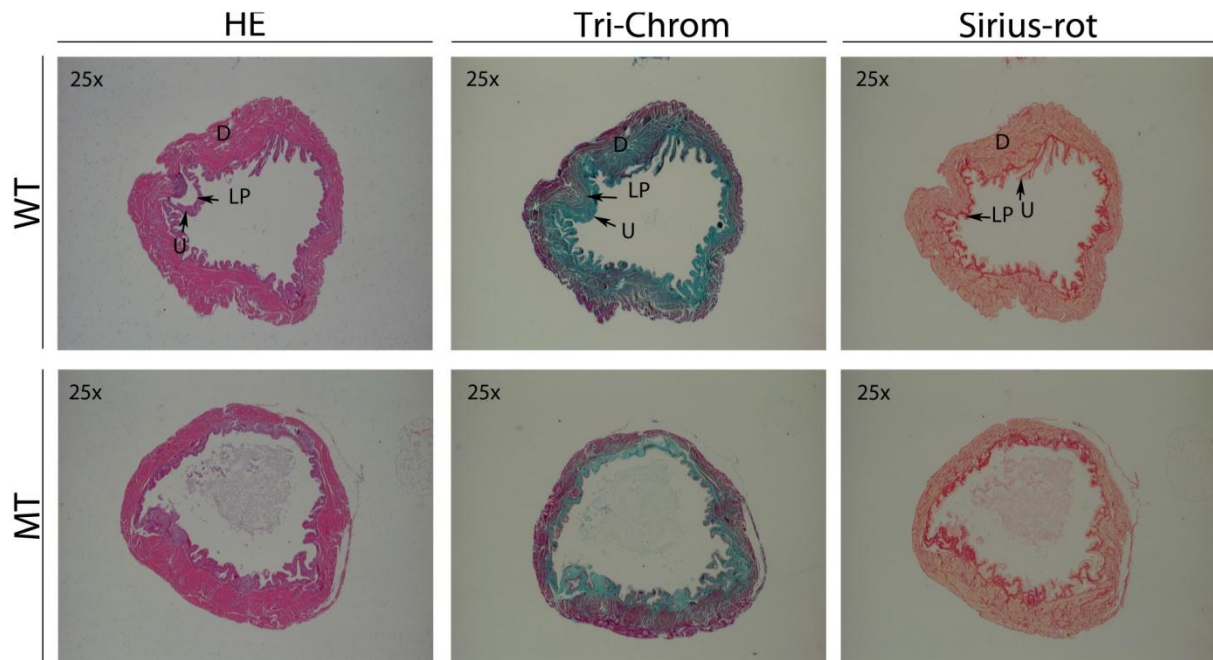


Abbildung 54: Drei Monate alte Mutantenmäuse zeigen Veränderungen in Blasenurothel. Analyse des Blasenurothels in der Histologie von *Tbx3^{cre/+};Hprt^{Fbx122.d.F-Box/Fbx122.d.F-Box}* Mäusen bei P90 anhand von HE-Färbungen, Tri-Chrom-Färbungen und Sirius-rot-Färbungen transversal geschnittener Blasen. D= Detrusor; PL = lamina propria; U = Urothel

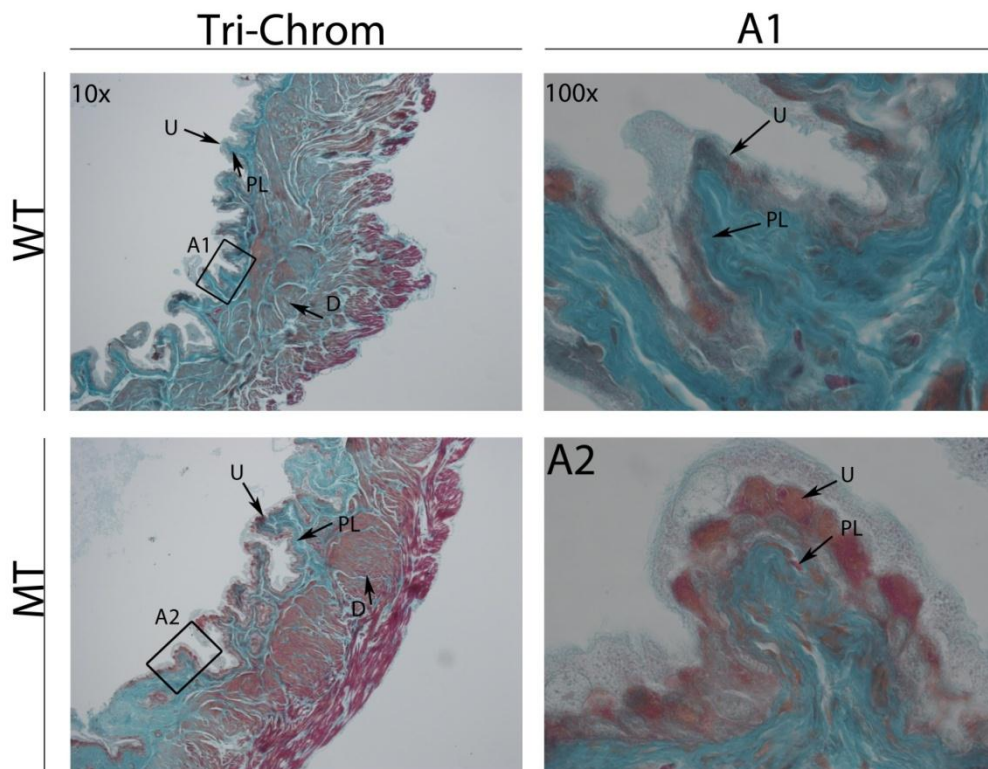


Abbildung 55: Das Blasenurothel zeigt bereits ab P90 histologische Unterschiede. Mikroskopische Analyse des Blasenurothels mittels Tri-Chrom-Färbung bei drei Monate alten *Tbx3^{cre/+};Hprt^{Fbx122.d.F-Box/Fbx122.d.F-Box}* Mäusen. Die Kästen zeigen die Ausschnitte, welche vergrößert wurden. D = Detrusor; PL = lamina propria; U = Urothel

Die histologische Untersuchung der Blase im Alter P30 zeigte jedoch kein unterschiedliches Erscheinungsbild (s. Abb. 56). Auch in der mikroskopischen Vergrößerung waren keine Veränderungen des Urothels erkennbar (s. Abb. 57). Die Veränderung im Blasenurothel scheint sich zwischen P30 und P90 zu etablieren.

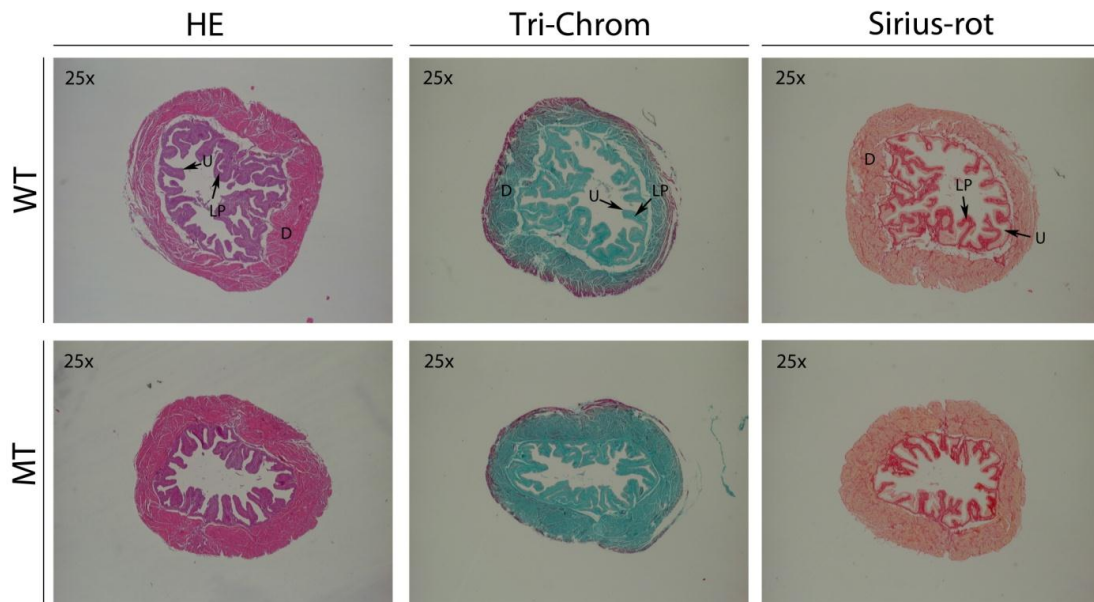


Abbildung 56: Das Blasenurothel von einem Monat alten Mäusen ist normal entwickelt. Histologische Analyse der Blasenurothelmorphologie von *Tbx3^{cre/+};Hprt^{Fbx122.d.F-Box/Fbx122.d.F-Box}* Mäusen im Alter von einem Monat. HE-Färbung, Tri-Chrom-Färbung und Sirius-rot-Färbung zeigen keine Unterschiede des Blasenurothels. D = Detrusor; LP = lamina propria; U = Urothel

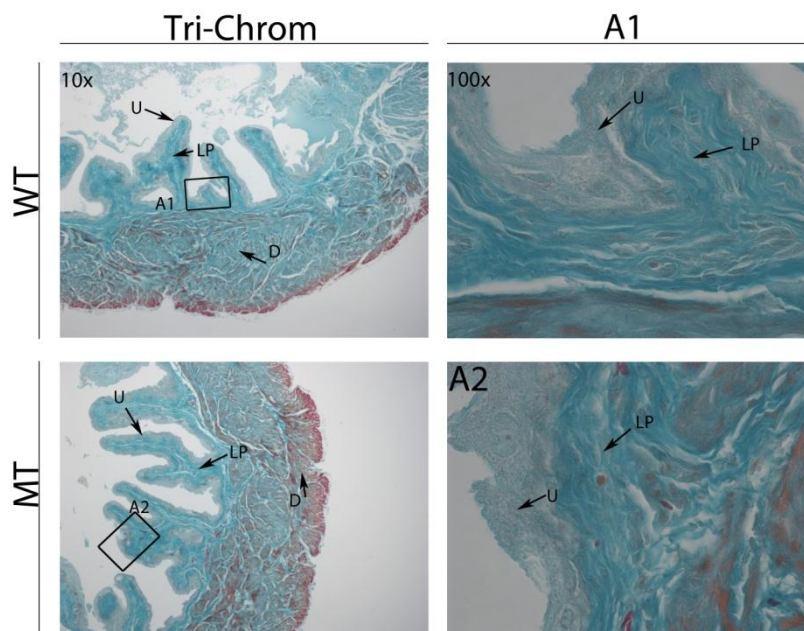


Abbildung 57: Mikroskopische Analyse der durch Tri-Chrom gefärbten Blase im Alter von einem Monat. Histologische Analyse der Blase von einem Monat alten *Tbx3^{cre/+};Hprt^{Fbx122.d.F-Box/Fbx122.d.F-Box}* Mäusen. Es sind keine offensichtlichen Veränderungen sichtbar. Das Urothel der MT sieht aus wie das Urothel des WT. Die Kästen markieren die Bereiche, welche vergrößert wurden. D = Detrusor; LP = lamina propria; U = Urothel; MT = Mutante; WT = Wildtyp

3.2.2.6 Misexpression des vollständigen Proteins in Myokardzellen

Wie aus der Wachstumsanalyse im vorherigen Kapitel hervorgegangen ist, hat die Überexpression des vollständigen Proteins einen Effekt auf das Wachstum der Mäuse. Auch die inneren Organe der Mäuse sind von dem Wachstumsdefekt betroffen. Eines der betroffenen Organe war das Herz. Es stellte sich nun die Frage, ob die Veränderung des Herzens auf die Gewichtsreduktion zurückzuführen ist, oder umgekehrt, ob aufgrund der Herzproblematik und der damit verbundenen Nährstoffunterversorgung, einen systemischen Effekt auf das Tier hatte. Zu diesem Zweck sollte *Fbxl22* herzspezifisch exprimiert werden. *Myh6* ist ein in Kardiomyozyten spezifisch exprimiertes Gen und konnte aus diesem Grund für die herzspezifische Misexpression genutzt werden.

