

Aus der Universität Rostock und dem Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (Dummerstorf),  
Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie

---

**Strukturelle und funktionelle Charakterisierung essenzieller  
Faktoren für die Initiation der Translation im Endometrium  
des Schweins**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von  
**Kati Reinke,**  
geb. am 01.05.1977 in Rostock,

Rostock 2011

Wissenschaftliche Betreuung: Dr. Karin Wollenhaupt, Dr. Wolfgang Tomek

Gutachter:

Prof. Dr. Klaus-Peter Brüssow  
Leibniz Institut für Nutztierbiologie  
FB Fortpflanzungsbiologie

Prof. Dr. Birgit Piechulla  
Universität Rostock  
Institut für Biowissenschaften/ Biochemie

Tag der Abgabe: 01.07.2011

Tag des Kolloquiums: 28.11.2011

„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.“ (Sir Isaac Newton)

## **Inhalt:**

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Literatur .....</b>	<b>2</b>
2.1. Zyklus, Ovulation und Befruchtung der Eizellen des Schweins.....	2
2.2. Implantation und Plazentation des Schweins.....	3
2.3. Bedeutung der Steroidhormone im Zeitraum der Implantation und frühen Trächtigkeit.....	4
2.3.1. Progesteron.....	4
2.3.2. Östradiol .....	5
2.3.3. Weitere bedeutsame Faktoren bei der Implantation im Schwein.....	5
2.4. Implantation und frühe Trächtigkeit bei Wiederkäuern (Rind) .....	8
2.5. Implantation und frühe Trächtigkeit der Maus .....	10
2.6. Molekulare Regelmechanismen der Implantation.....	11
2.6.1. Regulation der Proteinsynthese auf Translationsebene .....	12
2.6.1.1. Struktur der eukaryotischen mRNA .....	12
2.6.1.2. Initiationsfaktoren .....	13
2.6.1.3. Struktur und Regulation des eIF4E .....	15
2.6.1.4. 3'-bindende Faktoren.....	18
<b>3. Zielstellung .....</b>	<b>20</b>
<b>4. Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
4.1. Versuchstiere .....	21
4.1.1. Sauen.....	21
4.1.2. Rinder.....	22
4.1.3. Mäuse.....	23
4.2. Steroidhormon-Replacement-Experimente an Sauen .....	24
4.3. Das Modell eines unilateral trächtigen Uterushornes .....	24
4.4. Explantatkultur.....	25
4.5. Proteinbiochemie .....	27
4.5.1. Präparation der Gewebeextrakte .....	27
4.5.2. Zelltrennung .....	28
4.5.3. Aufarbeitung der Explantatkulturen .....	29

4.5.4. Proteinbestimmung .....	30
4.5.5. SDS-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE).....	31
4.5.6. Western Blot .....	32
4.5.7. Entfernen von Antikörpern (Strippen) .....	33
4.5.8. Auswertung der Western Blots .....	34
4.6. Strukturelle Analyse der 23 kDa-Variante des eIF4E.....	34
4.6.1. Epitope mapping .....	34
4.6.2. Protease-Assay .....	35
4.6.3. Matrix assisted-laser-desorption/ ionization-time-of-flight-mass-spectrometry (MALDI-TOF-TOF).....	35
4.7. Funktionelle Analyse der 23 kDa-Variante .....	37
4.7.1. Bindung an m <sup>7</sup> GTP-Sepharose .....	37
4.7.2. Immunopräzipitation .....	37
4.7.3. Protein-Protein-Interaktionsassay .....	38
4.8. mRNA-Analytik .....	39
4.8.1. mRNA-Isolation .....	39
4.8.2. RNA-Reinigung mittels CsCl-Zentrifugation und Northern Blotting .....	39
4.8.3. Herstellung der cDNA .....	40
<b>5. Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
5.1. Bestätigung des Auftretens der 23 kDa-Variante im Zeitraum der Implantation...42	
5.2. Untersuchungen des eIF4E-Repressorproteins 4E-BP1 .....	45
5.3. Untersuchung der Regulation der Expression der 23 kDa-Variante im Endometrium .....	46
5.3.1. Unilaterale Trächtigkeit .....	46
5.3.2. Untersuchung der Implantationsstelle .....	47
5.3.3. Zelluläre Lokalisation der 23 kDa-Variante des eIF4E .....	48
5.3.4. Steroidhormon-Replacement .....	49
5.4. In-vitro-Experimente: Explantatkultur .....	51
5.4.1. Induktion der 23 kDa-Variante des eIF4E .....	51
5.4.2. Aufrechterhaltung der Expression der 23 kDa-Variante .....	52
5.4.3. Einfluss der Kultivierung auf die Phosphorylierung von 4E-BP1.....	53
5.5. Untersuchungen auf mRNA Ebene .....	54
5.6. Strukturelle und funktionelle Untersuchungen der 23 kDa-Variante des eIF4E ...56	

5.6.1. Epitope mapping .....	56
5.6.2. Protease-Assay .....	57
5.6.3. MALDI-TOF-TOF .....	59
5.6.4. Funktionelle Analyse der eIF4E-Varianten .....	61
5.6.4.1. Bindungsverhalten der eIF4E-Varianten an die Cap-Struktur .....	61
5.6.4.2. Interaktion der eIF4E-Varianten mit dem Repressorprotein 4E-BP1 .	62
5.7. Speziesvergleiche Rind und Maus .....	64
5.7.1. Speziesvergleich Rind .....	64
5.7.2. Speziesvergleich Maus .....	66
<b>6. Diskussion .....</b>	<b>67</b>
6.1. Das mRNA-Cap-Bindungsprotein eIF4E in vivo .....	67
6.1.1. Die 23 kDa-Variante des eIF4E und ihre Entstehung durch hormonelle Einflüsse .....	67
6.1.2. mRNA Analytik und Spaltung des 25 kDa-eIF4E .....	68
6.1.3. MALDI-TOF-TOF .....	70
6.1.4. Strukturelle und funktionelle Eigenschaften der beiden eIF4E-Varianten	71
6.2. 4E-BP1 <i>in vivo</i> .....	73
6.3. eIF4E <i>in vitro</i> .....	74
6.4. Weitere Faktoren des Translationsinitiationskomplexes .....	75
6.5. Mögliche biologische Funktion der 23 kDa-Variante .....	76
6.6. Speziesvergleich Rind und Maus.....	78
6.7. Forschungsbedarf .....	79
<b>7. Zusammenfassung .....</b>	<b>80</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>81</b>

## Abkürzungen

4E-BP	eIF4E-Bindepotein
ACTB	“β-actin“
Akt	Protein Kinase B
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bis Tris	Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-trishydroxymethyl)-methan
BRE	“B-recognition element”
cDNA	“complementary DNA” (komplementäre DNA)
CHAPS	3-[(3-Choloamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CL	Corpus luteum
CPE	zytoplasmatisches Polyadenylierungselement
CPEB	zytoplasmatisches Polyadenylierungselement Protein
CPSF	“cleavage and polyadenylation specific factor”
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DNA	“desoxyribonucleic acid” (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMEM	“Dulbecco’s modified essential Medium”
DTT	Dithiotreitol
E <sub>2</sub>	17β-Östradiol
EB	Estradiolbenzoat
eCG	equines Choriongonadotropin
ECL	“enhanced Chemoluminescence”
EDTA	“ethylene diaminetetra-acid”
EGTA	“ethylene-bis(oxyethylenenitrilo)-tetraacetic acid”
EGF	“epidermal growth factor“ (epidermaler Wachstumsfaktor)
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
ER	“estrogen receptor“ (Östrogenrezeptor)
ERK	“extracellular signal regulated kinase”

FBN	Leibniz Institut für Nutztierbiologie
FBS	fötales bovines Serum
FKBP12	FK506-Bindeprotein
FRAP	“FK506 binding protein/rapamycin-associated protein”
FSH	follikel-stimulierendes Hormon
g	gebundene Fraktion
Glu	Glutaminsäure
GnRH	Gonadotropin-releasing-Hormon
GC	Gonadotropin
GE	Glandulärepitheil
GST	Glutathiontransferase
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	“Hank’s balanced salt solution”
His	Histidin
HRP	“horseradish peroxidase” (Meerrettichperoxidase)
i	“input”
IE	internationale Einheit
ITS	Inositol-Transferin-Selenit
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IGF	“insuline growth factor”
KGF	“keratinocyte growth factor”
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
JNKK	Jnk-aktivierte Kinase
LE	Luminalepitheil
Leu	Leucin
LIF	“leukaemia inhibition factor“, Leukämie Inhibitionsfaktor
LH	lutenisierendes Hormon
Lys	Lysin
MALDI-TOF-TOF	“Matrix-assisted-laser-desorption/ionization-time-of-flight-time-of-flight-mass-spectrometry”
MAP	“mitogen activated protein“

MAPK	“mitogen activated protein kinase“
MEK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MEM	“Minimal Essential Medium“
MMP	Metalloprotease
Mnk	“Map kinase interacting protein“
MOPS	3 (N-Morpholino)-Propansulfonsäure
N-Terminus	Amino-Terminus
mTOR	“mammalian target of Rapamycin”
OTR	Oxytocin Rezeptor
OVX	Ovariektomie
P <sub>4</sub>	Progesteron
p70S6K	p70S6 Kinase
PABP	Poly-(A)-Bindeprotein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
paip	PABP interagierendes Protein
p. c.	post conceptionem
PCR	“polymerase chain reaction”
PDK1	“phosphoinositide dependent protein kinase-1”
PGE	Prostaglandin E
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandin F <sub>2α</sub>
p. i.	post inseminationem
Pro	Prolin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PI3-K	Phosphoinositide 3-OH Kinase
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PR	Progesteronrezeptor
RNA	“ribonucleic acid”
RT PCR	“reverse transcriptase polymerase chain reaction”
RPMI -1640 Medium	“Roswell Park Memorial Institute –1640
Medium”	
SDS	“sodium dodecyl sulphate”
Ser	Serin
SLP1	“secretory leukocyte protease inhibitor”

SPP1	“secreted Phosphoprotein 1”
SPR	“surface plasmon resonance”
STAT1	“signal transducer and activator of transcription 1”
TBS	Tris buffered saline
TBST	“Tris buffered saline + Tween”
Temed	N,N,N’,N’-Tetramethylethylenediamine
Thr	Threonin
TIMP	“tissue inhibitor of metalloprotease”
Trp	Tryptophan
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNAi	Initiator Methionin-Transfer RNA
TT	Trächtigkeitstag
Tween 20	„Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat“
UTR	untranslatierte Region
Ü	Überstand
Val	Valin
VEGF	“vascular endothelial growth factor” (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
ZT	Zyklustag

## 1. Einleitung

Die Implantation der Embryonen im maternalen Endometrium ist ein Schlüsselereignis für die Aufrechterhaltung der Trächtigkeit. Während dieses Vorgangs ist die Möglichkeit des Verlustes von Embryonen hoch, da es zu einem komplexen Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren kommt. Die Wahrscheinlichkeit des Verlustes von Embryonen im Schwein zwischen den Trächtigkeitstagen (TT) 12-18 liegt bei 25-30 % (Przala et al. 2006). Wähner & Fischer (2005) kommen zu ähnlichen Verlustraten mit 20-30 % in den ersten drei Wochen der Trächtigkeit.

In der vorliegenden Arbeit sollen die molekularen Prozesse insbesondere der Translationsinitiation, während der Implantationsphase untersucht werden, um den embryonal-maternalen Dialog im Schwein näher zu charakterisieren und damit in Zukunft den Verlust von Embryonen zu verstehen.

Im Zentrum der Untersuchungen steht das Cap-Bindungsprotein 4E (eIF4E), welches als der Rate-begrenzende Faktor der Translationsinitiation angesehen wird (Schepers & Proud 2002). Der eIF4E mit einem Molekulargewicht von 25 kDa tritt im Zeitraum der Implantation als eine neue, verkürzte Variante auf. Diese neue Variante soll in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich ihres Auftretens, ihrer Struktur und Bindungseigenschaften analysiert werden (siehe 3.).

In Zukunft könnten Erkenntnisse über die molekularen Prozesse der Translationsinitiation dazu beitragen, embryonale Verluste zu verringern. Langfristig könnten so gesunde, vitale Ferkel mit balancierten Wurfgrößen bei ausgeglichenen hohen Ferkelgewichten erzeugt werden.

## 2. Literatur

### 2.1. Zyklus, Ovulation und Befruchtung der Eizellen des Schweins

Während des Östruszyklus kommt es zu strukturellen und funktionellen Veränderungen im Endometrium mit dem biologischen Ziel, die Implantation der Blastozyste im Uterus zu ermöglichen.

Die Phasen des Zyklus werden als Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus bezeichnet. Während des Proöstrus findet im Ovar die Phase der Follikelreifung statt. Tertiärfollikel wachsen durch Ausschüttung der gonatotrophen Hormone: luteinisierendes Hormon (LH) und folikelstimulierendes Hormon (FSH) zu Graaf'schen Follikeln heran. Unter Einfluss der vom Ovar ausgeschütteten Östrogene proliferiert das Endometriumgewebe, die Schleimhaut verdickt sich und ödematisiert, das Oberflächenepithel vergrößert sich und die Expression des uterinen Östrogenrezeptors alpha ( $ER_\alpha$ ), des Progesteronrezeptors (PR) und des Oxytocinrezeptors (OTR) wird induziert. Nach dem Freisetzen der Eizellen aus den Graafschen Follikeln (Ovulation) bilden sich aus den gesprungenen Follikeln die frühen Corpora lutea (CL), die im Verlaufe des Metöstrus heranreifen und Progesteron produzieren. Unter Progesteroneinfluss beginnt im Uterus die endometriale Sekretionsphase.