Die Mäuse erreichten das Alter P30 und es waren keine morphologischen Veränderungen zu erkennen (s. Abb. 58).

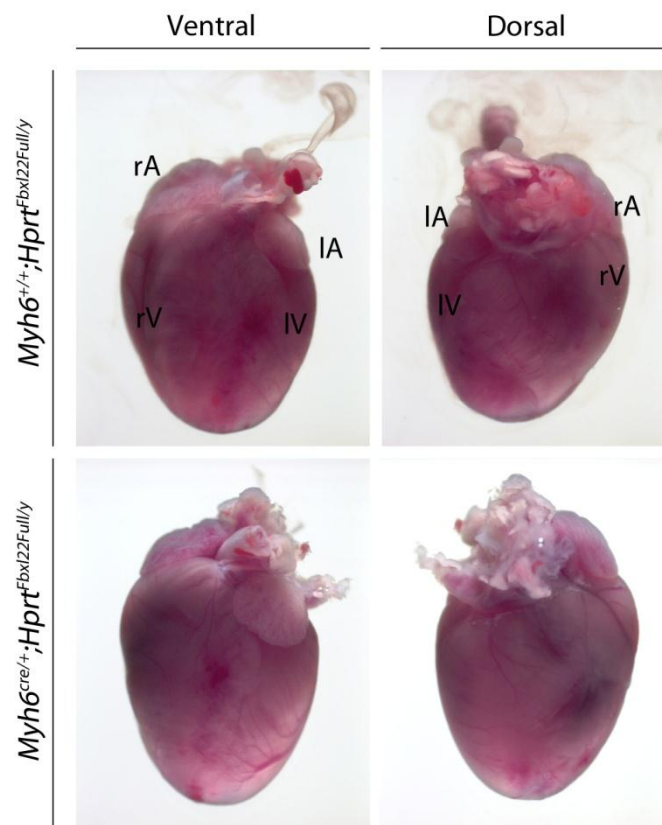


Abbildung 58: Kardiomyozyten spezifische Misexpression von *Fbxl22* hat keinen Einfluss auf die Herzmorphologie Analyse der Herzmorphologie in *Myh6^{cre/+};Hprt^{Fbxl22/Fbxl22}* Mäusen bei P30 anhand der makroskopischen Betrachtung von ganzen Herzen. Es sind keine Veränderung zu erkennen. IV = linker Ventrikel; rV = rechter Ventrikel; IA = linkes Atrium; rA = rechtes Atrium

Weder das absolute Gewicht des Herzens (s. Abb. 59) noch das relative Gewicht zeigten Unterschiede zu den Kontroll-Mäusen (s. Abb. 59).

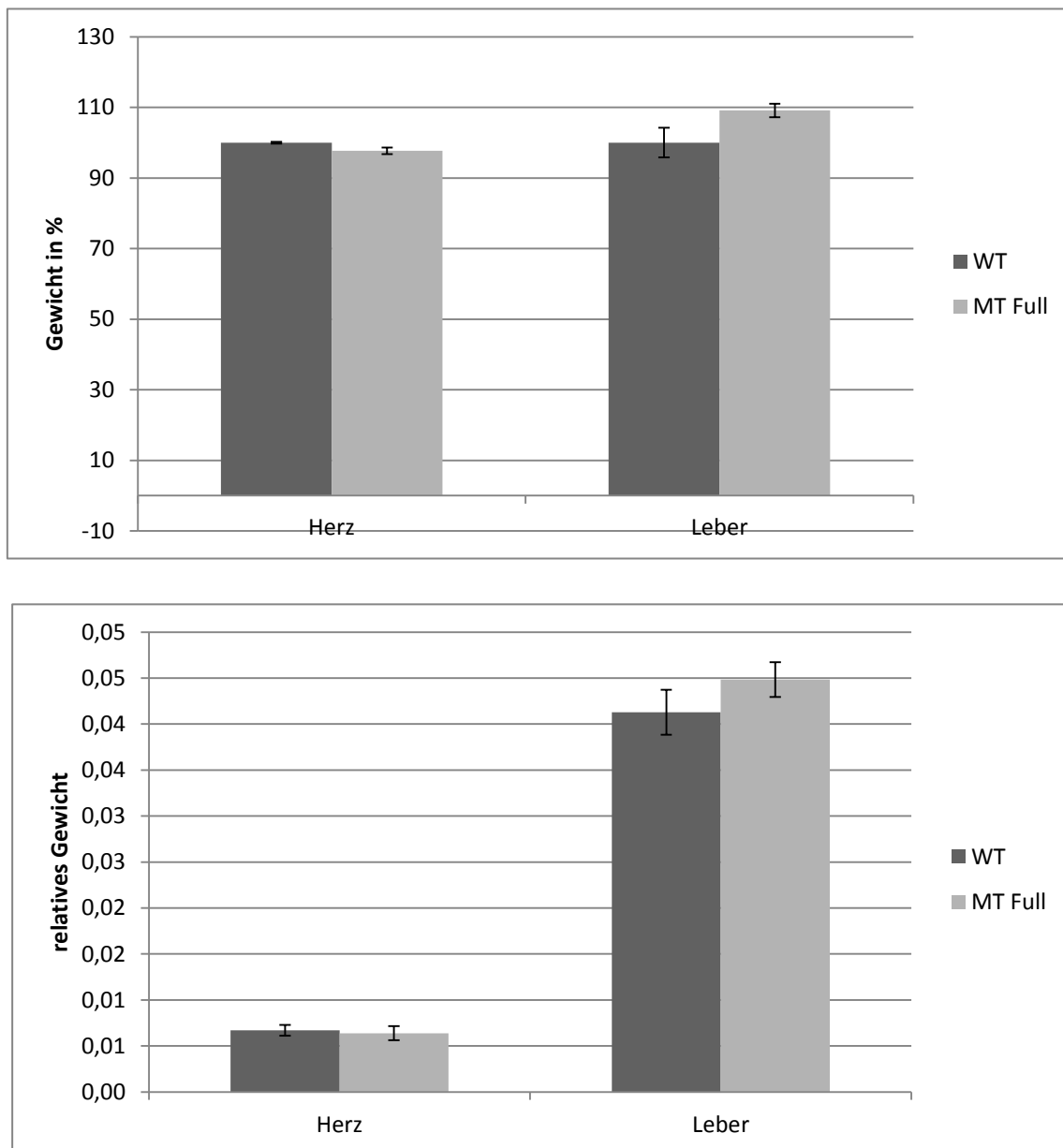


Abbildung 59: Die Analyse des Gewichts des Herzens zeigen keine Unterschiede zwischen WT und MT. Herz und Leber von *Myh6^{cre/+}; Hprt^{Fbxl22/Fbxl22}* Mäusen des Alters P30 wurden frei präpariert und gewogen. Oberes Balkendiagramm. Das absolute Gewicht WT und MT Herzen, sowie Leber, zeigen keine Gewichtsunterschiede. Unteres Balkendiagramm. Es sind keine Gewichtsunterschiede in den relativen Gewichten zwischen MT und WT Herzen zu erkennen. Die relativen Gewichte wurden auf das Gesamtkörpergewicht normalisiert. MT = Mutante; WT = Wildtyp

Zusätzlich wurden E18,5 alte Embryonen analysiert und das Herz histologisch untersucht. Die Struktur der Herzen sah im Vergleich zu den Kontrollherzen unverändert aus. In manchen Transgen-Herzen schien jedoch die Anzahl der Koronararterien reduziert zu sein (s. Abb. 60).

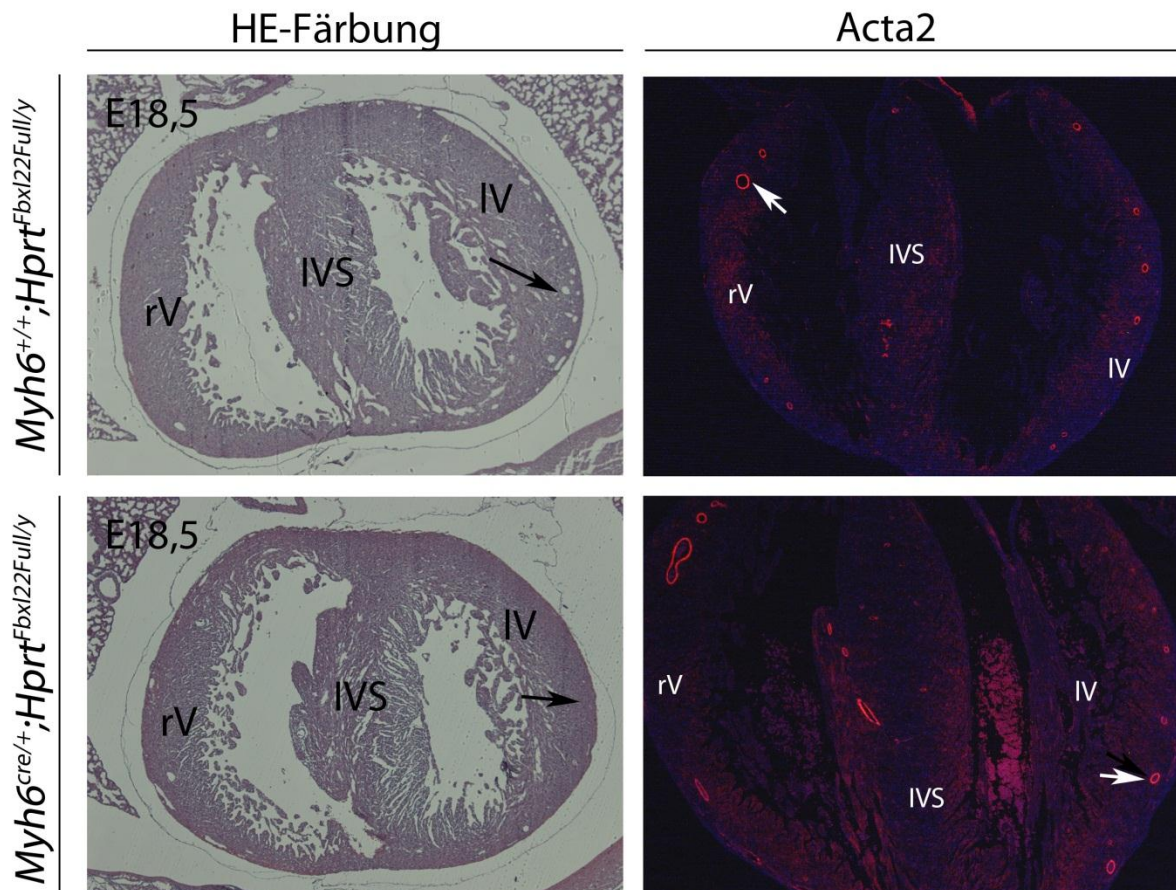


Abbildung 60: Makierung der Koronararterien mit Hilfe des glatten Muskelmarkers Acta2. Histologische Analyse von *Myh6^{cre/+}; Hprt^{Fbxl22/Fbxl22}* Mäusen bei E18,5 mittels HE-Färbung und Quantifizierung der Koronararterien bei E18.5 alten Herzen mit Hilfe des Markers Acta2. Gezeigt sind transvers geschnittene Herzen. Koronararterien sind mit Pfeilen markiert. IV = linker Ventrikel; rV = rechter Ventrikel; IVS = interventrikuläres Septum

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Expressionsanalyse der *Fbxl*-Gen-Familie während der Embryonalentwicklung der Maus durchgeführt, da bis zum heutigen Tag nur wenig über deren Expression bekannt war. Eines dieser Gene, *Fbxl22*, zeigte eine spezifische Expression in dem sich entwickelnden Mausherzen. Eine weitergehende Expressionsanalyse zeigte die Präsenz von *Fbxl22* nicht nur im Herzen, sondern in verschiedenen Organen die eine Muskelschicht besitzen. Dem Protein Fbxl22 wurden zelluläre Aufgaben zugeordnet, wie dem Einfluss auf die Proliferation epithelialer Zellen, sowie auf die funktionelle Domäne, das D-Box-Motiv. Aus den Daten der Misexpression des vollständigen Proteins und einer dominant-negativen Variante im Mausmodell, konnten jedoch keine Rückschlüsse auf die mögliche Funktion des Gens *Fbxl22* während der Embryogenese und im adulten Tier geschlossen werden, da die Misexpression einen Effekt auf epitheliale Zellen zu haben scheint. Des Weiteren sollen mögliche Konsequenzen der Misexpression auf die Muskelentwicklung während der Embryogenese und im postnatalen Alter erörtert werden.

4.1 *Fbxl22* ist ein gewebespezifisch ,während der Embryogenese, exprimiertes Gen

Aus der Analyse der Expressionsdomänen der bisher bekannten *Fbxl*-Gene, ging hervor, dass *Fbxl22* das einzig gewebespezifisch exprimierte Gen aus der Reihe der *Fbxl*-Familie war. Es konnte im Herzen und in den anterioren Somiten, genauer gesagt im Myotom, detektiert werden. Bei einem weiteren *Fbxl*-Gen wurde eine Auffälligkeit des Expressionsmusters entdeckt. *Fbxl2* war, mit Ausnahme des Herzens, im gesamten Embryo exprimiert. Dies weist auf eine herzspezifische Kontrolle der Expression hin und könnte bedeuten, dass die Repression von *Fbxl2* für die frühe Herzentwicklung notwendig ist. Da jedoch keine Expressionsanalyse zu späteren Entwicklungsstadien durchgeführt wurde, kann keine Aussage über mögliche Funktionen im Herzen gemacht werden. Aus der Literatur ist bislang nur bekannt, dass *Fbxl2* eine Rolle in nicht proliferierenden Hepatozyten und Wachstum arretierten Leber Epithelzellen spielt (Ilyin et al. 1999). Eine Rolle in Kardiogenese wurde bislang jedoch nicht beschrieben. Aufgrund der spezifischen Expression von

Fbxl22 wurde diese einer weitergehenden Expressionsanalyse während der Embryonalentwicklung unterzogen. *Fbxl22* war ab Tag E8,0 im Einflusstrakt, Ventrikel und Ausflusstrakt des linearen Herzschlauchs exprimiert. Im weiteren Verlauf der kardiogenen Entwicklung konnte *Fbxl22* im Ventrikel, Atrium, Einflusstrakt und Ausflusstrakt nachgewiesen werden. Eine zusätzliche Expressionsdomäne konnte ab Tag E10,5 in den anterioren Somiten in sich bildenden Myotom detektiert werden. Da *Fbxl22* nicht nur im Herzen exprimiert war, sondern auch in den Somiten, legt dies die Hypothese nahe, dass *Fbxl22* möglicherweise eine Rolle in verschiedenen Muskeltypen spielen könnte.

Zur gewebespezifischen Auflösung des Expressionsmusters wurden transversal geführte Dünnschnittschnitte der Embryonalstadien E8,5, E10,5, E12,5, E14,5 vom Herzen, sowie sagittale Schnitte von E16,5 alte ganze Embryonen, angefertigt. Ab Tag E8,5 kann *Fbxl22* im Myokard des Ventrikels und des Atriums nachgewiesen werden. Die Expression des *Fbxl22* Gens blieb während der Herzentwicklung auf Zellen des Myokards beschränkt. Am Tag E16,5 wurden weitere Expressionsdomänen analysiert. Nicht nur Zellen des Myokards exprimieren *Fbxl22*, sondern auch Skelettmuskelzellen der Zunge und glatte Muskeln der Blase. Die Intensität des Farbpräzipitats ist in der Blase, verglichen mit den anderen Expressionsdomänen, am höchsten, wenngleich eine quantitative Aussage mit der verwendeten Methode nur sehr eingeschränkt möglich ist. Semi-quantitative RT-PCR Messungen der Expressionsniveaus adulter Organe konnten die im embryonalen Stadium gewonnen Eindruck weiter bekräftigen. Daraus ergibt sich eine mögliche weitere Rolle von *Fbxl22*. Es wäre durchaus möglich, dass *Fbxl22* eine frühe und eine späte Rolle in der Muskelentwicklung haben könnte. Um einen Einblick in die frühe Rolle von *Fbxl22* in der Muskelentwicklung zu bekommen, bot sich eine Expressionsanalyse von C2C12 Myoblasten an. Aufgrund ihres Potentials, in Myotuben zu differenzieren, stellte diese Zelllinie eine geeignete Möglichkeit dar. Quantifizierung der Expression während der myogenen Differenzierung von C2C12 Zellen zeigt einen frühen Anstieg des Levels bis zu einem Maximum am Tag 2 und einer schrittweisen Reduktion bis zum Tag 6, an dem die Differenzierung abgeschlossen war. Das Expressionsniveau in ausdifferenzierten Myoblasten ist, verglichen mit dem undifferenzierten Zustand, erhöht. Die frühe und späte Expression von *Fbxl22* in allen Muskelzelltypen lässt auf eine frühe und eine späte

Rolle in der Muskelzelle vermuten. Der frühe Expressionsanstieg könnte auf eine Rolle während der Differenzierung von Muskelzellen hinweisen, während die späte Expression auf eine Rolle bei der Erneuerung oder der postnatalen Entwicklung von Muskelzellen vermuten lässt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass F-Box-Proteine verschiedene Funktionen in Muskelzellen haben. Das F-Box-Gen *Fbxo40* z.B. ist nur im Herzen und in Skelettmuskeln adulter Mäuse exprimiert. Die Expression startet 2 Wochen nach der Geburt und erreicht das höchste Niveau im adulten Skelettmuskel. Aufgrund der spezifischen und späten Expression vermuteten Ye et al. einen Einfluss auf die Muskelatrophie (Ye et al. 2007). *Fbxo25*, ein weiteres F-Box-Gen, ist unter anderem im fetalen und adulten Herzen exprimiert. Jang et al. konnten zeigen, dass *Fbxo25* in der Lage ist, kardiogene Transkriptionsfaktoren abzubauen (Jang et al. n.d.). Ein weiteres muskelspezifisches Protein, welches sowohl während der Embryogenese, als auch im frühen postnatalen Zeitraum exprimiert ist, ist das RING-Finger-Protein MurF2. Es ist ab dem Tag E9,5 im embryonalen Herzen zu detektieren und erreicht sein Maximum zwischen E18,5 und P9 und ist im adulten Herzen nur noch schwach exprimiert. Zusätzlich zeigt sich ein Unterschied zwischen linken Atrium und linken Ventrikel. MurF2 hat verschiedene Aufgaben im Herzen, abhängig davon, ob es sich um die frühe Herzentwicklung handelt oder um die Postnatale. Während der perinatalen Kardiogenese ist MurF2 im Abbau und Wiederaufbau von Sarkomeren der sich teilenden Kardiomyozyten beteiligt, während seine Aufgabe im adulten Herzen die Regulation von hypertrophen Wachstumsprogrammen ist (Perera et al. 2011). Wie *MurF2* zeigt, kann ein Gen sowohl eine Rolle in der frühen Muskelentwicklung haben, als auch in bereits ausdifferenzierten Muskelzellen. Wie die Expressionsdaten von *Fbxl22* zeigten, war *Fbxl22* ab dem Tag E8,5 exprimiert, was auf eine frühe Rolle in der Muskelentwicklung hinweist. Aufgrund der anhaltenden Expression in adulten Organen könnte vermutet werden, dass *Fbxl22* eine Rolle in der Entwicklung postnataler Muskeln haben könnte. Von einigen Substraten der MURF-Familie ist z.B. bekannt, dass in der frühen postnatalen Phase eine andere Isoform von ihnen exprimiert wird (Kedar et al. 2004)(Agarkova et al. 2000). Solche Modifikationen sind für die Entwicklung des Säugetier-Myokards entscheidend, da dadurch die metabolischen und strukturellen Veränderungen eintreten, die das postnatale Leben fordert (Perera et al. 2011). Die Expression von *Fbxl22* in adulten Organen könnte damit auf eine mögliche Rolle im postnatalen

Muskel deuten, wie z.B. die Veränderung eines Muskelfasertypen oder eine Veränderung im Energiemetabolismus (Brauner et al. 2006). Eine Rolle bei der neuromuskulären Verbindungsreifung wäre auch denkbar (Dennis 1981)(Kummer et al. 2006). Da *Fbxl22* in verschiedenen Muskeln exprimiert war, könnte vermutet werden, dass *Fbxl22* eine gemeinsame Rolle in glatten Muskelzellen, Skelettmuskelzellen und Kardiomyozyten haben könnte. Es könnte sich um einen sogenannten pan-Muskelmarker handeln. Dies ist ein Faktor, der eine Rolle bei allen Muskeltypen spielt. Die Familie der „Myocyte enhancer family-2 transcriptions factors“ (Mef2) ist z.B. in der Aktivierung von muskelspezifischen Genen involviert. Obwohl Mef2 Proteine in vielen Geweben vorkommen, aktivieren sie die Expression von muskelspezifischen Genen nur in sich entwickelnden Kardiomyozyten, Skelettmuskeln und glatten Muskelzellen (Parker et al. 2003). Mef2 Proteine sind für die Differenzierung von Muskelzellen wichtig, aber die Aktivierung muskelspezifischer Gene muss auch wieder abgestellt werden können. Das Expressionsmuster von *Fbxl22* könnte auf die Möglichkeit deuten, dass *Fbxl22* eine solche Rolle in der Muskelentwicklung hat.