Während des Diöstrus erreicht das CL seine Blüte und das abgegebene Progesteron erreicht sein Maximum. Es stimuliert die Akkumulation von Phospholipiden im Luminal- und Glandulärepeithel. Diese können Arachidonsäure freisetzen, um Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) zu synthetisieren. Während das Progesteronniveau ansteigt, blockiert es die Expression von  $ER_\alpha$  und OTR. Zwischen den ZT 15-20 entlässt das Endometrium Oxytocin induziertes PGF, welches bei nicht erfolgter Befruchtung zum Abbau des CL führt und als Luteolyse bezeichnet wird (Spencer et al. 2004). Das CL degeneriert und bildet den Corpus albicans.

Erfolgte eine Befruchtung, ermöglichen embryonale Signale die Aufrechterhaltung des CL und damit der Progesteronsekretion.

Die befruchtete Eizelle verbringt im Schwein 46-56 h im Eileiter, erreicht dort das 4-Zellstadium und wandert anschließend in den Uterus (Brüssow 1985, Bavister 1988). Nach weiteren Zellteilungen entsteht am 5. TT die Blastozyste. Nach dem Schlupf aus der

Eihülle (Zona pellucida) am 6. TT (Schnorr 1996) erreicht die Blastozyste ihre Kompetenz für die Implantation und die Ausbildung der Plazenta.

Die differenzierte Blastozyste besteht aus drei verschiedenen Zelltypen: dem äußeren polarisierten Trophoektoderm, dem Endoderm und der pluripotenten inneren Zellmasse. Aus der inneren Zellmasse entwickelt sich der Embryo. Das Trophoectoderm dient der physischen und physiologischen Verbindung mit dem uterinen luminalen Epithel und bildet somit später den embryonalen Teil der Plazenta (Lee & DeMayo 2004, Dey et al. 2004).

Direkt nach dem Schlupf der Blastozyste aus der Zona pellucida expandiert diese und wird einem morphologischen Wandel unterzogen. Sie entwickelt sich von einer kugelförmigen (10-15 mm) über eine tubuläre (15-50 mm) hin zu einer filamentösen Struktur von 100-200 mm und erreicht schließlich eine Länge von 800-1000 mm zwischen TT 12 und 15. Diese Verlängerung des Konzeptus dient der Vergrößerung der Oberfläche für den späteren Nährstoff- und Gasaustausch (Bazer et al. 2009).

## **2.2. Implantation und Plazentation des Schweins**

Man unterscheidet generell zwischen nicht-invasiver und invasiver Plazentation. Im Schwein bleibt die Implantation oberflächlich (nicht-invasiv) und der Trophoblast dringt nicht in das maternale Gewebe ein (Carson et al. 2000), im Gegensatz zur invasiven Form bei Maus und Mensch, bei der das Trophoektoderm durch das Luminallepithel ins Stroma eindringt (Bazer et al. 2009).

Zeitlich beginnt die Phase der Implantation im Schwein am Tag 11 post conceptionem (p. c.) und endet zwischen dem 14. und 18. Tag p. c. (Lampe 1984, Ross et al. 2003). Beim Schwein ist die Implantation gekennzeichnet durch eine längere Periode vor der Anheftung. Es kommt zur Migration und zum Abstandhalten zwischen den Embryonen (Lee & DeMayo 2004).

Zu Beginn der Implantation kommt es zunächst zu einer Depolarisierung des Luminallepithels, wodurch eine Anlagerung des Embryos erst möglich wird. Überdies kommt es zur Reduktion anti-adhäsiver Komponenten, hauptsächlich Mucinen der Glykocalyx des Luminal- und Gladulärepithels (Bazer et al. 2009).

Bei dieser nicht-invasiven Form der Plazentation, kommt es ausschließlich zur Verzahnung der Mikrovilli (Cencic & La Bonnadiere 2002). Das embryonale und maternale Gewebe bleibt intakt und eine Dezidualisierung des Stromas tritt nicht auf (Johnson et al. 2002). Diese Form der Plazentation beim Schwein wird als *Placenta epitheliochoriales diffusa* bezeichnet (Roberts et al. 1996). Hier spielt die histotrophe Ernährung die Hauptrolle, wobei alle wichtigen Stoffe vom maternalen Drüsengewebe sezerniert werden.

### **2.3. Bedeutung der Steroidhormone im Zeitraum der Implantation und frühen Trächtigkeit beim Schwein**

#### **2.3.1. Progesteron**

Die Aufrechterhaltung der Progesteronausschüttung im Trächtigkeitsverlauf ist bei allen Mammalia von Bedeutung (Cencic & Bonnardiere 2002, Spencer et al. 2004). Progesteron ( $P_4$ ) dient der Ruhigstellung des Myometriums im gesamten Trächtigkeitsverlauf, sowie der Unterstützung der sekretorischen Funktion des Endometriums. Hauptsächliche Progesteronquelle während der Gravidität ist der CL. Intakte Granulosa- und Thekazellen des eröffneten Follikels proliferieren und nehmen erheblich an Größe zu. Die Zellen nehmen Merkmale von steroidbildenden Zellen an und werden nun als Granulosalutin- und Thekaluteinzellen bezeichnet (Linß & Fanghanel 1999). Sie bilden eine temporäre autokrine Drüse – den CL.

Der CL beim Schwein ist außerdem fähig, noch Androgene und Östrogene zu sezernieren, wobei Umwandlung ineinander möglich ist (Lampe 1984). Nach erfolgter Ovulation kommt es bei den Granulosazellen zum Verlust ihrer Fähigkeit zur Aromatisierung der Androgene, was zu einer Blockierung der Östrogensynthese führt und in einer erhöhten Progesteronsynthese endet.

Mit steigender Progesteronkonzentration kommt es zur Reduktion der Glycokalyx, um die Anheftung der Blastozyste zu ermöglichen. Vor dem ZT 11 zeigen die uterinen Epithelzellen eine negativ geladene apicale Glycokalyx, welche sich während der Anheftung des Embryos nicht nur im Schwein, sondern auch in den meisten Säugern reduziert (Bazer et al. 2009).

### 2.3.2. Östradiol

Vom Konzeptus abgegebenes  $17\beta$ -Östradiol ( $E_2$ ) spielt eine entscheidende Rolle bei der Erkennung der Trächtigkeit im Schwein.  $E_2$  wird durch den Konzeptus in einem zweiphasigen Muster an den TT 11-30 abgegeben (Geisert et al. 1990). Die Initiation der Östrogenausschüttung durch den Konzeptus beginnt am TT 11-12 (Joyce et al. 2007). Eine zweite Periode der Östrogenproduktion erscheint am TT 15 sowie an den TT 25-30 (Wollenhaupt et al. 2007). Diese Signale führen zu einer veränderten Abgabe von  $PGF_{2\alpha}$ . Im Zyklusverlauf wird  $PGF_{2\alpha}$  durch das Luminalepithel (Braileanu et al. 2000) als Luteolysin endokrin in das endometriale Gefäßsystem abgegeben und führt zur Luteolyse des CL. Durch das vom Konzeptus sezernierte Östrogen wird  $PGF_{2\alpha}$  nun exokrin, also in das uterine Lumen abgegeben. Dies führt zur Verhinderung der Luteolyse und die  $P_4^-$  Produktion des CL kann aufrechterhalten werden. (Geisert et al. 1982, Bazer et al. 1998, Krzymowski & Stefanczyk-Krzymowska 2002).

Östradiol hat vor allem lokale Effekte in Konzeptusnähe. Dazu gehört beispielsweise die Induktion der Expression von „secreted phosphoprotein 1“ (SPP1) im Luminalepithel, welches für Zelladhäsion und Migration verantwortlich ist (siehe Tabelle 1) (Bazer et al. 2009).

### 2.3.3. Weitere bedeutsame Faktoren bei der Implantation beim Schwein

Neben den Steroidhormonen Östradiol und Progesteron werden unter deren Einfluss weitere Faktoren gebildet, die für den erfolgreichen Verlauf der Trächtigkeit von Bedeutung sind. Bei diesen Signalen handelt es sich um Hormone, Wachstumsfaktoren, Zytokine, Polypeptide, Prostaglandine und Interferone (IFN) (Bowen & Burghardt 2000, Jaeger et al. 2001, Ziecik et al. 2005, Joyce et al. 2007). Eine Übersicht über wesentliche Faktoren während der frühen Trächtigkeit im Schwein wird in Tabelle 1 gegeben.

Tabelle 1: Auswahl von Faktoren während der Implantation des Schweins

<b>Signal</b>	<b>Ursprung</b>	<b>mögliche Funktion</b>	<b>Referenz</b>
<b>Hormone</b>			
Prostaglandin E (PGE)	maternal/ embryonal	Assistenz bei der Verhinderung der Luteolyse, durch IFN $\gamma$ und $\delta$ stimuliert	Bowen & Burghardt, 2000  Ziecik et al. 2005
Prostaglandin F <sub>2<math>\alpha</math></sub> (PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> )	maternal	durch E <sub>2</sub> -Sekretion verändert, dadurch Verhinderung Luteolyse	Bowen & Burghardt, 2000  Ziecik et al. 2005
<b>Peptidhormone</b>			
Interleukin 1 $\beta$	maternal	zusammen mit Bradykinin an der Regulation von PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> beteiligt	Cencič & Bonnardiere 2002  Ross et al. 2003
Leptin	maternal	Regulation der Nahrungs- aufnahme, stimuliert in endometrialen Epithelzellen, Bildung von Beta3-Integrin, Interleukin-1 (IL-1), (leukämie Inhibierender Faktor (LIF), vaskular endo-thelial growth factor (VEGF), Metalloproteasen (MMPs)	Smolinska et al. 2007
<b>Zytokine</b>			
LIF	maternal	Nidation, gebildet aufgrund des embryonalen Östrogensignals, biphasische Regulation	Chen et al. 2000
<b>Enzyme/Proteasen</b>			
Bradykinin	maternal	Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität, Angiogenese, Teil des Kallikrein-Kinin- Systems	Vonnahme et al. 2004
Kallikrein (Serin Protease)	maternal	Induktion durch E <sub>2</sub> , Aktivierung von Wachstumsfaktoren, uterine und plazentale Angiogenese	Boohla et al. 1992  Vonnahme et al. 2004
MMP-2, MMP-9	embryonal	Bedeutung für invasive Plazentation, (aber auch im Schwein)	Menino et al. 1997

<b>Signal</b>	<b>Ursprung</b>	<b>mögliche Funktion</b>	<b>Referenz</b>
Tissue inhibitors of MMP-1, -2 und -3 (TIMP-1, -2, -3)	maternal	Hemmung der MMPs, für nicht-invasive Plazentation	Menino et al. 1997
Bikunin	maternal	Protease Inhibitor, Bedeutung für nicht-invasive Plazentation	Hettinger et al. 2001
Secretory leukocyte protease inhibitor (SLP1)	maternal	Protease Inhibitor, Bedeutung für nicht-invasive Plazentation	Reed et al. 1998
<b>Glykoproteine</b>			
IFN $\alpha$ , $\gamma$ und $\delta$	embryonal	Stimulation PGE	La Bonnadiere et al. 2002 Ziecik et al 2005 Bazer et al. 2008
SPP1	maternal, Luminal-epithel (LE)	durch embryonales E <sub>2</sub> induziert, LE-Adhäsion, Zellmigration, Signaltransduktion	Bazer et al. 2008
<b>Wachstumsfaktoren</b>			
Connective tissue growth factor	maternal, LE, Glandulär-epithel (GE)	Differenzierung, Proliferation, Lebensfähigkeit, Migration, Adhäsion, Bildung extrazellulärer Matrix, reguliert durch Östrogen, Progesteron	Ball et al. 2003 Harding et al. 1998
Epidermal growth factor (EGF)	maternal	stimuliert durch Östrogen, während der Elongationsphase des Konzeptus auch im Zyklus	Brigstock et al. 1990 Geisert et al. 2001 Lee & DeMayo 2004
Insulin like growth factor (IGF) I/II	maternal GE, Stroma	Proliferation, Differenzierung, Wachstum des Konzeptus	Geisert et al. 2001 Simmen et al. 1992
Keratinocyte growth factor (KGF )	maternal LE	durch maternales P <sub>4</sub> induziert, Adhäsion, Zellmigration, Signaltransduktion	Bazer et al. 2008 Ka et al. 2001

<b>Signal</b>	<b>Ursprung</b>	<b>mögliche Funktion</b>	<b>Referenz</b>
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	maternal	Epithel und Stromazellen, Blutgefäße Myometrium, hohe Konzentration im periovulatorischen Zeitraum und während Perimplantation	Kaczmarek et al. 2008
<b>Transkriptionsfaktoren</b>			
Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1)	maternal Stroma	Induktion durch IFN $\gamma$ und $\delta$ , als Transkriptionsfaktor für antiproliferative, proapoptotische, und proinflammatorische Proteine	Joyce et al. 2007 Bazer et al. 2009
<b>Sonstiges</b>			
Calcium	maternal	Ausschüttung bei Anwesenheit des Konzeptus	Geisert et al. 1982 Morley et al. 1992
plasminogener Aktivator Inhibitor	maternal	Inhibierung des plasminogenen Aktivators	Cencič & Bonnardiere 2002 Fazleabas et al. 1982

## 2.4. Implantation und frühe Trächtigkeit bei Wiederkäuern (Rind)

In Wiederkäuern erreicht der Konzeptus nach 65-72 h im 8-Zellstadium (Rüsse & Sinowatz, 1991) bzw. nach 4-5 Tagen im Morulastadium die gleichseitige Uterushornspitze (Guillomot 1995). Nach etwa 8-10 Tagen schlüpft der Konzeptus aus der Zona pellucida (Rüsse & Sinowatz 1991).

Wie beim Schwein so ist auch bei Rindern und Schafen die Präimplantationsphase verlängert (Lee & DeMayo 2004). In dieser Phase kommt es wie im Schwein zur Ausbildung eines fadenförmigen Konzeptus ab dem TT 13, der eine Länge von 17- 24 mm erreichen kann (Greenstein & Foley 1958, Guillomot 1995).

Die Appositionsphase beginnt zwischen dem Tag 18 und 20 post inseminationem (p. i.) (Guillomot 1995). Die Plazentation bleibt ähnlich wie beim Schwein, im Rind größtenteils oberflächlich. Es kommt zur Bildung von intraepithelialen zweikernigen Zellen, die etwa

15-20 % des Trophektoderms ausmachen. Diese Zellen fusionieren bei der Spezies Rind mit den Luminalepithelzellen der Karunkeln (maternale, stromale aglanduläre Ausbuchtungen), um Gas und Mikronährstoffe auszutauschen (Lee & DeMayo 2004). Dabei entstehen feto-materne dreikernige Zellen und schließlich syncytiale Bereiche (Wooding et al. 1997). Diese Konstrukte werden als Plazentome bezeichnet (Lee & DeMayo 2004). Ein Plazentom umfasst Karunkeln (maternaler Teil) und Kotyledone (fetaler Teil). Etwa 100 dieser Plazentome bilden beim Schaf die eigentliche Plazenta (Schwickert 2002).

Obgleich ebenfalls epitheliochorial unterscheidet sich die Plazentationsform des Rindes (*Placenta epitheliochoriales cotyledonaria adeciduata*) von der des Schweins. So unterliegt das uterine Stroma des Rindes einer programmierten Differenzierung ähnlich der Dezidualisierung in invasiv implantierenden Spezies (Pfarrer et al. 2006). Das Mittel der Verankerung ist Interdigitation: Die meisten Trophoblastenzellen haben einen dichten Mikrovilliensaum entwickelt, der mit dem des maternalen Epithels ineinandergreift (Wathes & Wooding 1980, King et al. 1981).

Bereits an den Tagen 6-11 p. i. kommt es zu einem Anstieg der Progesteronkonzentration durch die erhöhte Ausschüttung aus dem CL (Butler et al. 1996).

Das embryonale Signal für die Erkennung der Trächtigkeit ist nicht E<sub>2</sub>, sondern das IFN- $\tau$ . Dieses Interferon war das erste Beispiel für ein embryonales Interferon, mit untergeordneter antiviraler Wirkung (Cencić & Bonnardiere 2002). Während der Trächtigkeit verhindert dieses Typ-I-Interferon (Bazer et al. 1998) die Luteolyse (Bazer 1992). IFN- $\tau$  blockiert die Östrogenrezeptorbildung und somit die OTR-Produktion und folglich die PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Produktion. Wie im Schwein so löst auch im Rind PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  die Luteolyse des CL im Zyklusverlauf aus. Die Sekretion von IFN- $\tau$  erfolgt an den TT 10-21, mit einem Maximum am TT 15 (Bowen & Burghardt 2000).

## 2.5. Implantation und frühe Trächtigkeit bei der Maus

Die Maus hat alters- und rasseabhängig eine Zykluslänge von 4-6 Tagen. An den ZT 1 und 2 stimuliert das präovulatorische vom Ovar abgegebene E<sub>2</sub> die Proliferation des Epithels. Am ZT 3 induziert P<sub>4</sub> abgegeben vom frisch gebildeten CL die Proliferation der Stromazellen, die weiter durch vom Ovar abgegebenes E<sub>2</sub> gesteigert wird. Im Gegenzug stoppt die Proliferation des Epithels am ZT 4. Der Uterus wird empfänglich für die Blastocyste (Carson et al. 2000).

Blastozysten von Maus, Primaten und des Menschen, einmal aus der Zona pellucida geschlüpft, beginnen sich direkt an die uterine Oberfläche anzuheften und mit dem Trophoektoderm in das luminale Epithel einzudringen (Roberts et al. 1996).

Die Umwandlung der Stromazellen in deziduale Zellen, ausgelöst durch die Anwesenheit der Blastozyste ist hier sehr ausgeprägt. Dezidualisierung bedeutet in diesem Zusammenhang die Hyperplasie und Hypertrophie von kleinen, spindelförmigen fibroblastischen Stromazellen in vergrößerte polygonale, epithelähnliche Zellen (Johnson et al. 2002).

Stellenweise kommt es durch Apoptose (Carson et al. 2000) zum Verlust des luminalen Epithels (Dey et al. 2004, Johnson et al. 2002). Es wird dann durch Trophoblastenzellen phagozytiert und somit die Epithelpenetration erleichtert. Deziduale Zellen dringen anschließend in die restliche uterine luminale Basallamina ein und reorganisieren das umgebende Stroma (Carson et al. 2000).

Differenzierung und Abbau des primär dezidualisierten Areals bringt den Trophoblasten in Kontakt mit dem maternalen Blutfluss, formiert eine Plazenta und erlaubt dem Embryo so sein Wachstum (Lee & De Mayo 2004).

Als Folge dieser Form der Plazentation spielt die hämatothrophe Ernährung die übergeordnete Rolle, die histotrophe Form eine untergeordnete. Dieser Plazentatyp wird als *Placenta haemochorialis* bezeichnet (Roberts et al. 1996). Die Blutgefäße des maternalen und des embryonalen Organismus verschmelzen hier miteinander.

Bei der Erkennung der Trächtigkeit spielt auch hier E<sub>2</sub> die zentrale Rolle, welches in diesem Fall vom Ovar abgegeben wird.

## 2.6. Molekulare Regelmechanismen der Implantation

In Vorbereitung auf die Implantation der Blastozyste proliferiert und differenziert das Endometriumgewebe unter Einfluss der Steroidhormone Progesteron und Östradiol.

Steroidhormone können über Kernrezeptoren oder über membranständige Rezeptoren ihre Wirkung vermitteln.

Bei den Kernrezeptoren handelt es sich z. B. um die Östrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  sowie die Progesteronrezeptoren A und B. Sie wirken als Transkriptionsfaktoren, welche die Genregulation ligandenabhängig beeinflussen (Glass & Rosenfeld 2000). Diese Kernrezeptoren modulieren spezifisch die Transkription von Zielgenen, indem sie in deren Promotorbereich binden (McEwan et al. 1995). Nukleare Rezeptoren bilden somit die direkte Verbindung zwischen extrazellulären, hormonellen Signalen und transkriptionellen Antworten.

Durch die Bindung an Plasmamembran-ständige Steroidrezeptoren können Steroidhormone auch zytoplasmatische Signalkaskaden modulieren (Sonenberg & Gingras 1998). Im Endometrium des Schweins konnte gezeigt werden, dass maternale Ovarsteroide und embryonale Signale durch Beeinflussung der mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK) sowie der Proteinkinase-Akt-Signal-Kaskade die Proteinbiosynthese auf der Ebene der Translation regulieren (Wollenhaupt et al. 2002). Beide Signalkaskaden sind sowohl an der Regulation der Aktivität von Initiatorenfaktoren (eIFs), wie dem 25 kDa-Cap-Bindungsprotein, auch als eukaryotischer Initiatorenfaktor 4E (eIF4E) bezeichnet, sowie seinem Repressorprotein dem 4E-Bindungsprotein 1 (4E-BP1), im Endometrium beteiligt (Wollenhaupt et al. 2007). In weiterführenden Untersuchungen wurde im Zeitraum der Implantation im Schwein erstmals eine neue, bisher nicht bekannte Variante des prototypischen Initiatorenfaktors eIF4E entdeckt (Wollenhaupt et al. 2007, 2010, 2011).

## 2.6.1. Regulation der Proteinsynthese auf Translationsebene

### 2.6.1.1. Struktur der eukaryotischen mRNA

Eukaryotische mRNAs besitzen an ihrem 5'-Ende einen 7-Methyl-Guanosintriphosphatrest

- die sogenannte Cap-Struktur (Abbildung 1).

Die Cap-Struktur eukaryotischer mRNAs wird als m<sup>7</sup>GpppN beschrieben (Scheper & Proud 2002). Das 7-Methylguanosin ist mit einer 5'-5'-Triphosphatbrücke mit der mRNA verbunden. Daraus resultieren Stabilität und Schutz vor Abbau durch Exonukleasen. Weitere Funktionen der Cap-Struktur im mRNA-Metabolismus, sind der nukleoplasmatische Transport und die Initiation der Translation (Raught & Gringas 1999, Fechter & Brownlee 2005).

Die 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) ist heterogen und besteht meist aus 50-100 Nukleotiden. Durch intramolekulare Basenpaarungen kommt es in diesem Bereich zur Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen, beispielsweise Haarnadelschleifen. Diese Strukturen müssen während der Translationsinitiation durch Initiationsfaktoren aufgelöst werden, sodass die Bindung der ribosomalen Untereinheit ermöglicht wird. Durch sie kann die Translation stimuliert oder reprimiert werden. Ribosomale Bindungen im Bereich der Cap-Struktur können durch lange 5'-UTRs mit einem hohen Maß an Sekundärstrukturen behindert werden (Kochetov et al. 1999).

Die 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) besteht aus mehreren hundert Nukleotiden und enthält eine Vielzahl regulatorischer Sequenzen.

Fast alle eukaryotischen mRNAs enden mit einer monotonen Folge von 150-250, in einigen Fällen aber auch bis zu 600 Adenin-Nukleotiden – der Poly-(A)-Sequenz. Eine Ausnahme hiervon bilden z. B. die mRNAs von Histonen, diese sind nicht polyadenyliert.

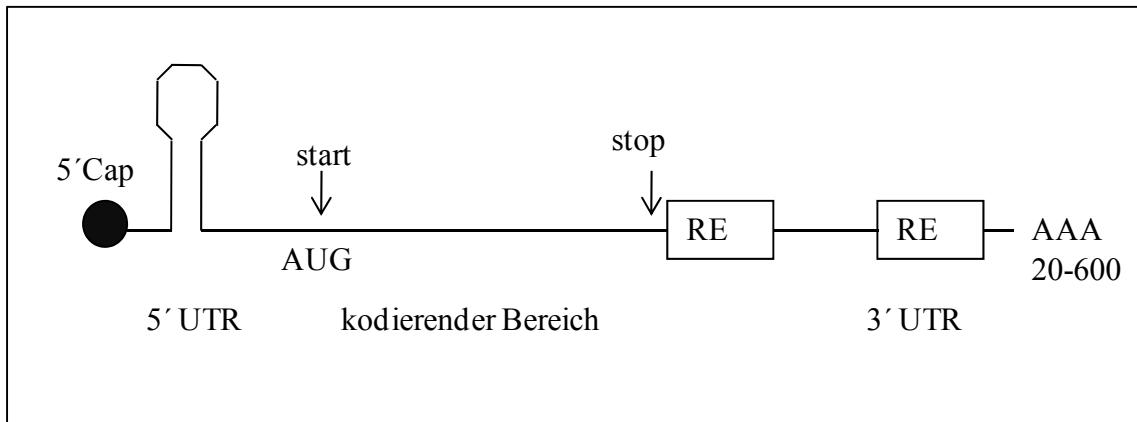


Abbildung 1: **Schematische Darstellung einer eukaryotischen mRNA;** UTR= untranslatierte Region, AUG = Start Codon, RE = regulatorisches Element

### 2.6.1.2. Initiationsfaktoren

Die Regulation der Translation erfolgt im Wesentlichen durch die Initiation.

Die Funktion der Cap-Struktur der mRNA wird bei der Translationsinitiation durch den eukaryotischen Initiationsfaktor Komplex (eIF4F) vermittelt (Sonenberg 2008). Dieser Komplex besteht in Säugetieren aus folgenden Untereinheiten, die in Abbildung 2 schematisch dargestellt sind:

- aus eIF4E, einem 25 kDa-Protein, welches direkt mit der Cap-Struktur interagiert (Sonenberg 2008)
- aus eIF4A, einem 47 kDa-Protein, das RNA-abhängige ATPase-Aktivität besitzt und zusammen mit eIF4B eine RNA-Helikase-Funktion wahrnimmt
- aus eIF4G, einem Protein mit einem Molekulargewicht von 220 kDa, das als „Scaffoldprotein“ die Bindung von eIF4E und eIF4A vermittelt (Sonenberg & Gingras 1998). eIF4G besitzt außerdem Bindungsstellen für eIF3 (welches die Bindung von eIF4F zur kleinen ribosomalen Untereinheit vermittelt), Map kinase interacting proteins 1 (Mnks) (welche eIF4E direkt phosphorylieren) und für das Poly-(A)-Bindungsprotein (PABP).