4.2 Funktion des Fbxl22 Proteins

4.2.1 Überexpression des murinen F-box-Proteins Fbxl22 führt zu unterschiedlichen, Zelltyp abhängigen, subzellulären Lokalisierungen

Um einen Einblick in die mögliche Rolle von *Fbxl22* zu bekommen, wurde eine zelluläre Lokalisierungsstudie durchgeführt. Lokalisiert ein Protein, z.B. im Nukleus, könnte dies ein Hinweis sein, dass es sich um einen Transkriptionsfaktor handeln könnte oder um Zellzyklusregulatoren. Die Lokalisierung im Golgi-Apparat könnte z.B. auf eine Rolle in der posttranslationalen Modifizierung von Proteinen weisen. Während die Lokalisierung am Zytoskelett auf eine mögliche Rolle des Zytoskeletumbaus weisen könnte, wie es während der Differenzierung von Zellen stattfindet.

Es zeigte sich, dass das vollständige Protein in NIH3T3, eine Fibroblastenzelllinie, und in HEK293, eine epitheliale Zelllinie, ubiquitär lokalisierte, wobei es etwas stärker im Kern war. Die dominant-negative Variante zeigte auch eine ubiquitäre Lokalisierung, schien jedoch schwächer im Nukleus zu sein. In C2C12, eine

Myoblastenzelllinie, und HL-1, eine Kardiomyozytenzelllinie, lokalisierte das vollständige Protein im Zytoplasma, während die dominant-negative Variante ubiquitär, etwas stärker im Kern, lokalisierte. *Fbxo40* z.B., welches eine Rolle bei der Muskelatrophie spielt und nur in adulten Skelettmuskeln exprimiert ist, lokalisiert in C2C12 Zellen rein zytoplasmatisch (Ye et al. 2007). Obwohl die bisherigen Hinweise auf eine allgemeinere Rolle von *Fbxl22* in allen Muskeltypen hinweist, ist es nicht gänzlich auszuschließen, dass *Fbxl22* eine Rolle bei der Muskelatrophie spielt. Im Gegensatz dazu zeigt *Fbxo25* eine rein nukleare Lokalisierung. Die Funktion von *Fbxo25* ist die Degradierung von kardiogenen Transkriptionsfaktoren (Jang et al. n.d.). Dies legt die Vermutung nahe, dass für *Fbxl22*, aufgrund seiner zytoplasmatischen Lokalisierung in C2C12 und HL-1 Zellen, Transkriptionsfaktoren nicht die Zielsubstrate sind. Obwohl die Lokalisierung in glatten Muskelzellen nicht untersucht wurde, legt die Lokalisierung von C2C12 Zellen und HL-1 Zellen die Vermutung nahe, dass *Fbxl22* in allen Muskelzellen gleich lokalisiert. Dies würde die Hypothese stärken, dass es sich bei *Fbxl22* um einen pan-Muskelmarker handeln könnte.

Interessanterweise ist die Lokalisierung in NIH3T3 und HEK293 Zellen genau gegenläufig. Hier lokalisiert das vollständige Protein auch ubiquitär, jedoch verstärkt im Kern, während die dominant-negative Variante vermehrt zytoplasmatisch lokalisierte. Damit ein Protein nukleär lokalisiert, müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein. Viele Kernproteine besitzen dafür ein sogenanntes Kernlokalisierungssignal (KLS). KLS sind kurze Sequenzen, welche es einem Protein aufgrund seines hohen Anteils an positiven Aminosäuren ermöglicht, in den Nukleus geschleust zu werden. Ein solches Signal wurde jedoch bei *Fbxl22* nicht gefunden. Eine weitere mögliche Erklärung für die nukleäre Lokalisierung könnte der Transport durch ein zweites Protein darstellen. Wie Farin et al. zeigen konnte, führt die Koexpression einer *Tbx15* Nuklearlokalisierungsdeletionsmutante zusammen mit *Tbx18* zu einer Relokalisierung in den Nukleus. Sie erklären den Effekt aufgrund einer Dimerisierung zwischen den beiden T-box Faktoren. Somit ist ein Protein in der Lage, ein zweites mit in den Kern zu bringen (Farin et al. 2007). Es wäre durchaus möglich, dass *Fbxl22* in NIH3T3 oder HEK293 Zellen ein anderes Protein bindet, als in C2C12 oder HL-1 Zellen und dieses *Fbxl22* mit in den Kern transportiert. Es stellt sich jedoch die Frage, inwieweit die Expression in NIH3T3 oder HEK293 relevant ist, da *Fbxl22 in vivo* nur in Muskelzellen exprimiert ist.

4.2.2 Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen das murine Fbxl22

Da bislang nur mit exogenem Protein gearbeitet wurde, sollte im nächsten Schritt ein Antikörper hergestellt werden. Die hergestellten GST-Fbxl22 und GST-d.F.Fbxl22 Fusionsproteine wurden an die Firma Eurogentec übergeben, welche die Injektionen und Blutungen übernommen haben. Die von der Firma Eurogentec erhaltenen Seren wurden auf ihre Spezifität hin untersucht. Im Western Blot wurde der Antikörper auf überexprimiertes, als auch auf endogenes Protein, getestet. Es wurden jedoch eine Vielzahl an Proteinen detektiert. Aus diesem Grunde wurden die Seren über eine selbst hergestellte Affinitätssäule aufgereinigt. Der aufgereinigte Antikörper konnte im Western Blot weder das überexprimierte, noch das endogene Protein nachweisen. Der Versuch Fbxl22 zu immunpräzipitieren schlug fehl. Da die Identität des verwendeten Antigens massenspektrometrisch bestätigt worden war und auch keine falsch positiven Signale im Western Blot mit dem Fbxl22.GST Bakterienlysat detektierbar waren, ist davon auszugehen, dass die Immunogenität des Antigens in diesem Versuch nicht zur Darstellung spezifischer Antikörper ausreichte.

4.2.3 Fbxl22 ist Teil des SCF-Komplexes

Die F-Box, ein Motiv welches alle F-Box-Proteine gemeinsam haben, vermittelt die Assoziation mit dem Proteinabbaukomplex SCF, der stellvertretend für seine Bestandteile Skp1, Cullin1 und einem F-Box-Protein steht (Bai et al. 1996). Da F-Box-Proteine verschiedene Aufgaben erfüllen können, wie z.B. im Fall von *Fbxl15*, welches den Bmp-Signalweg beeinflusst (Cui et al. 2011), war es wichtig zu überprüfen, ob Fbxl22 einen SCF-Komplex bilden kann. Hierfür wurden das vollständige Protein und die F-Box Deletionsmutante in HeLa Zellen überexprimiert und mit Hilfe des Fusionsproteins immunpräzipitiert. Das vollständige Protein war in der Lage, die SCF Untereinheiten Skp-1 und Cullin-1 zu co-immunpräzipitieren. Im Gegensatz dazu konnte die F-Box Deletionsmutante keine der beiden Untereinheiten co-immunpräzipitieren. Jedoch muss bedacht werden, dass bei der Überexpression von Proteinen das physiologische Gleichgewicht der Zelle gestört wird und es immer zu falsch-positiven Interaktionen kommen kann. Wenn möglich, sollte immer endogenes Protein immunpräzipitiert werden. Da es jedoch keinen Antikörper gegen

Fbxl22 zu kaufen gab und die Generierung eines Antikörpers fehl schlug, kann nur auf die Ergebnisse der Überexpressionsversuche zurückgegriffen werden. Dadurch, dass die endogenen Bestandteile des SCF Komplexes co-immunpräzipitiert werden konnten, ist es höchst wahrscheinlich, dass Fbxl22 ein SCF-Komplex bilden kann. Zusätzlich könnte der umgekehrte Weg gegangen werden. Die Immunpräzipitation eines der Bestandteile des SCF-Komplexes und der Versuch, Fbxl22 zu co-immunpräzipitieren. Eine weitere Möglichkeit die Daten weiter zu verifizieren bestünde darin, *in vitro* translatiertes Protein für die Immunpräzipitation zu nehmen.

4.2.4 Fbxl22 könnte durch den APC/C^{Cdc20} reguliert werden

Die Funktion von Proteinen kann sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationeller Ebene reguliert werden. Transkriptionsfaktoren können als Repressoren oder Aktivatoren gezielt Kontrolle über die Aktivität eines Proteins ausüben. Auf translationeller Ebene kann dies durch verschiedene Abbaukomplexe geleistet werden. Durch die Zugabe eines proteasomspezifischen Inhibitors, wie MG132, können Proteine nicht mehr durch das Proteasom abgebaut werden. Fbxl22 transfizierte Zellen wurden mit MG132 behandelt und die Zellen wurden nach 0h, 4h und 8h geerntet. Bei den mit MG132 behandelten Zellen stieg die Konzentration von Fbxl22 mit der Zeit an. Somit ist es wahrscheinlich, dass Fbxl22 durch das Proteasom abgebaut werden kann. Welche Sequenzen können als Signale für den Abbau eines Proteins dienen? Bei der *in silico* Analyse von Fbxl22 über die „The Eukaryotic Motif resource for Functional Sites in Protein (ELM)“ Seite, ist die D-Box als mögliches Motiv bestimmt worden. Die D-Box wird von den beiden Co-Aktivatoren Cdc-20 und Frz-1 (Cdh-1) des Abbaukomplexes APC/C erkannt (Pfleger & Kirschner 2000). Es sollte getestet werden, ob Fbxl22 durch einen von den beiden Co-Aktivatoren reguliert wird. Dazu wurden HeLa Zellen mit dem Fbxl22 Überexpressionskonstrukt und einem der beiden Co-Aktivatoren kotransfiziert. Dann wurde versucht, durch die Immunpräzipitation von Fbxl22, einer der beiden co-Aktivatoren zu co-immunpräzipitieren. Cdh-1 konnte nicht co-immunpräzipitiert werden. Cdc-20 lieferte widersprüchliche Daten. Damit lag der Schluss nahe, dass diese Experimentstrategie nicht funktionierte. Aus diesem Grund wurde ein anderer Ansatz gewählt. Sollte einer der beiden co-Aktivatoren an der Degradierung von Fbxl22 beteiligt sein, sollte durch die Erhöhung der Konzentration eines co-Aktivators

das Proteinniveau von Fbxl22 sinken, da seine Degradierung durch eben diesen vermittelt wird. Sollte keiner der beiden co-Aktivatoren für die Vermittlung der Degradierung zuständig sein, sollte sich an dem Proteinniveau von Fbxl22 nichts ändern.

Mit steigender Konzentration an Cdh-1.myc, steigt das Proteinniveau von Fbxl22 zunächst an, fällt aber bei noch weiterer Erhöhung ab. Dass heißt, dass es eher unwahrscheinlich ist, dass der Abbau von Fbxl22 durch Cdh-1 vermittelt wird. Eine Erhöhung der Konzentration von Cdc-20.Ha führte wie im Fall von Cdh-1 zunächst zu einer Erhöhung des Fbxl22 Proteinniveaus. Bei weiterer Erhöhung der Cdc-20 Konzentration kam es zu einem leichten Abfall des Fbxl22 Proteinniveaus. Dies bedeutet höchstwahrscheinlich, dass weder Cdh-1 noch Cdc-20 an der Degradierung von Fbxl22 beteiligt sind.

Aus der Literatur ist bekannt, dass sowohl Cdh-1, als auch Cdc-20 wichtige Funktionen in der Regulierung des Zellzyklus haben (J L Burton & M J Solomon 2000)(Hilioti et al. 2001)(Pfleger et al. 2001)(Schwab et al. 2001). Einer der Gründe warum bei der Überexpression solch widersprüchliche Daten herausgekommen sind, könnte darauf beruhen, dass die Überexpression von Zellzyklusregulatoren schwerwiegende Folgen für die Zelle haben kann. Das könnte erklären, warum es bei steigender Konzentration eines der co-Aktivatoren zu einer Erhöhung des Proteinniveaus von Fbxl22 kommt und schließlich zu einem leichten Abfall. Übersteigt das Niveau eines der beiden co-Aktivatoren einen Schwellwert, werden Kontrollmechanismen induziert, die zu einem Zellzyklusarrest führen können. Aus der Literatur ist bekannt, dass Cdc-20 von dem Tumorsupressor p53 reguliert wird (Banerjee et al. 2009). Die Überexpression von Cdc-20 führt zu verschiedenen mitotischen Abnormalitäten, wie z.B. Probleme bei der Chromosomenkondensation, zu früher Übergang in die Anaphase und Aneuploidie (Nath et al. 2011). Die Überexpression von Cdh-1 führt z.B. zu einer Verringerung der Glykosylierung und Zellproliferation (Almeida et al. 2010). Durch einen solch massiven Eingriff in den Zellzyklus, ist es wahrscheinlich, dass sowohl die Proteinsynthese, als auch die Proteindegradation beeinflusst sind. Dies könnte dazu führen, dass Fbxl22 nicht abgebaut wird.

Ein besserer Ansatz wäre wahrscheinlich, sich den Verlust der co-Aktivatoren auf die Konzentration von Fbxl22 anzuschauen. Dies könnte mittels siRNA induzierter

Herunterregulierung eines der beiden co-Aktivatoren geschehen. Dann wird im Western Blot das Proteinniveau von Fbxl22 untersucht. Dies könnte jedoch wiederum einen Effekt auf den Zellzyklus haben. Der Verlust eines Zellzyklusregulators kann sich auf die Zellphysiologie auswirken. Der Verlust von Cdh-1 führt in HEK293 Zellen zu einer Erhöhung der Proliferationsrate und Glykosylierung (Almeida et al. 2010). Der Verlust von Cdc-20 führt zu einer Verlängerung der Mitosephase und zusätzlich werden die Substrate des APC/C^{Cdc20} nicht mehr abgebaut, wie Zyklin B1 oder Securin (Chow et al. 2011). Dass heißt, dass der Verlust eines der co-Aktivatoren auch weitreichende Folgen für die Zellen hätte und sich damit wohl auch auf den Degradierungsprozess von Fbxl22 auswirken könnte.

Eine Möglichkeit, die Auswirkung durch den Verlust oder die Überexpression von Cdc-20 und Cdh-1 zu umgehen, bestände darin, die co-Aktivatoren und Fbxl22 durch *in vitro* Translation herzustellen, und damit Co-Immunpräzipitationsexperimente durchzuführen. Hier könnte jedoch die Problematik auftauchen, dass eventuell irgendwelche Faktoren fehlen, welche die Bindung überhaupt ermöglichen oder stabilisieren. Daraus ergibt sich, dass eine Kombination aus beiden Verfahren am sinnvollsten wäre. Die co-Aktivatoren Cdc-20 und Cdh-1 werden mittels *in vitro* Translation hergestellt und diese dann mit einem Fbxl22 Zelllysate inkubiert. In dem Zelllysate sollten alle für eine Bindung erforderlichen Faktoren enthalten sein. Es handelt sich zwar nicht mehr um physiologische Bedingungen, es könnte aber ausreichen, um eine Bindung zu ermöglichen.

4.2.5 Generierung einer *Fbxl22* Nullmutante

Um den Effekt des Verlusts von *Fbxl22* *in vivo* analysieren zu können, sollte eine „knock in“ Mausmutante generiert werden. Dazu wurde ein KI-Konstrukt kloniert, bei welchem in das erste Exon, indem sich das erste kodierende ATG befand, ein Cre-EGFP Fusionsprotein eingefügt wurde. Damit sollte zum einen der Effekt des Verlustes von *Fbxl22* untersucht werden, und zum anderen könnte die endogene Expression durch das Cre-EGFP Fusionsprotein verfolgt werden. Dieses wurde in die ES Zelllinie 129 cast #3 elektroporiert, selektioniert, die DNS gewonnen und mittels RFLP Analyse nach korrekt rekombinierten Klonen hin untersucht. Es wurden ca. 1100 Klone untersucht. Es konnte jedoch kein Klon detektiert werden, der das Konstrukt an die richtige Stelle integriert hat. Dafür kann es unterschiedliche

Erklärungen geben. Wie gut ein Konstrukt in den ES Zellen rekombiniert ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig. Zum einen kommt es auf die Größe der Homologiearme an. Beide Arme zusammen sollten ca. 7 kB groß sein (<http://www.research.uci.edu/tmf/constructDesign.htm>). Einer von beiden Armen sollte zwischen 5-6 kB groß sein, während der andere 1-2 kB groß sein sollte. Die Homologiearme des hier klonierten Konstrukts hatten eine Länge von 5,6 kB und von 2,7 kB. Eine Verlängerung der Homologieregionen könnte somit die Integration erleichtern. Ein weiterer Faktor der sich auf die Frequenz der homologen Rekombination auswirkt, besteht in der Auswahl der DNS, aus welchem die Homologiearme amplifiziert werden. Die Homologiearme sollten immer aus der DNS derjenigen ES-Zellelinie amplifiziert werden, in die hinterher auch das Konstrukt elektroporiert werden soll. Die Homologiearme des Fbxl22 KI-Konstrukts wurden aus einer kommerziell erhältlichen DNS amplifiziert. Die Problematik in der Gewinnung der Homologiearme aus ES Zellen besteht jedoch darin, dass bereits enthaltene Fehler in der ES Zell DNS mit amplifiziert werden.

Eine dritte Möglichkeit die Frequenz der homologen Rekombination zu beeinflussen, liegt in der Anzahl repetitiver Sequenzen in den Homologiearmen. Repetitive Sequenzen sind Abschnitte auf der DNS, deren Sequenz aus sich wiederholenden Abschnitten besteht. Je weniger repetitive Sequenzen vorhanden sind, desto öfter tritt die homologe Rekombination auf (<http://www.research.uci.edu/tmf/constructDesign.htm>). Eine mit der Software RepeatMasker durchgeführten Sequenzanalyse der Homologiearme erbrachte für den 5' Homologiearm einen Anteil an repetitiven Sequenzen von 7 % (168 bB). Die Analyse des 3' Homologiearms ergab einen Anteil von 3 % (174 bB) an repetitiven Sequenzen. Dabei handelte es sich größtenteils um sogenannte eingestreute Kernsequenzelement-Sequenzen (Short interspersed elements: SINEs). Das sind kleine, 100-400 bp lange DNS Sequenzen im Genom. Sie besitzen keine offenen Leseraster und stammen häufig von „revers“ transkribierten kleinen RNS-Molekülen ab, wie z.B. von der 7 SL-RNS, die eine regulierende Funktion auf die Translation hat. SINEs machen ca. 10% des humanen Genoms aus (Knippers 2001). Aufgrund des geringen Anteils dieser repetitiver Sequenzen innerhalb der Homologiearme, dürfte der Anteil keinen großen Effekt auf die Frequenz der homologen Rekombination haben.

Um die Anzahl falsch-positiver Klone zu reduzieren, könnte zusätzlich ein negativ-Selektionsmarker benutzt werden, wie z.B. die Selektion über das diphtheria toxin A fragment (DT-A). Das DT besteht aus einem A- und einem B-Fragment. Das B-Fragment bindet einen Rezeptor an Zelloberfläche und induziert damit den Transfer des A Fragments in das Zytoplasma. Das A-Fragment katalysiert den Transfer der ADP-Ribosylgruppe von NAD^+ an das Protein, Elongin Faktor 2 (EF-2), wodurch dieses inaktiviert wird, was wiederum die Proteinsynthese inhibiert und zum Tod der Zelle führt (Yagi et al. 1993). Dass heißt, dass Zellen, die das Konstrukt in den falschen Bereich des Lokus integriert haben, für das Toxin kodieren und sterben. Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die Verwendung eines negativen Selektionsmarkers die Anzahl neo-resistenter „falsch positiver“ Klone reduzieren könnte. Die Rekombinationshäufigkeit wird hierdurch jedoch nicht verbessert, so dass lediglich eine hohe Anzahl an zu testenden Klonen den Erfolg des KI begünstigen könnte.

4.2.6 Die Misexpression des vollständigen Proteins in allen Zellen führt zu einem Wachstumsverlust

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der frühen Misexpression von *Fbxl22* in allen Zellen hemizygoter Männchen untersucht. Hemizygote Männchen boten sich für diese Analyse an, da sie das Transgen (homozygot) in allen Cre positiven Zellen exprimieren. Die frühe Induktion der Misexpression von *Fbxl22* im Blastozysten-Stadium erlaubte die Effekte in der frühen und späten Phase der Organogenese zu studieren.

Hemizygote *Tbx3^{cre/+}*, *Hprt^{Fbxl22/Fbxl22}* Mäuse zeigten einen frühen Wachstumsdefekt, der bis ins adulte Alter P180 bestehen blieb. Die Transgenmäuse waren im Schnitt 10 % leichter als die Wildtypmäuse. Dies könnte auf eine Misregulation der Proliferation hindeuten. Sollte ein allgemein gültiger Proliferationseffekt vorliegen, so sollte der Gewichtsverlust auch in anderen Organen zu finden sein. Tatsächlich zeigte die morphologische Untersuchung von Herz, Leber und Milz bei P180 einen deutlichen Gewichtsunterschied zum Wildtyp auf. Im Gegensatz dazu zeigten weder Blase, die als Modellorgan für glatte Muskeln dient, noch Zunge, als Modellorgan für Skelettmuskel, einen Größenunterschied. Jedoch muss hier berücksichtigt werden, dass weder bei der Blase noch bei der Zunge quantifiziert wurde. Die