Dieser Cap-Bindungskomplex, einschließlich eIF4E, bindet an den sogenannten 43S-Präinitiationskomplex (Abbildung 2) (Richter & Sonenberg 2005), bestehend aus eIF3, der 40S-ribosomalen Untereinheit, GTP, eIF2 und einer Initiator-Methionin Transfer RNA (Met tRNA) und bildet den 48S-Initiationskomplex.

Dieser bewegt sich unter ATP-Verbrauch in 5'-3'-Richtung entlang der mRNA, bis er das Start-Codon (AUG) erreicht hat. Dort bindet die 60S-ribosomale Untereinheit (Pestova et al. 2001). Dieser Schritt ist GTP abhängig und benötigt die Aktivität von eIF5 und eIF5B (Wilkie et al. 2003). eIF5B übt dabei die GTPase-Aktivität aus, welche die Verbindung der 40S-ribosomalen Untereinheit mit der 60S-Untereinheit erleichtert. (Singh et al. 2005). Es kommt zur Freisetzung von eIF2-GDP (Lopez-Lastra et al. 2005).

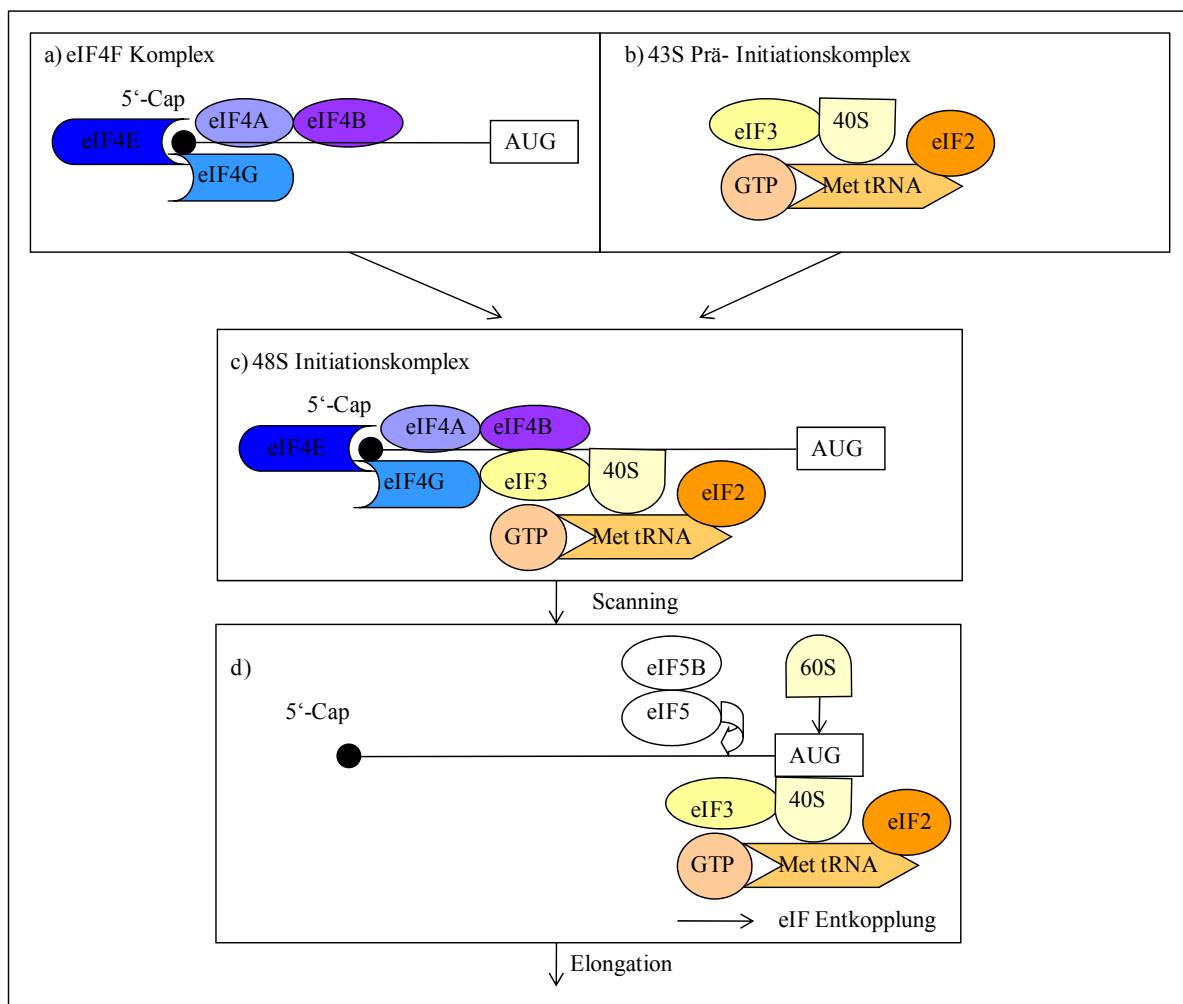


Abbildung 2: **Cap-abhängige Translationsinitiation** (nach Wilkie et al. 2003, modifiziert)
   
a) Faktoren des eIF4F-Komplexes, bestehend aus den eukaryotischen Initiationsfaktoren E, G, A und B; Bindung des Komplexes an die Cap-Struktur der mRNA; Auflösung der Sekundärstrukturen der mRNA;
   
b) Faktoren des 43S-Präinitiationskomplexes bestehend aus dem eukaryotischen Initiationsfaktor 3 und 2, GTP, der 40S-ribosomalen Untereinheit und der Initiator-Methionin-Transfer-RNA binden an unstrukturierte Bereiche der mRNA im Bereich des eIF4F;
   
c) „Scanning“ der mRNA bis zum Erreichen des Start-Codons;
   
d) Bindung der 60S-ribosomalen Untereinheit, Entkopplung der eIFs

### 2.6.1.3. Struktur und Regulation des eIF4E

Das Cap-Bindungsprotein eIF4E wird als der Ratebegrenzende Faktor des Prozesses der Translationsinitiation angesehen (Scheper & Proud 2002).

Ein Bereich von etwa 170 Aminosäuren des eIF4E ist hoch konserviert (Joshi et al. 2004). Durch DNA-Sequenzierungsprofile konnte eine Reihe an Genen mit einer verwandten Sequenz zu eIF4E ermittelt werden (Joshi et al. 2005). Daraus ergibt sich neben eIF4E eine Gruppe der eIF4E-ähnlichen Proteine, deren Rolle heute noch nicht geklärt ist.

Eine Möglichkeit der Regulation der Aktivität von eIF4E ist dessen Phosphorylierung am Serin (Ser)-209 (Joshi et al. 1995, Flynn & Proud 1995). Hormone, Wachstumsfaktoren und Mitogene führen zu dieser erhöhten Phosphorylierung (Joshi et al. 1995, Pain 1996) über den Ras/MAPK/Mnk1-Signaltransduktionsweg (Sonenberg & Gingras 1998, Abbildung 3). Zellulärer Stress und Hitzeschock dagegen führen zur Dephosphorylierung von eIF4E.

Die Effekte dieser Phosphorylierung werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Laut Minich et al. (1994) führt diese Phosphorylierung von eIF4E zu einer Erhöhung der Translationsraten. In diesen Untersuchungen ging man davon aus, dass die erhöhte Phosphorylierung des eIF4E auch zu einer verbesserten Bindung an die Cap-Struktur führt. Neuere Untersuchungen (Scheper et al. 2002) belegen jedoch, dass die Phosphorylierung von eIF4E die Affinität zur Cap-Struktur reduziert. Dadurch wird die Rekrutierung neuer mRNAs stimuliert, da eine schnellere Ablösung von der Cap-Struktur auftritt. Dies führt zu einer Steigerung der Translationsrate (Scheper et al. 2002). Deshalb gehen Raught et al. (2000) und Gingras et al. (1999a) davon aus, dass die phosphorylierte Form des eIF4E die aktive Form darstellt. Ein In-vitro-Translationsassay der Arbeitsgruppe McKendrick et al. (2001) dagegen führte zu dem Ergebnis, dass die Phosphorylierung am Ser-209 nicht unbedingt notwendig für den Ablauf der Translation ist. Es wurde eIF4E des Krallenfrosches sowohl in der Wildtypform als auch mit Mutationen, die eine Phosphorylierung am Ser-209 verhindern, verwendet.

Die eIF4E-Wirkung kann durch spezifische Bindungsproteine (4E-BPs) inhibiert werden. Die Familie der 4E-BPs besteht aus drei verwandten Polypeptiden: 4E-BP1, 2 und 3 (Pause et al. 1994). Die 4E-BPs wirken durch ihre Fähigkeit an die gleiche Domäne wie eIF4G zu binden als kompetitive Inhibitoren (Haghigat et al. 1995, Gingras et al. 1999a, Ptushkina et al. 1999). Dadurch verhindern sie die Bildung des eIF4F Komplexes (Sonenberg 1996). eIF4G und seine Kompetitoren 4E-BP1 und 2 binden dorsal an eIF4E, nahe der N-

terminalen Region, welche distal zur Cap-Bindedomäne lokalisiert ist (Volpon et al. 2006). Das N-terminale Segment des 4E-BP1 umfasst 40 Aminosäuren und ist eine flexible Domäne, welche zwischen Menschen, Mäusen, Ratten und Kaninchen hoch konserviert ist (Tomoo et al. 2003).

Für die Wirksamkeit der 4E-BPs ist ihr Phosphorylierungsstatus entscheidend. Der Phosphorylierungsstatus des eIF4E spielt bei dieser Bindung keine Rolle (Scheper et al. 2002, Tomek et al. 2002).

4E-BP1 besitzt mindestens fünf Phosphorylierungsstellen: Threonin (Thr)-36, Thr-45, Thr-69, Ser-64 und Ser-82 (Fadden et al. 1997, Tee & Proud 2002). Hay & Sonenberg (2004) beschreiben sogar sieben Phosphorylierungsstellen Thr-37, Thr-46 Ser-65, Thr-70 Ser-83, Ser-101 und Ser-112. Die ersten fünf Phosphorylierungsstellen sind in allen 4E-BP Klassen phylogenetisch konserviert und Ser-101 und Ser-112 existieren nur in 4E-BP1 (Hay & Sonenberg 2004). Die gemeinsame Phosphorylierung von Thr-37, Thr-46, Ser-65, Thr-70 führt zu einer verringerten Affinität des 4E-BP1 zu eIF4E. Es ist nachgewiesen, dass die Phosphorylierung hierarchisch erfolgt (Hay & Sonenberg 2004). Thr-37 und Thr-46 werden durch FRAP/mTOR phosphoryliert (Gingras et al. 1999b). Die Phosphorylierung dieser beiden Stellen führt jedoch nicht zu einer Dissoziation vom eIF4E, dafür entscheidend sind Ser-65 und Thr-70. Ist die Phosphorylierung jedoch auf zwei Stellen reduziert, liegt eine hypophosphorylierte Form vor, so kann 4E-BP1 an eIF4E binden und es kommt in der Folge zu einer Hemmung der Translation durch Verhinderung der eIF4F-Komplexbildung (Richter & Sonenberg 2005).

Phosphorylierung von 4E-BP1 ist wie die von eIF4E ebenfalls beeinflusst durch Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine, Aminosäuren und Insulin (Scheper & Proud 2002, Wang & Proud 2007, Abbildung 3). 4E-BPs werden durch den PI3-K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg phosphoryliert (Sonenberg & Gingras 1998, Abbildung 3).