Gewichtsreduktion des Herzens, der Leber und der Milz spricht dafür, dass *Fbxl22* in der Aufrechterhaltung der Proliferation eine Rolle spielt. Es darf jedoch nicht vergessen werden, dass *Fbxl22* in dieser Analyse ubiquitär exprimiert wurde. Das heißt, dass der Effekt der Gewichtsreduktion eventuell auf die Misexpression von *Fbxl22* in nicht Muskelzellen zurückzuführen ist. Wie bereits in der Lokalisierungsstudie gezeigt wurde, lokalisiert *Fbxl22* in epithelialen Zellen (HEK293) ubiquitär, jedoch verstärkt im Nukleus, während in Myoblasten eine rein zytoplasmatische Lokalisierung detektierbar war. Das bedeutet, dass *Fbxl22* aufgrund seiner Lokalisierung Substrate im Nukleus zum Abbau markieren könnte. Eine mögliche Gruppe von Proteinen, die die Proliferation steuern und im Zellkern lokalisieren, sind Zellzyklusregulatoren. Zellzyklusregulatoren stellen sicher, dass der Ablauf des Zellzyklus korrekt abläuft (Brooks et al. 1998). Es wäre möglich, dass eine Misexpression von *Fbxl22* in epithelialen Zellen zu einer Misregulation der Proliferation durch den Abbau von Zellzyklusregulatoren führen könnte. Es gibt verschiedene weitere Faktoren, die einen Einfluss auf den Zellzyklus haben können, z.B. Mitglieder der E2 Transkriptionsfaktor-Familie und Wachstumsfaktoren wie dem Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) (Brooks et al. 1998). IGF-1 ist ein einkettiges Polypeptid, das eine Strukturhomologie zum Proinsulin aufweist. IGF-1 hat sowohl einen metabolischen Effekt, als auch einen Effekt auf die Proliferation und Differenzierung verschiedener Zellen. Der mitogene Effekt wird größtenteils durch die Bindung an den Typ 1 IGF Rezeptor vermittelt. Verlustmutanten, denen entweder der IGF-1 oder/und Typ1 IGF Rezeptor fehlt, zeigen eine embryonale und postnatale Wachstumsverzögerung ohne einen spezifischen Herzphänotypen aufzuweisen (Ahuja et al. 2007). Der Verlust des F-Box-Gen *Fbxw8* z.B. führt zu einer pre- und postnatalen Wachstumsverzögerung. Tsutsumi et al. konnten zeigen, dass *Fbxw8*^{-/-} Mäuse eine bis zu 83 %-ige Größenreduktion aufwiesen. Zusätzlich konnten sie in einem Expressionsprofil zeigen, dass die Expression des insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor Bindungsprotein (IGFBP1) in *Fbxw8*^{-/-} erhöht war. Sie weisen auf die Möglichkeit hin, dass die Größenreduktion möglicherweise auf die erhöhten Niveaus an IGFBP1 zurückzuführen sein könnte. Des Weiteren konnten sie zeigen, dass *Fbxw8* ein Komplex mit Cul-7 eingeht und nicht mit Cul-1, wie ein Großteil der bisher untersuchten F-Box Proteine (Tsutsumi et al. 2008). Es könnte damit auch die Möglichkeit bestehen, dass *Fbxl22* eventuell mit anderen Cullin-Proteinen ein

Komplex bildet. Dadurch würde sich die Möglichkeit ergeben, dass *Fbxl22* weitere regulatorische Rollen übernehmen könnte.

Histologische Untersuchungen von Herz, Blase und Zunge mittels HE, Tri-Chrom und Sirius-rot Färbungen zeigten keinen offensichtlichen morphologischen Unterschied zwischen Wildtyp und Transgen. Sollte nur ein bestimmter Zelltyp auf die Misexpression von *Fbxl22* reagieren, würde auch nur dieser Zelltyp und das sich daraus zusammengesetzte Gewebe einen Phänotypen aufweisen. Da es jedoch keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Transgen gab, ist es wahrscheinlicher, dass alle Zellen von diesem Effekt gleichermaßen betroffen waren. Aus der Expressionsanalyse der differenzierenden C2C12 Myoblasten ging eine frühe Hochregulation von *Fbxl22* hervor. Differenzierende Zellen proliferieren nicht mehr, da Programme für den Umbau eingeschaltet wurden und Programme für die Proliferation inhibiert sind. Die aus der *in vivo* Analyse erhaltenen Daten deuten damit eher auf eine Rolle bei der Proliferation hin, als auf eine Rolle bei der Differenzierung. Zellkulturexperimente, in denen C2C12 Myoblasten mit Überexpressionskonstrukten transient transfiziert wurden, zeigten keinen offensichtlichen Unterschied bei sich bildenden Myotuben im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen (Daten nicht gezeigt). Berücksichtigt werden muss hier allerdings die geringe Transfektionsrate der C2C12 Zellen, die bei nur ca. 15 % lag. Es könnte sein, dass die Anzahl an transfizierten Zellen zu gering war, um einen Unterschied in der Anzahl an entstehenden Myotuben zu erkennen. In shRNA Experimenten, in denen *Fbxl22* spezifisch herunterreguliert wurde, konnte ebenfalls kein Unterschied im Differenzierungsverhalten von C2C12 Zellen erkannt werden. D. h., dass *Fbxl22* wahrscheinlich keine Rolle bei der Induktion der Differenzierung spielt. Wäre dies der Fall, wären wahrscheinlich Unterschiede bei der Myotubenbildung entdeckt worden. Vermutlich würde die Anzahl, Größe oder der zeitliche Verlauf der Myotuben variieren.

Die Gewichtsreduktion der Organe ist bereits in der frühen, postnatalen Entwicklungsstufe erkennbar. Herz, Leber und Milz zeigten mit P90 und mit P30 bereits deutliche Gewichtsunterschiede, wobei der Unterschied mit fortschreitendem Alter zunahm. Mit P30 betrug der Unterschied zwischen Wildtyp- und Transgenherzen ca. 9 %, während in P180 alten Herzen der Unterschied bei 26 % lag. Dies würde zu der Vermutung passen, es könnte sich um ein

Proliferationsproblem handeln. Je älter die Organe werden, desto stärker zeigt sich der Effekt durch die anhaltende Misregulierung.

Da jedoch nicht ausgeschlossen werden kann, dass es sich bei dem Gewichtsverlust um einen Sekundäreffekt handeln könnte, der durch das verkleinerte Herz und der damit verbunden Unterversorgung aller anderen Organe entsteht, sollte durch eine herzspezifisch induzierte Überexpression von *Fbxl22* erfolgen. *Myh6* ist ein in Kardiomyozyten spezifisch exprimiertes Gen. Es ist stark in den Kardiomyozyten, der Atrien und der Ventrikel exprimiert (Ching et al. 2005). Hemizygote *Myh^{cre/+}*, *Hprt^{Fbxl22/Fbxl22}* Mäuse wurden geboren und entwickelten sich, bis zum Tag P30 ohne offensichtlichen morphologischen Unterschiede. Die Gewichtsmessungen am Tag P30 zeigten keine Unterschiede zu den Wildtypmäusen. Die Gewichtsmessung der Herzen wies keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollherzen auf. Damit ist es höchstwahrscheinlich, dass die Gewichtsunterschiede, die in den hemizygoten *Tbx3::cre* induzierten *Hprt^{Fbxl22/Fbxl22}* Mäusen entdeckt wurden, entweder auf das kleinere Herz zurückzuführen sind, oder auf die Misexpression in nicht Muskelzellen. Aufgrund der Lokalisierungsstudie, die *Fbxl22* im Nukleus von Fibroblasten (NIH3T3) und epithelialen Zellen (HEK293) zeigte, in Myoblasten (C2C12) und Kardiomyozyten (HL-1) jedoch im Zytoplasma, ist es eher wahrscheinlich, dass die Gewichtsunterschiede auf die Misexpression in Epithelialen- und Fibroblastenzellen zurückzuführen ist. Sollte es sich um eine Deregulation der Proliferation handeln, ist es wahrscheinlich, dass ein Zellzyklusregulator, welcher normalerweise im Nukleus lokalisiert, verändert ist. Da *Fbxl22* in NIH3T3 und HEK293 Zellen im Kern lokalisiert, könnte es sein, dass *Fbxl22* in diesen beiden Zelltypen einen Zellzyklusregulator für den Abbau markiert. Dies könnte wiederum Auswirkungen auf den Zellzyklus und die Proliferation haben. Wie bereits erwähnt, führt der Verlust von Cdc-20 zu einer Verlängerung der Mitosephase und zu einer verlangsamten Proliferationsrate (Chow et al. 2011). Aufgrund der zytoplasmatischen Lokalisierung von *Fbxl22* in Muskelzellen, ist ein *Fbxl22* induzierter Abbau von Zellzyklusregulatoren eher unwahrscheinlich.

Wie bereits erwähnt hatte die kardiogene Misexpression von *Fbxl22* keine offensichtlichen morphologischen Auswirkungen auf das Herz. Dies wurde durch histologische Analysen bestätigt. Eine mögliche Erklärung, warum sich das Herz normal entwickelt, könnte in dem Ansatz des Experiments liegen. Durch die

Misexpression ist zwar die Möglichkeit gegeben, die Expression von *Fbxl22* spezifisch zu induzieren, jedoch muss bedacht werden, dass *Fbxl22* nur ein Teil eines größeren Komplexes ist. Es wäre durchaus möglich, dass das endogene Niveau der anderen Bestandteile des SCF-Komplexes nicht ausreichend ist, um den Effekt der Misexpression weiterleiten zu können. Auf der anderen Seite ist es auch möglich, zu argumentieren, dass durch die Misexpression das Niveau an *Fbxl22*-Protein so hoch ist, dass jeder SCF-Komplex größtenteils mit einem *Fbxl22*-Protein assoziiert ist. Dadurch wäre es möglich, dass viele andere F-Box-Proteine ihren Aufgaben nicht mehr nachkommen könnten und dies ein inhibitorischen Effekt auf die Proliferation nach sich ziehen könnte. Dennoch können von der Misexpression keine Rückschlüsse auf die mögliche Funktion von *Fbxl22* gewonnen werden.

4.2.7 Die Misexpression des dominant-negativen Proteins in allen Zellen zeigte Unterschiede im Urothel der Blase

Zusätzlich sollte der Effekt der *Tbx3::cre* induzierten d.F.*Fbxl22* Misexpression in hemizygoten Männchen untersucht werden. Durch die Expression der dominant-negativen Variante sollte der Effekt einer Nullmutante simuliert werden. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass das endogene Protein nicht ausgeschaltet ist und es sich daher um ein kompetitives Bindungsverhalten von endogenen und d.F.*Fbxl22* an Cullin-1 handelt.

Hemizygote *Tbx3^{cre/+}*, *Hprt^{d.F.Fbxl22/d.F.Fbxl22}* Mäuse zeigten bis ins Alter P180 keine morphologischen Unterschiede verglichen mit den Wildtypmäusen. Auch das Wachstumsverhalten war unverändert. Aufgrund der Daten aus den *Tbx3^{cre/+}*; *Hprt^{Fbxl22/y}* Misexpressionsmäusen war jedoch eine Gewichtszunahme als konträrer Phänotyp erwartet worden. Auch die Gewichtsmessungen von Herz, Leber und Milz ergaben keine signifikanten Unterschiede. Dafür könnte es mehrere Erklärungen geben. Wie bereits im vorherigen Abschnitt erklärt, könnte der Effekt aus der Misexpression von *Fbxl22* allein aufgrund der Expression in Nicht-Muskelzellen herrühren. Daher hat die Misexpression von d.F.*Fbxl22* keine Auswirkung auf die Größe/Proliferationsrate der Organe. Durch den kompetitiven Effekt zwischen der d.F.*Fbxl22* und dem endogenen *Fbxl22* reicht die Menge an d.F.*Fbxl22* nicht aus, um Auswirkungen auf die Zelle zu haben, wobei die Menge an misexprimierten Proteinen groß genug sein sollte, um den Effekt des endogenen *Fbxl22* unterdrücken zu

können. Die Messungen der Expressionsniveaus in Leber und Lunge zeigten, dass die Expression, verglichen mit den Wildtyporganen, um ein ca. 1000-faches erhöht war. Damit ist es unwahrscheinlich, dass das endogene *Fbxl22* die Expression des *d.F.Fbxl22* kompensieren kann. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass das *d.F.Fbxl22* Protein durch ein anderes Protein ausgeglichen wurde. Dies könnte z.B. ein anderes in seiner Funktion redundantes F-Box-Protein sein.

Da es keine offensichtlichen morphologischen Unterschiede gab, wurden Herz, Blase und Lunge histologisch untersucht. Die Tri-Chrom-Färbung zeigte im Urothel der Blase bei P180 einen Unterschied. Während das Urothel in Wildtypen eine schwache Rotfärbung zeigte, waren Bereiche im Urothel der Transgenmaus stark rot gefärbt. Eine blasser Rotfärbung färbt jegliches Zytoplasma, während eine starke Rotfärbung Muskelzellen anzeigt. Es besteht die Möglichkeit, dass es sich um ein Differenzierungsproblem handeln könnte. Diese Abnormalität lässt sich noch im Alter P90 nachweisen, während P30 alte Blasen keine Auffälligkeiten zeigten. Es scheint sich nicht um ein frühes Differenzierungsproblem zu handeln, da die verschiedenen Gewebetypen im Alter von P30 bereits spezifiziert sind. Daher ist es wahrscheinlich, dass es sich um einen später eintretenden Effekt handelt. Das Urothel der Blase ist einer zytotoxischen Umgebung ausgesetzt und muss daher ständig erneuert werden. Die Analyse der *Fbxl22* Misexpressionsmäuse ergab eine Größenreduktion in den gemessenen Organen und könnte womöglich auf einen Proliferationseffekt zurückgeführt werden. Aus diesem Grund wurde die Proliferation des Blasenurothels der Wildtyp- und Transgenmaus mittels Brdu Inkorporation untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass der Makierungsindex im Wildtypurothel bei 66 % lag, während in der Transgenmaus keine proliferierende Zelle detektiert werden konnte. Zusätzlich wurde das Urothel mittels der „Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling“ (TUNEL) Methode auf Apoptose getestet. Hier zeigte sich, dass die Apoptoserate im Urothel der Transgenmaus bei 46 % lag, während im Wildtypurothel keine Zelle apoptotisch war. Interessanterweise scheint es sich in der *d.F.Fbxl22* Transgenmaus um einen möglichen Proliferationseffekt zu handeln. Jedoch wäre die Erwartung gewesen, dass es sich um eine erhöhte Proliferation handeln würde und nicht um ein Ausbleiben der Proliferation. Bei der hohen Anzahl an apoptotischer Zellen könnte es sich auch um nekrotische Zellen handeln, d.h. um Zellen, die durch äußere Einflüsse sterben. Die TUNEL Untersuchung unterscheidet nicht zwischen apoptierenden und nekrotischen Zellen. Eine Möglichkeit, zwischen Apoptose und Nekrose zu

unterscheiden, wäre, eine Antikörper-Färbung gegen Annexin-V (W. Z. Wang et al. 2008). Annexin-V ist ein Ca^+ -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein, welches Phosphatidylserin bindet. Im frühen Apoptose-Stadium findet eine Veränderung der Exposition von Proteinen in der Zellmembran statt, u.a. die Translokation von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellmembran, welches normalerweise auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran lokalisiert ist. Ein Annexin-V Antikörper kann somit als Sonde für die Phosphatidylserin-Exposition auf der Membranaußenseite genutzt werden. Nekrotische Zellen werden, aufgrund des Verlustes der Membran-Integrität, auch durch einen Annexin-V Antikörper detektiert. Durch gleichzeitige Anwendung eines DNS-Farbstoffes, der nur permeabilisierte Membranen nekrotischer Zellen passiert, kann zwischen nekrotischen und apoptierenden Zellen unterschieden werden.

Da die Veränderung der Apoptose- und Proliferationsrate in einem Gewebekompartiment auftritt, in dem normalerweise kein *Fbxl22* vorhanden ist, können keine Rückschlüsse auf die mögliche Funktion von *Fbxl22* geschlossen werden. Selbst wenn *Fbxl22* normalerweise nicht im Urothel exprimiert ist, sind doch alle Bestandteile des SCF-Komplexes vorhanden. Wird nun *d.F.Fbxl22* in diesen Zellen exprimiert, könnte um Substrate kompetitiert werden, die normalerweise von einem anderen Protein zum Abbau markiert werden. Da die dominant-negative Variante nicht mit dem Komplex assoziieren kann, werden diese Substrate jedoch nicht abgebaut. Da die Misexpression von *d.F.Fbxl22* eine Nullmutante simulieren sollte und *Fbxl22* nicht im Blasenurothel exprimiert ist, handelt es sich hier höchstwahrscheinlich um einen Sekundäreffekt.

5 Literaturverzeichnis

Agarkova, I. et al., 2000. A Novel Marker for Vertebrate Embryonic Heart, the EH-myomesin Isoform. *Journal of Biological Chemistry*, 275(14), 10256 -10264.

Ahuja, P., Sdek, P. & MacLellan, W.R., 2007. Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. *Physiological Reviews*, 87(2), 521-544.

Almeida, A., Bolaños, J.P. & Moncada, S., 2010. E3 ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 accounts for the Warburg effect by linking glycolysis to cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(2), 738 -741.

Aziz, A., Liu, Q. & Dilworth, F.J., 2010. Regulating a master regulator: Establishing tissue-specific gene expression in skeletal muscle. *Epigenetics*, 5(8), 691-695.

Bai, C. et al., 1996. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell*, 86(2), 263-274.

Baker, R.T. & Board, P.G., 1987. The human ubiquitin gene family: structure of a gene and pseudogenes from the Ub B subfamily. *Nucleic Acids Research*, 15(2), 443-463.

Banerjee, T., Nath, S. & Roychoudhury, S., 2009. DNA damage induced p53 downregulates Cdc20 by direct binding to its promoter causing chromatin remodeling. *Nucleic Acids Research*, 37(8), 2688 -2698.

Brauner, P. et al., 2006. Expression of uncoupling protein 3 and GLUT4 gene in skeletal muscle of preterm newborns: possible control by AMP-activated protein kinase. *Pediatric Research*, 60(5), 569-575.

Brooks, G., Poolman, R.A. & Li, J.M., 1998. Arresting developments in the cardiac myocyte cell cycle: role of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Cardiovascular research*, 39(2), 301.

Burton, J.L. & Solomon, M.J., 2000. Hsl1p, a Swe1p inhibitor, is degraded via the anaphase-promoting complex. *Molecular and Cellular Biology*, 20(13), 4614-4625.

Cabane, C. et al., 2003. Regulation of C2C12 myogenic terminal differentiation by MKK3/p38alpha pathway. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 284(3), C658-666.

Capron, A., Okrész, L. & Genschik, P., 2003. First glance at the plant APC/C, a highly conserved ubiquitin-protein ligase. *Trends in Plant Science*, 8(2), 83-89.

Cardozo, T. & Pagano, M., 2004. The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nature reviews Molecular cell biology*, 5(9), 739–751.

- Carrano, A.C. et al., 1999. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nature Cell Biology*, 1(4), 193-199.
- Cenciarelli, C. et al., 1999. Identification of a family of human F-box proteins. *Current Biology: CB*, 9(20), 1177-1179.
- Ching, Y. et al., 2005. Mutation in myosin heavy chain 6 causes atrial septal defect. *Nature Genetics*, 37(4), 423-428.
- Chow, J.P.H., Poon, R.Y.C. & Ma, H.T., 2011. Inhibitory phosphorylation of cyclin-dependent kinase 1 as a compensatory mechanism for mitosis exit. *Molecular and Cellular Biology*, 31(7), 1478-1491.
- Chuang, H., Zhang, W. & Gray, W.M., 2004. Arabidopsis ETA2, an Apparent Ortholog of the Human Cullin-Interacting Protein CAND1, Is Required for Auxin Responses Mediated by the SCFTIR1 Ubiquitin Ligase. *The Plant Cell Online*, 16(7), 1883 -1897.
- Claycomb, W.C. et al., 1998. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(6), 2979-2984.
- Cui, Y. et al., 2011. SCFFBXL15 regulates BMP signalling by directing the degradation of HECT-type ubiquitin ligase Smurf1. *EMBO J*, advance online publication. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.155> [Accessed May 20, 2011].
- Dennis, M.J., 1981. Development of the neuromuscular junction: inductive interactions between cells. *Annual Review of Neuroscience*, 4, 43-68.
- Deveraux, Q. et al., 1994. A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(10), 7059-7061.
- Di Fiore, B. & Pines, J., 2008. Defining the role of Emi1 in the DNA replication–segregation cycle. *Chromosoma*, 117(4), 333-338.
- Fanzani, A. et al., 2007. Phenotypic behavior of C2C12 myoblasts upon expression of the dystrophy-related caveolin-3 P104L and TFT mutants. *FEBS Letters*, 581(26), 5099-5104.
- Farin, H.F. et al., 2007. Transcriptional Repression by the T-box Proteins Tbx18 and Tbx15 Depends on Groucho Corepressors. *Journal of Biological Chemistry*, 282(35), 25748 -25759.
- Furukawa, M. et al., 2000. The CUL1 C-Terminal Sequence and ROC1 Are Required for Efficient Nuclear Accumulation, NEDD8 Modification, and Ubiquitin Ligase Activity of CUL1. *Mol. Cell. Biol.*, 20(21), 8185-8197.

- Glickman, M.H. et al., 1998. A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*, 94(5), 615-623.
- Gloeckner, C.J. et al., 2009. Tandem affinity purification of protein complexes from mammalian cells by the Strep/FLAG (SF)-TAP tag. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 564, 359-372.
- Glotzer, M., Murray, A.W. & Kirschner, M.W., 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, 349(6305), 132-138.
- Goldenberg, S.J. et al., 2004. Structure of the Cand1-Cul1-Roc1 Complex Reveals Regulatory Mechanisms for the Assembly of the Multisubunit Cullin-Dependent Ubiquitin Ligases. *Cell*, 119(4), 517-528.
- Grima, B. et al., 2002. The F-box protein Slimb controls the levels of clock proteins Period and Timeless. *Nature*, 420(6912), 178-182.
- Groll, M. et al., 2000. A gated channel into the proteasome core particle. *Nature Structural Biology*, 7(11), 1062-1067.
- Gruenberg, J., Griffiths, G. & Howell, K.E., 1989. Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *The Journal of Cell Biology*, 108(4), 1301-1316.
- Harper, J.W., Burton, J.L. & Solomon, M.J., 2002. The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes & Development*, 16(17), 2179-2206.
- Hatfield, P.M. et al., 1997. The ubiquitin-activating enzyme (E1) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 11(2), 213-226.
- High, F.A. & Epstein, J.A., 2008. The multifaceted role of Notch in cardiac development and disease. *Nat Rev Genet*, 9(1), 49-61.
- Hilioti, Z. et al., 2001. The anaphase inhibitor Pds1 binds to the APC/C-associated protein Cdc20 in a destruction box-dependent manner. *Current Biology*, 11(17), 1347-1352.
- Hill, C.P., Masters, E.I. & Whitby, F.G., 2002. The 11S regulators of 20S proteasome activity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 268, 73-89.
- Ho, M.S., Tsai, P. & Chien, C., 2006. F-box proteins: the key to protein degradation. *Journal of Biomedical Science*, 13(2), 181-191.
- Hoogaars, W.M.H. et al., 2007. Cardiovascular development: towards biomedical applicability. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(6), 646-660.
- Hörnlimann, B., 2005. [Prions--a challenge of Hygieia]. *Schweizer Archiv Für Tierheilkunde*, 147(1), 25-27.