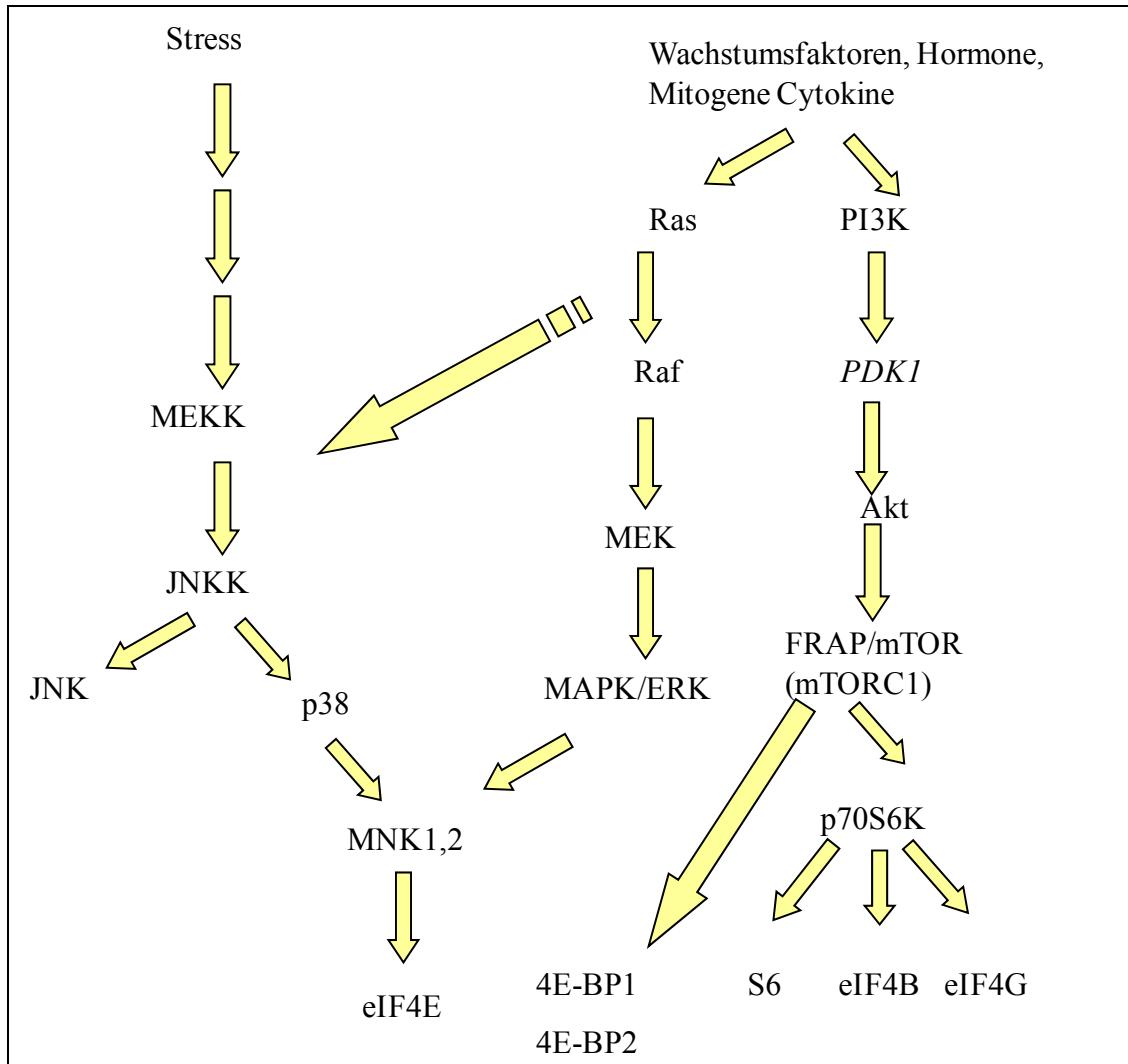


Abbildung 3: **Signaltransduktionswege zur Phosphorylierung von eIF4E und 4E-BP1** (Sonenberg & Gingras 1998), MEKK = „Mammalian mitogen-activated-protein-kinase-kinase“, JNKK = Jnk-aktivierte Kinase, JNK = c-Jun N-terminale Kinase, MNK = Map Kinase interagierendes Protein, MEK = Mitogen aktivierte Proteinkinase, MAPK = Mitogen aktivierte Proteinkinasen ERK= extrazelluläre signalregulierte Kinase, PI3K = Phosphoinositide-3-Kinase, PDK1 = „Phosphoinositide dependent protein kinase-1“, Akt = Proteinkinase B, FRAP = FKBP-12 assoziiertes Protein, mTOR = „mammalian target of rapamycin“, p70S6K = p70S6 Kinase, eIF4E = eukaryotischer Initiationsfaktor 4E, 4E-BP1 = 4E-Bindeprotein, eIF4B = eukaryotischer Initiationsfaktor 4B, eIF4G = eukaryotischer Initiationsfaktor G

#### 2.6.1.4. 3'-bindende Faktoren

Für die Entstehung eines stabilen Translationskomplexes ist die Poly-(A)-Sequenz der mRNA von entscheidender Bedeutung - Eine primäre Polyadenylierung erfolgt im Zellkern, wobei am 3'-Ende der mRNA durchschnittlich 250-300 Adeninreste angefügt werden. Beim Transport ins Zytoplasma erfährt die Poly-(A)-Sequenz eine Verkürzung. Sie ist also im Zytoplasma heterogener und kürzer (Jackson & Standart 1990). Die Mehrheit solcher mRNAs wird nicht effektiv translatiert. Verkürzung der Poly-(A)-Sequenz wird außerdem mit dem Abbau von mRNA in Verbindung gebracht, zytoplasmatische Verlängerung dagegen mit der Aktivierung der Translation (Gebauer et al. 1994).

Die Poly-(A)-Sequenz nimmt auf die Translation folgendermaßen Einfluss: eIF4G des eIF4F-Komplexes interagiert mit dem Poly-(A)-Bindeprotein (PABP) (Abbildung 4). Dies führt zu einer Zirkulation der mRNA über Protein-Protein-Interaktion (closed loop formation) und hat zur Folge, dass nur intakte mRNAs translatiert werden (Wilkie et al. 2003).

Die Bindungseigenschaften von PABPs werden durch PABP interagierende Proteine (Paip) wie Paip1 und Paip2 reguliert. Während Paip1 die Translation stimuliert, wird sie durch Paip2 gehemmt (Craig et al. 1998).

Elemente in der 3'-untranslatierten Region der mRNA wie das zytoplasmatische Polyadenylierungselement (CPE) und das Hexanukleotid AAUAAA regulieren die Polyadenylierung (Cao & Richter 2002). Aktivierte Aurora-Kinase B phosphoryliert das CPE-Bindungsprotein (CPEB). Dieses Ereignis lässt CBEP an CPE binden und den „cleavage and polyadenylation specific factor“ (CPSF) an das Hexanukleotid. Dies wiederum veranlasst das Anfügen weiterer Adenosin Elemente (Cao & Richter 2002).

CPE oder „B recognition element“ (BRE) des 3'-untranslatierten Bereiches können aber auch reprimierend wirken. An diese Sequenzen können ein oder mehrere Translationsrepressoren binden, welche die zytoplasmatische Polyadenylierung verhindern und damit die Effizienz der Initiation der Translation verringern (Gray & Wickens 1998). Ein Beispiel ist das in Eizellen des Krallenfrosches nachgewiesene Protein Maskin.

CPEB ist in der Lage Maskin zu binden. Durch diese Bindung stört Maskin die eIF4E-eIF4G-Interaktion und hemmt somit spezifisch die Translation von mRNA mit Hilfe von CPE. Zur Aufhebung dieser Hemmung werden CPEB und Maskin differenziell phosphoryliert. Dies führt schließlich zu einer zytoplasmatischen Polyadenylierung und

damit zur Stimulation der Translation über eine closed-loop-Bildung (closed-loop-Modell, Abbildung 4, Cao & Richter 2002).

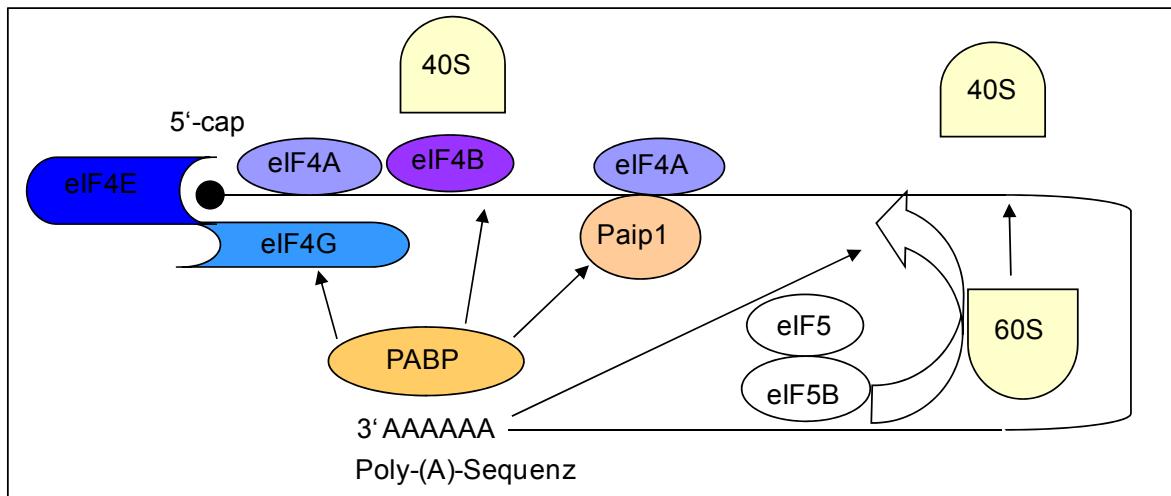


Abbildung 4: **Closed-loop-Modell** (Wilkie et al. 2003)

Das Poly-(A)-Bindepotein bindet an die Poly-(A)-Sequenz und an den eIF4G. Es interagiert außerdem mit eIF4B und über Paip1 mit eIF4A. Dies führt zu einer Zirkularisierung der mRNA und zur Stimulation der Translationsinitiation

### 3. Zielstellung

Ziel der Arbeit war es die molekularen Prozesse im Zeitraum der Implantation näher zu untersuchen. Da das Cap-Bindungsprotein eIF4E als ein wichtiger Faktor der Translationsinitiation angesehen wird stand er im Zentrum der Untersuchungen.

Ziel war es, Struktur, Regulation und potenzielle Funktion einer neuen 23 kDa-Variante des eIF4E während der Phase der frühen Trächtigkeit im Endometrium des Schweins näher zu analysieren.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

1. Bestätigung des Auftretens der 23 kDa-eIF4E-Variante im Zeitraum der Implantation
  - Untersuchung des Endometriums
  - Untersuchung anderer Organe des Schweins
2. Welche Struktur liegt dem 23 kDa-Protein zugrunde?
  - Handelt es sich um eine neuen Protein, möglicherweise um ein alternatives Gen?
  - Handelt es sich um ein prozessiertes Protein?
3. Wie wird die Expression reguliert?
  - Spielen Steroidhormone eine Rolle?
  - Haben embryonale Signale Einfluss auf die eIF4E-Prozessierung?
  - Ist die Plazentationsform in diesem Zusammenhang von Bedeutung?
4. Wie verhalten sich die Bindungseigenschaften dieser 23 kDa-Variante zu den bekannten Bindungspartnern?
  - Bindung an die Cap-Struktur der mRNA
  - Bindung an das Repressorprotein 4E-BP1
5. Welche mögliche biologische Funktion lässt sich aus den Ergebnissen ableiten?

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Versuchstiere

#### 4.1.1. Sauen

Alle Versuchstierzubereitungen und -operationen wurden im Leibniz Institut für Nutztierbiologie (FBN) Dummerstorf unter Leitung von Herrn Prof. Brüssow vorgenommen.

Für die Untersuchungen standen insgesamt 78 Jungsauen der Deutschen Landrasse zur Verfügung, die den verschiedenen Untersuchungskomplexen zugeordnet wurden (Tabelle 2). Einige Tiere wurden zu mehreren Untersuchungen herangezogen. Bei Versuchsbeginn waren die Tiere im Durchschnitt 225 Tage alt und besaßen ein Körpergewicht von 125 kg.

Tabelle 2: Versuchstiere Schwein

Untersuchungskomplex	Behandlung	Anzahl der Tiere
Steroidhormon-Replacement	OVX	7
	OVX - P <sub>4</sub>	7
	OVX - EB	7
	OVX - EB + P <sub>4</sub>	7
	ZT 13	7
	TT 13	5
unilaterale Trächtigkeit	TT15	15
	UPUH TT 15	6
	TT 15	3
	OVX	2
	TT 15	6
	Midzyklus	1
m <sup>7</sup> GTP Sepharose assay	OVX + EB	1
	OVX	2
	ZT 13	2
	TT13	2
	TT15	2
	TT 30	2
mRNA-Analytik	TT 15	2
	OVX	2
Protease Assay/Bindungsassay		6

OVX = Ovarektomie, P<sub>4</sub> = Progesteron, EB = Estradiolbenzoat, ZT = Zyklustag, TT = Trächtigkeitstag, UPUH = Unilaterale trächtiges Horn (unilateral pregnant uterine horn)

Zur Synchronisation von Zyklus und Ovulation wurde den Jungsauen über einen Zeitraum von 15 Tagen Regumate® (16 mg Altrenogest/Tier/Tag, *Janssen Cilag GmbH, Neuss, Deutschland*) mit der Morgenfütterung verabreicht. 24 h nach der letzten Regumate®-Gabe erhielten die Jungsauen eine Injektion von 850 IE eCG (equines Choriongonadotropin, Pregmagon®, *IDT-Biologica, Dessau-Tornau, Deutschland*) zur Stimulation des Follikelwachstums. Die Ovulationen wurden mittels 50 µg Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH, Gonavet®, *Veyx-Pharma, Schwarzenborn, Deutschland*) 80 h nach eCG stimuliert.

Die Besamungen von 27 Jungsauen erfolgte 24 und 38 h nach der GnRH-Applikation mit Sperma von geprüften Besamungsebern (Besamungsdosis 100 ml, 3 Mrd. Spermien/Dosis).

Zur „Ausschaltung“ des hormonellen Einflusses des Eierstocks wurden die Ovarien bei 35 Jungsauen chirurgisch entfernt. Dazu wurden die Tiere am ZT 10 (Tag 2 nach der GnRH-Stimulation = ZT 1) narkotisiert (Kombinationsanästhesie intravenös mit 0,2-0,25 ml/kg Ketamin, Ursotamin®, Serumwerk Bernburg, *Deutschland*, und 0,03 ml/kg Ketamin Azaperon, Stresnil®, *Janssen Cilag GmbH, Neuss, Deutschland*). Entlang der *linea alba* erfolgte ein 8 cm langer Hautschnitt und die darunter liegenden Muskel- und Bindegewebsschichten wurden stumpf durchtrennt. Anschließend wurde das Bauchfell durchtrennt und ein Eierstock hervorgelagert. Um den Ovarstumpf herum wurde eine doppelte Ligatur mit Nahtmaterial gelegt, das Ovar abgebunden und nachfolgend mit einem Elektrokauter (*Berchthold GmbH Tuttlingen, Deutschland*) abgesetzt. Anschließend erfolgten die Ektomie des kontralateralen Ovars und danach der Verschluss des Bauchfells sowie der Muskel- und Hautschicht.