- Hsu, J.Y. et al., 2002. E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). *Nature Cell Biology*, 4(5), 358-366.
- Hubbard, E.J. et al., 1997. sel-10, a negative regulator of lin-12 activity in *Caenorhabditis elegans*, encodes a member of the CDC4 family of proteins. *Genes & Development*, 11(23), 3182-3193.
- Ilyin, G.P. et al., 1999. Identification of a novel Skp2-like mammalian protein containing F-box and leucine-rich repeats. *FEBS Letters*, 459(1), 75-79.
- Jang, J. et al., A novel Fbxo25 acts as an E3 ligase for destructing cardiac specific transcription factors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, In Press, Uncorrected Proof. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X11007649> [Accessed May 24, 2011].
- Jin, J. et al., 2004. Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes & Development*, 18(21), 2573-2580.
- Kedar, V. et al., 2004. Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(52), 18135-18140.
- Kipreos, E.T. & Pagano, M., 2000. The F-box protein family. *Genome Biology*, 1(5), reviews3002.1-reviews3002.7.
- Kisselev, A.F. et al., 1999. Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Molecular Cell*, 4(3), 395-402.
- Ko, H.W., Jiang, J. & Edery, I., 2002. Role for Slimb in the degradation of *Drosophila* Period protein phosphorylated by Doubletime. *Nature*, 420(6916), 673-678.
- Kobe, B. & Kajava, A.V., 2001. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(6), 725-732.
- Köhler, A. et al., 2001. The substrate translocation channel of the proteasome. *Biochimie*, 83(3-4), 325-332.
- Kramer, E.R. et al., 2000. Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Molecular Biology of the Cell*, 11(5), 1555-1569.
- Kummer, W. et al., 2006. Role of acetylcholine and polyspecific cation transporters in serotonin-induced bronchoconstriction in the mouse. *Respiratory Research*, 7, 65.
- Liu, J. et al., 2002. NEDD8 modification of CUL1 dissociates p120(CAND1), an inhibitor of CUL1-SKP1 binding and SCF ligases. *Molecular Cell*, 10(6), 1511-1518.

- Matsuoka, S. et al., 2008. Fbxw7 acts as a critical fail-safe against premature loss of hematopoietic stem cells and development of T-ALL. *Genes & Development*, 22(8), 986-991.
- Mayr, J. et al., 1998. Late events in the assembly of 20S proteasomes. *Journal of Structural Biology*, 124(2-3), 179-188.
- McElhinny, A.S. et al., 2004. Muscle-specific RING finger-2 (MURF-2) is important for microtubule, intermediate filament and sarcomeric M-line maintenance in striated muscle development. *Journal of Cell Science*, 117(15), 3175 -3188.
- Moberg, K.H. et al., 2001. Archipelago regulates Cyclin E levels in Drosophila and is mutated in human cancer cell lines. *Nature*, 413(6853), 311-316.
- Moberg, K.H. et al., 2004. The Drosophila F box protein archipelago regulates dMyc protein levels in vivo. *Current Biology: CB*, 14(11), 965-974.
- Moon, A., 2008. Mouse models of congenital cardiovascular disease. *Current topics in developmental biology*, 84, 171–248.
- Muzzopappa, M. & Wappner, P., 2005. Multiple roles of the F-box protein Slimb in Drosophila egg chamber development. *Development*, 132(11), 2561 -2571.
- Nath, S. et al., 2011. Spindle Assembly Checkpoint Protein Cdc20 Transcriptionally Activates Expression of Ubiquitin Carrier Protein UbcH10. *Journal of Biological Chemistry*, 286(18), 15666 -15677.
- Nijman, S.M.B. et al., 2005. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*, 123(5), 773-786.
- Novarino, G. et al., 2010. Endosomal chloride-proton exchange rather than chloride conductance is crucial for renal endocytosis. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5984), 1398-1401.
- Oshikawa, K. et al., 2003. Preferential interaction of TIP120A with Cul1 that is not modified by NEDD8 and not associated with Skp1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303(4), 1209-1216.
- Pan, Z. et al., 2004. Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction. *Oncogene*, 23(11), 1985-1997.
- Parker, M.H., Seale, P. & Rudnicki, M.A., 2003. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat Rev Genet*, 4(7), 497-507.
- Pearson, P.L., 1985. Restriction fragment length polymorphisms (RFLP's) and their use in mapping the human genome. *Progress in Clinical and Biological Research*, 177, 23-36.

- Perera, S. et al., 2011. Developmental regulation of MURF ubiquitin ligases and autophagy proteins nbr1, p62/SQSTM1 and LC3 during cardiac myofibril assembly and turnover. *Developmental Biology*, 351(1), 46-61.
- Pfleger, C.M. & Kirschner, M.W., 2000. The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes & Development*, 14(6), 655-665.
- Pfleger, C.M., Lee, E. & Kirschner, M.W., 2001. Substrate recognition by the Cdc20 and Cdh1 components of the anaphase-promoting complex. *Genes & Development*, 15(18), 2396-2407.
- Pickart, C.M. & Rose, I.A., 1985. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase acts on ubiquitin carboxyl-terminal amides. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(13), 7903-7910.
- Podust, V.N. et al., 2000. A Nedd8 conjugation pathway is essential for proteolytic targeting of p27Kip1 by ubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9), 4579-4584.
- del Pozo, J.C. & Estelle, M., 2000. F-box proteins and protein degradation: an emerging theme in cellular regulation. *Plant Molecular Biology*, 44(2), 123-128.
- Rabut, G. & Peter, M., 2008. Function and regulation of protein neddylation. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Reports*, 9(10), 969-976.
- Ramakrishna, S., Suresh, B. & Baek, K., 2011. The role of deubiquitinating enzymes in apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 68(1), 15-26.
- Read, M.A. et al., 2000. Nedd8 modification of cul-1 activates SCF(beta-TrCP))-dependent ubiquitination of I kappa B alpha. *Molecular and Cellular Biology*, 20(7), 2326-2333.
- Reimann, J.D. et al., 2001. Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *Cell*, 105(5), 645-655.
- Reyes-Turcu, F.E., Ventii, K.H. & Wilkinson, K.D., 2009. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 363-397.
- Rigaut, G. et al., 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotechnology*, 17(10), 1030-1032.
- Schwab, M. et al., 2001. Yeast Hct1 recognizes the mitotic cyclin Clb2 and other substrates of the ubiquitin ligase APC. *The EMBO Journal*, 20(18), 5165-5175.
- Shah, J.V. & Cleveland, D.W., 2000. Waiting for anaphase: Mad2 and the spindle assembly checkpoint. *Cell*, 103(7), 997-1000.

- Singer, B. & Riezman, H., 1990. Detection of an intermediate compartment involved in transport of alpha-factor from the plasma membrane to the vacuole in yeast. *The Journal of Cell Biology*, 110(6), 1911-1922.
- Skaar, J.R. & Pagano, M., 2009. Control of cell growth by the SCF and APC/C ubiquitin ligases. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(6), 816-824.
- Skerra, A. & Schmidt, T.G., 2000. Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods in Enzymology*, 326, 271-304.
- Thompson, B.J. et al., 2008. Control of hematopoietic stem cell quiescence by the E3 ubiquitin ligase Fbw7. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(6), 1395 -1408.
- Tsutsumi, T. et al., 2008. Disruption of the Fbxw8 gene results in pre- and postnatal growth retardation in mice. *Molecular and Cellular Biology*, 28(2), 743-751.
- Vierstra, R.D., 2003. The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends in Plant Science*, 8(3), 135-142.
- Voges, D., Zwickl, P. & Baumeister, W., 1999. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annual Review of Biochemistry*, 68, 1015-1068.
- Wang, W.Z. et al., 2008. Ischemia/reperfusion-induced necrosis and apoptosis in the cells isolated from rat skeletal muscle. *Journal of Orthopaedic Research*, 26(3), 351-356.
- Weissman, A.M., 2001. Themes and variations on ubiquitylation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(3), 169-178.
- Winston, J.T. et al., 1999. A family of mammalian F-box proteins. *Current Biology: CB*, 9(20), 1180-1182.
- Woelk, T. et al., 2007. The ubiquitination code: a signalling problem. *Cell Division*, 2, 11.
- Wojcik, E.J., Glover, D.M. & Hays, T.S., 2000. The SCF ubiquitin ligase protein slimb regulates centrosome duplication in *Drosophila*. *Current Biology: CB*, 10(18), 1131-1134.
- Wu, G. et al., 2001. SEL-10 is an inhibitor of notch signaling that targets notch for ubiquitin-mediated protein degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 21(21), 7403-7415.
- Yagi, T. et al., 1993. A novel negative selection for homologous recombinants using diphtheria toxin A fragment gene. *Analytical Biochemistry*, 214(1), 77-86.
- Yang, P. et al., 2004. Purification of the Arabidopsis 26 S proteasome: biochemical and molecular analyses revealed the presence of multiple isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 6401-6413.

Ye, J. et al., 2007. FBXO40, a gene encoding a novel muscle-specific F-box protein, is upregulated in denervation-related muscle atrophy. *Gene*, 404(1-2), 53-60.

Zheng, N. et al., 2002. Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature*, 416(6882), 703-709.

6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 28. April 1982
Geburtsort: Hannover
Familienstand: ledig

Werdegang

1994 – 2001 **Ricarda-Huch-Schule, Hannover**

2001 – 2002 **Zivildienst**
Arbeiter-Samariter-Bund Hannover

10/2002 – 12/2007 **Studium an der Leibniz Universität Hannover**

Akademischer Grad: Diplom Biochemiker

2007 – 2007 **Diplomarbeit an der Medizinische Hochschule Hannover**

Schwerpunkt: Identifizierung von Biomarkern zur Frühdiagnose von Bronchiolitis Obliterans Syndrom

01/2008 – heute **Promotion an der Medizinischen Hochschule Hannover**

Schwerpunkt: Molekularbiologie im Labor für Entwicklungsbiologie

Praktikum

09/2005 – 10/2005 **Praktikum an der Medizinischen Hochschule Hannover**

Ort: Institut für Molekularbiologie

Thema: Analyse von Protein-Interaktionskandidaten des Transkriptionsfaktors Tbx18

12/2005 – 01/2006 **Praktikum an der Medizinischen Hochschule Hannover**

Ort: Institut für Virologie

Thema: Etablierung einer KSHV Mutanten Bibliothek mit Hilfe der Transposon Mutagenese

07/2006 – 10/2006 **Praktikum an der University of Southern California, Keck School of Medicine**

Ort: Cancer Research Laboratory #106

Thema: Untersuchung des Effekts von Contortrostatin auf die Adhäsionsfähigkeit von Brustkrebszellen

7 Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

.....
(Ort, Datum)

.....
(Unterschrift)