#### 4.1.2. Rinder

Die Versuchstierzubereitungen der Rinder wurden im Leibniz Institut für Nutztierbiologie Dummerstorf unter Leitung von Herrn Prof. Kanitz vorgenommen.

Die im Experiment verwendeten Jungrinder der Rasse Deutsche Holsteins besaßen Körpermassen zwischen 380 und 450 kg und waren 18 bis 22 Monate alt (Tabelle 3). Die Rinder hatten vor Versuchsbeginn regelmäßige Sexualzyklen.

Die Jungrinder erhielten zwischen den ZT 8-14 eine luteolytische Dosis Prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) (0.5 mg Cloprostenol forte®, Jenapharm, *Deutschland*) intramuskulär verabreicht.

Im Abstand von 50 h zur PGF<sub>2α</sub>-Verabreichung erfolgte eine intramuskulär Behandlung mit einem GnRH-Agonisten (100 µg Depherelin®, Veyx, Deutschland). Weitere 13 h später wurden die Rinder der Versuchsgruppe terminorientiert mit 0,25 ml Samen eines Bullen besamt. Die Jungrinder der Kontrollgruppe blieben unbesamt. Die Schlachtung der Rinder in der Versuchsgruppe erfolgte an den Tagen 18 bzw. 19 nach der Besamung.

Tabelle 3: Versuchstiere Rind für den Speziesvergleich

Behandlung/Tier	Anzahl d. Tiere
ZT 10	1
ZT 19	1
TT 18/19	2
TT 19	4

#### 4.1.3. Mäuse

Die Versuchstievorbereitungen der Mäuse wurden im Leibniz Institut für Nutztierbiologie Dummerstorf wie von Spitschak et al. (2007) beschrieben unter Leitung von Frau Dr. Spitschak vorgenommen.

Die im Experiment verwendeten Mäuse der Dummerstorfer Kontrollmauslinie Fzt:DU wurden im Alter von 63 Tagen im Verhältnis 1:1 verpaart (Tabelle 4). Die Mäuse wurden in Makrolon Käfigen (Ehret, Emmendingen, Germany) bei 22 °C mit einem 12-stündigen Licht-Dunkel-Zyklus gehalten.

Tabelle 4: Versuchstiere Maus für den Speziesvergleich

Behandlung/Tier	Anzahl d. Tiere
72 h p. i.	6
TT 5	6
TT 16	6

#### **4.2. Steroidhormon-Replacement-Experimente an Sauen**

Im Rahmen des Steroidhormon-Replacements erhielten die ovariektomierten Jungsauen 0,5 mg Estradiolbenzoat (OVX+EB) (Estradiol-Depot, Jenapharm®, Jena, Deutschland, n = 8) oder 100 mg Progesteron (OVX+P<sub>4</sub>) (Progesteron-Depot, Jenapharm®, Jena, Deutschland, n = 9) täglich an den Tagen 6-9 nach der Ovariektomie (OVX) bzw. 100 mg Progesteron an den Tagen 1-5 sowie 0,5 mg Estradiol an den Tagen 6 bis 9 nach OVX (OVX+P<sub>4</sub>+EB) (n= 8) verabreicht. Am Tag 10 nach OVX wurden die Sauen hysterektomiert und Endometriumgewebe für nachfolgende Untersuchungen entnommen. Die Versuche wurden nach Wollenhaupt et al. (2002) durchgeführt.

#### **4.3. Das Modell eines unilateral trächtigen Uterushornes**

Für dieses Modell wurde bei Jungsauen (n = 6, Alter = 160 Tage) unter Neuroleptanalgesie (Kombinationsanästhesie mit Ketamin/Azaperon) mittels endoskopischer Klammertechnik (setzen von Titanklammern mit einem ENDOPATH® Linear Cutter, ETHICON ENDO-SURGERY Deutschland) ein Uterushorn verschlossen. Diese Tiere wurden dann nach Brunst- und Ovulationssynchronisation (15 Tage Regumate®, eCG und GnRH) im Alter von 240 Tagen besamt. Dadurch konnte gewährleistet werden, dass sich Embryonen nur in einem Uterushorn implantieren können und das kontralaterale Uterushorn als nicht-trächtige Kontrolle fungierte. Die Trächtigkeit unterstützende Funktion aller Gelbkörper und die Blutversorgung des verschlossenen Uterushornes blieben jedoch weitestgehend erhalten. Die Embryonen wurden nach Schlachtung mittels Spülung mit „Hank's balanced salt solution“ (HBSS, Biochrom) entfernt und die Gewebe kultiviert bzw. für die Proteinbiochemie aufgearbeitet.

#### 4.4. Explantatkulturen

Die Uteri wurden mit 70 % Ethanol (*Roth*) abgespült und anschließend in HBSS (*Biochrom*) mit Ca/Mg gewaschen. Die Uteri wurden unter der Laminar Flow Box mit einer Schere aufgeschnitten, um das Endometrium abzutrennen. Die Gewebestückchen wurden in HBSS mit Ca/Mg aufgenommen.

Nach dem Trockentupfen der Gewebestücken erfolgte die Einwaage von jeweils 0,2 g. Das eingewogene Gewebe wurde mit einem McIlwain Tissue Chopper (*Dunn Labortechnik, Asbach*) in Stücke von etwa 1 mm<sup>3</sup> zerkleinert und in die vorbereiteten Zellkulturschalen (Durchmesser 6 cm, *Biochrom*) in 4 ml Medium aufgenommen. Zum Schluss konnte dem Medium bei Bedarf Hydrocortison in einer Endkonzentration von 10 ng/ml hinzugegeben werden.

Die Kulturen wurden umgehend in den Brutschrank (*Heraeus, B6030*) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> überführt.

Für die Explantatkulturen wurde das Fertigmedium „Roswell Park Memorial Institute Medium“ (RPMI-1640) (*Biochrom*) verwendet. Für Versuche zur Phosphorylierung des 4E-BP1 wurden außerdem die Fertigmedien „Minimal essential Medium“ (MEM) (*Biochrom*) und „Dulbecco's modified essential Medium“ (DMEM) (*Biochrom*) verwendet. Die Zusätze für die Medien sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Den Explantatkulturen wurden verschiedene Hormonkonzentrationen für verschiedene Zeiträume zugesetzt: E<sub>2</sub> (*Sigma*) und P<sub>4</sub> (*Sigma*). Zusätzlich wurden Calcium-Ionophor und der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) zugesetzt. Eine Übersicht über die durchgeführten Versuche wird in Tabelle 6 gegeben.

Tabelle 5: Medien

Substanz	Menge	Endkonzentration
Medium (RPMI, MEM, DMEM)	100 ml	
Glutamin ( <i>Biochrom</i> )	0,033 g	2 mM
Penicillin/Streptomycin/ Amphotericin B	1 ml	1 % v/v
Inositol/Transferrin/Na-Selenit (ITS) ( <i>Sigma</i> )	1 ml	1 % v/v
Hydrocortison ( <i>Sigma</i> )	10 µl	10 ng/ml

weitere Zusätze für die Medien:

E<sub>2</sub> Stammlösung:      1 mg      E<sub>2</sub>  
                               500 µl      Ethanol absolut

P<sub>4</sub> Stammlösung:      100 µg      P<sub>4</sub>  
                               4 ml      A. dest.

Ca-Ionophor      1 mg      Ca-Ionophor (*Sigma*)  
Stammlösung:      5 ml      DMSO

Epidermal growth factor (EGF)  
Stammlösung:      100 µg      EGF (*Sigma*)  
                               1 ml      A. dest.

Tabelle 6: Explantatkultur und Zusätze

Versuch/ Behandlung	Medien + Zusätze	Kultivierungs- zeit
<b>Versuche zur Induktion der 23 kDa-Variante</b>		
11.02.08/OVX	RPMI mit ITS + Hydrocortison; E <sub>2</sub> + P <sub>4</sub> (50 pg/ml + 3 ng/ml; 50 pg/ml + 300 pg/ml)	4 h, 24 h, 48 h
18.02.08/OVX	RPMI mit ITS + Hydrocortison; E <sub>2</sub> + P <sub>4</sub> (60 pg/ml + 30 ng/ml; 125 pg/ml + 30 ng/ml; 125 pg/ml + 60 ng/ml 500 pg/ml + 30 ng/ml; 500 pg/ml + 60 ng/ml)	4 h, 24 h, 48 h
<b>Versuche zum Erhalt der 23k Da Variante</b>		
01.07.08/TT15	RPMI, E <sub>2</sub> + P <sub>4</sub> (125 pg/ml + 30 ng/ml; 800 pg/ml + 80 ng/ml) Ca-Ionophor (20 ng/ml), EGF (1 ng/ml), O <sub>2</sub> (5 %)	0,5 h, 2 h, 24 h
08.07.08/TT15	RPMI, E <sub>2</sub> + P <sub>4</sub> (125 pg/ml + 30 ng/ml), Ca-Ionophor (20 ng/ml), EGF (1 ng/ml)	0,5 h, 2 h, 24 h, 48 h
15.07.08/TT15	RPMI, MEM, E <sub>2</sub> /P <sub>4</sub> (125 pg/ml + 30 ng/ml), Ca-Ionophor (20 ng/ml), EGF (6 ng/ml)	2 h, 24 h, 48 h
07.10.08/TT15	RPMI, MEM, E <sub>2</sub> /P <sub>4</sub> (125 pg/ml + 30 ng/ml), Ca-Ionophor (20 ng/ml), EGF (6 ng/ml)	24 h, 48 h, 72 h
14.10.08/TT15	RPMI, MEM, E <sub>2</sub> /P <sub>4</sub> (125 pg/ml + 30 ng/ml), Ca-Ionophor (20 ng/ml), EGF (6 ng/ml)	24 h, 48 h, 72 h
21.10.08/TT15	RPMI, DMEM/HamF12, E <sub>2</sub> /P <sub>4</sub> (125 pg/ml + 30 ng/ml), Ca-Ionophor (20 ng/ml), EGF (6 ng/ml)	24 h, 48 h, 72 h
<b>Versuche zur Phosphorylierung des 4E-BP1</b>		
25.03.08/Midzyklus	RPMI, MEM, DMEM, ITS, Hydrocortison	2 h, 24 h, 48 h
21.04.08/OVX+ EB	RPMI, MEM, DMEM, ITS, Hydrocortison	4 h, 24 h, 48 h

## 4.5. Proteinbiochemie

### 4.5.1. Präparation der Gewebeextrakte

Vom Endometriumgewebe wurden 1,5 g eingewogen und mit einem Skalpell zerkleinert. Die Aufarbeitung des Gewebes erfolgte auf Eis. Das Gewebe wurde in 4 ml Homogenisationspuffer (Tabelle 8) aufgenommen und dreimal 15 s mit einem Ultra Turrax IKA T 18 basic (*IKA, Staufen*) zerkleinert. Dieser Extrakt wurde zum Entfernen von Geweberückständen durch vierlagigen Mull und für 10 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in der Ultrazentrifuge 1 h bei 40000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Die erhaltenen Zytosole wurden für die Immunoblot- und Immunopräzipitationsanalysen sowie für den Protein-Protein Interaktionsassay verwendet.

Für den Protease-Assay wurde ein Puffer ohne Proteaseinhibitoren für die Aufarbeitung verwendet (Tabelle 9).

Tabelle 7: Tris-Puffer (pH 7,4)

Substanz	Endkonzentration
Tris	25 mM
D(+) Saccharose (Sucrose)	0,25 M
NaF ( <i>Roth</i> )	50 mM
Ethylene diaminetetra-acetic (EDTA) ( <i>Roth</i> )	2,5 mM
Ethylene-bis(oxyethylenenitrilo)-tetraacetic acid (EGTA) ( <i>Boehringer Mannheim</i> )	1 mM
Natriumpyrophosphat ( <i>Roth</i> )	5 mM
β-Glycerophosphat ( <i>Roth</i> )	1 mM
NP40 (= IGEPAL CA-630) ( <i>Sigma</i> )	0,1 % v/v

Tabelle 8: Homogenisationspuffer für Gewebe, Explantate und Zellen

Substanz	Stammlösung	Endkonzentration
Tris Puffer	(siehe Tabelle 7)	25mM
Benzamidin ( <i>Sigma</i> )	0,7830 g in 5 ml A. dest.	1 mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ( <i>Sigma</i> )	0,9150 g in 5 ml A. dest.	1 mM
Pepstatin A ( <i>Sigma</i> )	1 mg in 1 ml A. dest.	2 mg/ml
Leupeptin ( <i>Sigma</i> )	1 mg in 1 ml A. dest.	2 mg/ml
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) ( <i>Sigma</i> )	17,4 mg in 1 ml DMSO	5mM
Dithiotreitol (DTT) ( <i>Sigma</i> )	3,08 mg im gesamten Puffer gelöst	2 mM

Tabelle 9: Tris-Puffer/Proteasepuffer für Gewebehomogenisation (pH 7,2)

Substanz	Endkonzentration
Tris HCl ( <i>Roth</i> )	25 mM
NaCl ( <i>Roth</i> )	150 mM

#### 4.5.2. Zelltrennung

Ein Uterushorn wurde in einer sterilen HBSS (*Biochrom*) ohne Ca/Mg gewaschen. Für die Isolation des Luminalepithels wurden etwa 30 cm des Hornes mit der 0,48 % Dispaselösung (Tabelle 10) gefüllt und die Enden mit Klemmen verschlossen. Das Horn wurde für 50 min bei 37 °C inkubiert. Die Luminalepithelzellen wurden durch Zentrifugation bei 500 g für 5 min gewonnen. Das Sediment wurde mit HBSS mit Ca/Mg gewaschen.

Für die Isolation des Glandulärepithels wurden Endometriumstücke von etwa 1 mm<sup>2</sup> mit Dispaselösung für 50 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Die Glandulärepithelzellen wurden durch Zentrifugation bei 500 g für 5 min gewonnen. Das Sediment wurde mit HBSS mit Ca/Mg gewaschen.

Für die Isolation der Stromazellen wurde Stücken des Endometriums von etwa 1 mm<sup>2</sup> in 0,25 % Trypsin (*Biochrom*) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde durch 4-lagigen Mull filtriert, um Gewebestücken zu entfernen. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 0,06 % Collagenase (*Typ IV, Biochrom*) in HBSS für 1,5 h bei 37 °C behandelt und danach durch ein 40-µm-Sieb gegeben, um Stromazellen und Drüsenfragmente zu trennen. Stromazellen des Filtrates konnten durch Zentrifugation bei 500 g für 5 min erhalten werden.

Tabelle 10: Dispaselösung

Substanz	Endkonzentration
Penicillin/Streptomycin ( <i>Biochrom</i> )	1 %
Amphotericin B ( <i>Biochrom</i> )	1 %
Dispase ( <i>Biochrom</i> )	0,48 %

#### 4.5.3. Aufarbeitung der Explantatkulturen

Bei den Explantatkulturen wurde das Gewebe in ein Sieb (Porengröße 0,2 µm, *Biochrom*) überführt und zweimal mit Waschpuffer (Tabelle 11) gewaschen. Das Gewebe wurde in 200 µl Homogenisationspuffer aufgenommen und unter Rühren für 1 h auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde 10 min bei 13.000 U/min bei 4 °C zentrifugiert. Die Menge des restlichen Überstandes konnte mithilfe einer Hamiltonspritze bestimmt werden. Vom Überstand wurden 10 µl für die Proteinbestimmung abgenommen.

Die Proteine des restlichen Überstandes wurden in Aceton (*Roth*) über Nacht bei -20 °C gefällt. Am folgenden Tag erfolgte eine Zentrifugation des Überstandes für 10 min bei 13000 U/min und 4 °C. Das Sediment wurde in 30 oder 50 µl 2x konzentrierten Probenpuffer aufgenommen (Tabelle 12) und die „Sodiumdodecylsulfat“-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt.

Tabelle 11: Waschpuffer (pH 7,0)

Substanz	Endkonzentration
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) ( <i>Roth</i> )	10 mM
D(+) Saccharose (Sucrose) ( <i>Roth</i> )	250 mM

Tabelle 12: Probenpuffer (pH 6,8)

Substanz	Endkonzenteration
Glycerin ( <i>JT Baker</i> )	2,2 M
Bis-((2-hydroxyethyl)-imino-trishydroxymethyl)-methan (Bis Tris) ( <i>Roth</i> )	70 mM
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) ( <i>Roth</i> )	0,2 M
Bromphenolblau ( <i>Roth</i> )	0,02 % v/v
2-Mercaptoethanol ( <i>Roth</i> )	9 % v/v

#### 4.5.4. Proteinbestimmung

##### Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung für Explantate oder Zelllysate erfolgte nach Bradford.

10 µl des Lysats wurden in 90 µl A. dest. aufgenommen und mit 1,5 ml Bradford Reagenz (Brilliantblau in Phosphorsäure und Methanol; *Sigma*) versetzt. Die Absorptionsmessung bei 595 nm mit einem SmartSpec (*BioRad*) erfolgte nach 5 min. Die Menge an Protein konnte durch eine Eichkurve mit einer Rinderserumalbumin-Proteinlösung ermittelt werden, deren Proben ebenfalls für 5 min mit Bradford-Reagenz versetzt wurden. Für die Stammlösung der Eichreihe wurde 0,1 g Rinderserumalbumin (*Roth*) in 100 ml A. dest. gelöst.

##### Proteinbestimmung nach Lowry

Waren hohe Proteingehalte (Nativproben) zu erwarten, so erfolgte die Proteinbestimmungsmethode nach Lowry (Lowry et al. 1951). Für die Bestimmung wurden zu 20 µl des Zytosols 960 µl A. dest. gegeben. Dieses Gemisch wurde mit 5 ml alkalischer Kupfersulfatlösung (Lösung C, Tabelle 13) versetzt und für 10 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,5 ml Folinreagenz (Lösung D). Nach 30 min wurde die Absorption bei 540 nm mit einem SmartSpec (*BioRad*) gemessen.

Die Menge an Protein konnte wiederum durch eine Eichkurve mit einer Rinderserumalbumin-Proteinlösung (siehe Bradford) ermittelt werden.

Tabelle 13: Lösungen für die Proteinbestimmung nach Lowry

Zusammensetzung der Lösungen	
Lösung A	1 ml 300 mM Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4$ , <i>Roth</i> ) 4 ml A. dest. 5 ml 70 mM Kalium-Natrium-Tartrat ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ ) ( <i>Roth</i> )
Lösung B	200 mM $\text{NaCO}_3$ ( <i>Roth</i> ) 100 mM NaOH ( <i>Roth</i> )
Lösung C	50 ml Lösung A 1 ml Lösung B
Lösung D	Folin-Ciolcalteau's phenol reagent ( <i>Sigma</i> ), Fertiglösung

#### 4.5.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Das Trenngel und das Sammelgel wurden wie in Tabelle 15 beschrieben angefertigt. Das Verhältnis Acrylamid (*Amersham Biosciences*) zu Bisacrylamid (*Amersham Biosciences*) betrug 29,7 : 0,3 (Tabelle 14). Es wurden 13,5 % Gele verwendet.

Die Elektrophorese wurde in einem vertikalen Doppelgel-Elektrophoresesystem (*peqlab*) durchgeführt. Pro Geltasche wurden 15 µg Gesamtprotein aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker diente der vorgefärbte Proteinmarker RPN 800V (*GE Healthcare*). Der Lauf erfolgte in Elektrodenpuffer (Tabelle 15) bei 300 V und 15 mA/30 mA.

Tabelle 14: Acrylamid-Gel

<b>Trenngel</b>	13,5 %
Acryl/Bisacrylamid-Lösung	6,75 ml
Tris Puffer pH 8,8/1,5 Mol	3,75 ml
A. dest.	4,25 ml
SDS 10 % ( <i>Roth</i> )	150 µl
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (Temed) ( <i>Roth</i> )	20 µl
Ammoniumpersulfat (APS) 10 % ( <i>Merck</i> )	150 µl
<b>Sammelgel</b>	
Acrylamid ( <i>Amersham Biosciences</i> )	1,25 ml
Tris Puffer 0,5 mol	1,9 ml
A. dest.	4,25 ml
SDS ( <i>Roth</i> )	75 µl
Temed ( <i>Roth</i> )	10 µl
10 % Ammoniumpersulfat (APS) ( <i>Merck</i> )	150 µl

Tabelle 16: Elektrodenpuffer (pH 8,3)

Substanz	Endkonzentration
Tris ( <i>Roth</i> )	700 mM
Glycine ( <i>Roth</i> )	5,3 M
SDS ( <i>Roth</i> )	100 mM

Für den Gebrauch wurde dieser Puffer 1: 10 mit A. dest. verdünnt.

#### 4.5.6. Western Blot

Nach der Elektrophorese wurde das Gel 10 min in Transferpuffer (Tabelle 16) gewaschen und die Proteine anschließend in einer Semidry-Blot-Apparatur (*Peqlab*) auf eine Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF) (*Millipore*) übertragen. Es wurde bei 1 mA/cm<sup>2</sup> Membran und 30 V für 1 h geblottet.

Die Membranen wurden in 5 % Trockenmilchpulver blotting grade (*Roth*) in „Tris buffered saline“ mit Tween (TBST) (Tabelle 17) für 1 h geblockt. Danach wurden die Membranen dreimal in TBST auf dem Schüttler für 10 min gewaschen.

Der primäre Antikörper wurde in der entsprechenden Verdünnung (siehe Tabelle 18) hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Es wurde 1 ml Antikörperlösung je cm<sup>2</sup> Membran verwendet. Danach wurde dreimal für 10 min mit TBST gewaschen.

Mit dem sekundären Antikörper, welcher an Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppelt war (Tabelle 18), wurde für 1,5 h auf dem Schüttler, bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Für die Detektion wurde das „Enhanced Chemiluminescence“ (ECL) plus Kit (*GE Healthcare*) verwendet. Für die ECL-Reaktion wurden 5 ml der Lösung A mit 125 µl der Lösung B versetzt und auf die Membran gegeben. Anschließend wurde die Membran unter Schütteln 5 min inkubiert. Das Signal wurde durch Exposition eines ECL-Hyperfilms (*GE Healthcare*) erhalten. Die Expositionszeit variierte je nach Signalstärke zwischen 1 und 30 min. Für die Entwicklung wurde der Film 1 min in Entwicklerlösung (GBX Developer, *Sigma*) geschwenkt und in Wasser gespült. Anschließend wurde er für 1 min in Fixierlösung (GBX Fixer, *Sigma*) geschwenkt und mit Wasser gespült.

Tabelle 16: Transferpuffer

Substanz	Endkonzentration
Tris ( <i>Roth</i> )	50 mM
Glycine ( <i>Roth</i> )	40 mM
SDS ( <i>Roth</i> )	0,1 mM
Methanol ( <i>Roth</i> )	20 % v/v

Tabelle 17: Tris buffered saline mit Tween (TBST) (pH 7,5)

Substanz	Endkonzentration
Tris ( <i>Roth</i> )	20 mM
Natriumchlorid 99,5 % ( <i>Roth</i> )	500 mM

Die Stammlösung wurde 1 : 10 mit A. dest. verdünnt und mit 0,001% v/v Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat (Tween) 20 versetzt.

Tabelle 18: Antikörper

primärer Antikörper	Verdünnung	sekundärer Antikörper	Verdünnung
eIF4E ( <i>Cell Signaling</i> )	1: 1000 in 5 % BSA in TBST	anti rabbit ( <i>Cell Signaling</i> )	1: 4000 in 5 % Trockenmilchpulver TBST
4E-BP1 ( <i>Cell Signaling</i> )	1:1000 in 5 % BSA in TBST	anti rabbit ( <i>Cell Signaling</i> )	1: 4000 in 5% Trockenmilchpulver in TBST
Tubulin	1:2000 in 5 % BSA	anti mouse ( <i>Sigma</i> )	1:7000 in TBST
HC20 <sub>Era</sub> ( <i>Santa Cruz</i> )	1:500 in 5 % Trockenmilchpulver in TBST	anti rabbit ( <i>Cell Signaling</i> )	1: 4000 in 5 % Trockenmilchpulver in TBST
anti GST ( <i>Rockland</i> )	1: 1000 in 5 % Trockenmilchpulver in TBST	anti mouse ( <i>Sigma</i> )	1:4000 in 5 % Trockenmilchpulver in TBST
anti His HRP ( <i>Invitrogen</i> )	1:5000 in 5 % Trockenmilchpulver in TBST	-	-
Sc-6967 (N-Terminus eIF4E) ( <i>Santa Cruz</i> )	1: 1000 in Rotiblock ( <i>Roth</i> )	anti goat ( <i>Santa Cruz</i> )	1:2000 in Rotiblock ( <i>Roth</i> )
Sc-6968 (C-Terminus eIF4E) ( <i>Santa Cruz</i> )	1: 1000 in Rotiblock ( <i>Roth</i> )	anti goat ( <i>Santa Cruz</i> )	1:2000 in Rotiblock ( <i>Roth</i> )
eIF4E Ser 209 ( <i>Cell Signaling</i> )	1: 750 in TBST	anti rabbit ( <i>Cell Signaling</i> )	1:2000 in 5 % Trockenmilchpulver in TBST

Alle verwendeten Antikörper waren polyklonal, außer Tubulin und hPRa (monoklonal).

#### 4.5.7. Entfernen von Antikörpern (Strippen)

Für das Aufbringen eines weiteren Antikörpers auf derselben Membran wurde diese in einer β-Mercaptoethanol haltigen Stripping Lösung (Tabelle 19) für 10 min bei 50 °C geschüttelt.

Anschließend wurde dreimal mit TBST für 10 min gewaschen, 1 h in Trockenmilch geblockt und wieder dreimal 10 min mit TBST gewaschen. Dann konnte der gewünschte

primäre Antikörper auf die Membran appliziert werden und es wurde wie oben beschrieben weiter verfahren.

Tabelle 19: Lösung zum Entfernen von Antikörpern

Substanz	Endkonzentration
Tris ( <i>Roth</i> )	60 mM
SDS ( <i>Roth</i> )	70 mM
β-Mercaptoethanol ( <i>Roth</i> )	90 mM

#### 4.5.8. Auswertung der Western Blots

Die Digitalisierung der Daten erfolgte mit dem Camilla-Kamerasystem (*Raytest, Straubenhardt, Germany*) und die Auswertung mithilfe der Aida Software Version 4.15. Mithilfe dieser Software wurde die Intensität der einzelnen Banden ermittelt, die Hintergrundschwärzung abgezogen und das Integral berechnet. Es wurde der Quotient zur Ladungskontrolle oder zum des Phosphoproteins ermittelt.

### 4.6. Strukturelle Analyse der 23 kDa-Variante des eIF4E

#### 4.6.1. Epitope mapping

Der Amino-Terminus (N-Terminus) des eIF4E wurde mittels des Antikörpers sc-6967 (*Santa Cruz*) analysiert, der das Peptid MATVEPETTPTPNPPPTEE erkennt, welches die ersten 19 Aminosäuren des eIF4E Proteins umfasst.

Der Carboxy-Terminus (C-Terminus) wurde mit dem Antikörper sc-6968 (*Santa Cruz*), der gegen die 20 letzten Aminosäuren gerichtet war, detektiert. Er erkennt das Peptid QSHADTATKSGSTTNRFVV.

Der eIF4E der Gesamtlänge wurde mit den beiden Antikörpern CST 9742 (*Cell signaling*) und E27620 (*Transduction laboratories*) detektiert

Die Spezifität der N- und C-terminalen Detektion wurde durch die Verwendung eines korrespondierenden Blocking-Peptids verifiziert. Hierfür wurden oben genannte Antikörper 1:100 in TBST für 1 h mit dem Blocking-Peptid (*Santa Cruz*) in einer Konzentration von 0,25 µl/ml vorinkubiert und anschließend die Western Detektion durchgeführt.

#### 4.6.2. Protease-Assay

Es wurde Zytosol (gewonnen ohne Proteasehemmerzusatz) von OVX-Tieren verwendet, die nur die 25 kDa-eIF4E-Variante aufwiesen sowie Zytosol von TT 15-Tieren, die ausschließlich die 23 kDa-Variante ausbildeten. Es wurde die Wirkung von  $\text{CaCl}_2$  als Stimulator und von EDTA als Inhibitor von Metalloproteasen sowie ihre Wirkung auf den proteolytischen Prozess untersucht.

Als Substrat wurde ein rekombinanter N-terminal Glutathiontransferase (GST) markierter eIF4E der Gesamtlänge (*Abcam*) mit einem Molekulargewicht von 51 kDa verwendet.

Die Zelllysate wurden mit 50 ng externem Substrat versetzt. Die Inkubation erfolgte für 0, 30, 60 und 120 min bei 37 °C. In parallelen Assays wurden den Proben 5 mM EDTA und/oder 10 mM  $\text{CaCl}_2$  zugesetzt (Tabelle 20). Nach dieser Prozedur wurden die Proben in 4x SDS Probenpuffer gekocht und die Reaktion auf diese Weise gestoppt.

Anschließend erfolgte eine Gelelektrophorese mittels eines 13,5 %igen SDS Gels. Der Western Blot wurde mit den Antikörpern anti-GST und/oder eIF4E durchgeführt.

Tabelle 20: Zusätze Protease-Assay

Substanz	eingesetzte Menge	Endkonzentration
Cytosol	20 $\mu\text{l}$	
rec. eIF4E ( <i>Abcam</i> )	6,25 $\mu\text{l} = 50\text{ng}$	
EDTA ( <i>Roth</i> )	0,64 $\mu\text{l}$	5 mM
$\text{CaCl}_2$ ( <i>Roth</i> )	0,82 $\mu\text{l}$	10 mM

#### 4.6.3. Matrix-assisted-laser-desorption/ionization-time-of-flight-time-of-flight-mass-spectrometry (MALDI-TOF-TOF)

Die verkürzte Variante des eIF4E wurde mittels eines Protease-Assays (Punkt 2.6.2.) unter Verwendung von 1  $\mu\text{g}$  GST-eIF4E-Fusionsprotein als Substrat generiert. Um Kontaminationen mit Proteinen des Endometriums zu vermeiden und die maximale Ausbeute zu erzielen, wurde die Reaktion sequenziell durch 4-malige Zugabe von 1:20 verdünnten Zelllysaten von OVX- oder TT-15 Tieren, für 30 min bei 37 °C durchgeführt.

Die Ergebnisse wurden mittels 13,5 % SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung (*Roti Blue, Roth*) für 2 h sowie darauffolgendem Western Blot überprüft.

Die MALDI-TOF-TOF-Analysen wurde von Herrn Dr. Albrecht am Institut für Mikrobiologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald vorgenommen.

#### Gelverdau

Die Protein Spots wurden aus dem Coomassie gefärbten SDS-Gel mittels eines „Spot Cutter“ (*Proteome Works<sup>TM</sup>, Biorad, Hercules, CA, USA*) ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen „Spots“ wurden einem tryptischen Verdau unterzogen. Das anschließende Überführen auf ein „MALDI target“ wurde automatisch mit einer „Ettan Spot Handling Workstation“ (*Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden*) nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Die Gelstücke wurde zweimal 30 min in 100 µl 50 % CH<sub>3</sub>CN und 50 % 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> und einmal mit 100 µl 75 % CH<sub>3</sub>CN für 10 min gewaschen. Nach dem Trocknen bei 37 °C für 17 min wurden 10 µl Trypsinlösung (20 ng/µl Trypsin) (*Promega, Madison, WI, USA*) hinzugegeben und für 120 min bei 37 °C inkubiert. Für die Extraktion wurden die Gelstücke mit 60 µl 0,1 % Trifluoressigsäure in 50 % CH<sub>3</sub>CN bedeckt und für 30 min bei 40 °C inkubiert. Der peptidhaltige Überstand wurde in eine neue Mikrotiterplatte überführt und die Extraktion wurde mit 40 µl der gleichen Lösung wiederholt. Die Überstände wurden bei 40 °C für 220 min getrocknet. Das Pellet wurde in 2,2 µl 0,5 % Trifluoressigsäure in 50 % CH<sub>3</sub>CN gelöst. 0,4 µl dieser Lösung wurden direkt auf das „MALDI target“ aufgetragen. Anschließend 0,4 µl einer gesättigten α-Cyano-4-Hydroxy Zimtsäure-Lösung in 70 % CH<sub>3</sub>CN hinzugefügt und mit der Probe durch 5-maliges Aspirieren der Mixtur vermischt. Die Proben trockneten 10-15 min, bevor die MALDI-TOF-TOF-Analyse durchgeführt wurde.

Die Analysen wurden mittels eines 4800 MALDI-TOF-TOF-Analyzer (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) durchgeführt. Die Datenbanksuche erfolgte mit dem Mascot Search Engine Version: 2.1.04 (*Matrix Science Ltd, London, UK*) mit einer spezifischen XXXyy Sequenz Datenbank.

## 4.7. Funktionelle Analyse der 23 kDa-Variante

### 4.7.1. Bindung an m<sup>7</sup>GTP-Sepharose

Die m<sup>7</sup>GTP-Sepharose (*GE Healthcare*) wurde vor Gebrauch mit dem 3fachen Volumen TBS gewaschen.

Im Assay wurden 40 µl m<sup>7</sup>GTP-Sepharose mit 300 µg Zytosolproteinen versetzt und das Inkubationsvolumen mit TBS auf 180 µl ergänzt. Die Proben wurden 2 h bei 4 °C auf einem Rollentaumler (*CAT RM5*) inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose einschließlich der gebundenen Proteine sowie der Sepharoseüberstand durch Zentrifugation für 2 min bei 10.000 U/min gewonnen. Die Proteine der Sepharose-Überstände wurden mit 4-fachem Volumen Aceton bei -20 °C präzipitiert. Nach 3-maligem Waschen des Sepharose-Sediments wurde dieses nach Zugabe von 50 µl 4x konzentriertem SDS-PAGE Probenpuffer 5 min gekocht. Die an die Sepharose gebundenen sowie im Überstand verbliebenen ungebundenen Proteine wurden auf einem 15 %igen bzw. 7.5 %igen SDS-Gel getrennt und mittels Immunoblotting (Antikörper: eIF4E, eIF4G, 4E-BP1) detektiert.

### 4.7.2. Immunopräzipitation

Es wurden 100 µg Protein des Endometriumzytosols in 180 µl Homogenisationspuffer (Tabelle 11) aufgenommen und durch die Inkubation mit 20 µl Protein-A/G-Plus-Agarose (*Santa Cruz*) für 1 h bei 4 °C vorgeklärt, um die unspezifische Bindung des Proteins an die Agarose zu vermindern. Die Agarose-Überstände, gewonnen durch Zentrifugation bei 2500 U/min und 4 °C, wurden über Nacht mit 5 µl anti-4E-BP1 inkubiert. Anschließend wurden die Immunkomplexe durch Zugabe von 20 µl Protein-A/G-Plus-Agarose für 3 h bei Raumtemperatur gebunden und durch Zentrifugation bei 2500 U/min gewonnen. Die Proteine der Agarose-Überstände (ungebundene Proteine) wurden mit 4-fachem Volumen Aceton bei -20 °C präzipitiert. Die Agarosesedimente (gebundene Proteine) wurden nach 3-maligem Waschen mit Homogenisationspuffer mit 50 µl SDS-PAGE Probenpuffer versetzt und 5 min gekocht.

---

Die Proteine der Überstände sowie des Agarosesedimente wurden mittels 15 %-iger SDS-PAGE getrennt und der eIF4E sowie das 4E-BP1 mittels Immunoblotting nachgewiesen.

#### 4.7.3. Protein-Protein-Interaktionsassay

Zur Analyse der Interaktion von 4E-BP1 mit den verschiedenen Formen von eIF4E wurde zunächst rekombinantes 4E-BP1, welches N-proximal mit sechs Histidinresten (His)<sub>6</sub> markiert war, an Ni-NTA magnetic Agarose Beads (*Qiagen*) gebunden. Die Bindung erfolgte in Bindungspuffer (Tabelle 22). 4E-BP1, gebunden an die Beads, wurde mit 15 µl Lysat des Endometriums nach OVX bzw. TT 15 für 2 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Lysate ohne His-markiertes eIF4E-BP1 unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Beads dreimal in Bindungspuffer mit 10 mM Imidazol gewaschen und anschließend mit Elutionspuffer mit 250 mM Imidazol eluiert (Tabelle 21). Die gebundenen Fraktionen und die präzipitierten Überstände wurden mittels SDS-PAGE 13,5 % aufgetrennt und durch Western Blot sowie anschließende Antikörperbehandlung gegen eIF4E sowie (His)<sub>6</sub> analysiert.

Tabelle 21: Bindungspuffer/Elutionspuffer

Substanz	Konzentration
TRis/HCl ( <i>Roth</i> )	20 mM
NaCl ( <i>Roth</i> )	300 mM
Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat (Tween 20) ( <i>Sigma</i> )	10 mM/250 mM
Imidazol ( <i>Sigma</i> )	10 mM/250 mM

## 4.8. mRNA-Analytik

Die mRNA-Analytik wurde unter Leitung von Prof. Seyfert vom Fachbereich Molekularbiologie des Leibniz Instituts für Nutztierbiologie Dummerstorf durchgeführt.

### 4.8.1. RNA-Isolation

Zur Etablierung der eIF4E-Sequenz wurde RNA aus Schweineleber isoliert.

Das Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff in einem Mörser zerkleinert. Es wurden 50 mg des Gewebes 0,75 ml TRIzol LS Fertigreagenz (*invitrogen*) zugesetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 0,2 ml Chloroform jedem ml TRIzol zugesetzt und 15 s geschüttelt, dann weitere 2-15 min inkubiert. Anschließend wurde 5 min bei 4 °C und 12.000 x g zentrifugiert. Die wässrige, RNA-haltige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt. Die RNA wurde mit 0,5 ml Isopropylalkohol per 0,75 ml TRIzol LS präzipitiert. Die Proben wurden für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 10 min bei 12.000 x g und bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 75 % Ethanol per 0,75 ml TRIzol gewaschen. Die Probe wurde bei 7500 x g bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde luftgetrocknet und in RNase freiem Wasser aufgenommen.

### 4.8.2. RNA-Reinigung mittels Cäsiumchlorid-Zentrifugation (CsCl-Zentrifugation) und Northern Blotting

Die RNA aus endometrialem Gewebe nach OVX und am TT 15 wurde für den Northern Blot in einer CsCl-Zentrifugation aufgereinigt. Dabei wurde 1 g Gesamt RNA über einem CsCl-Kissen (9,6 g CsCl in 9 ml 0,01 M EDTA pH 7,5) über Nacht (12 h) bei 40.000 U/min zentrifugiert. Das RNA-Sediment wurde in TE Puffer (45 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA pH 8) aufgenommen, anschließend phenolisiert und mit dreifachem Volumen Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Die gewonnene RNA in Probenpuffer (Tabelle 22) wurde in 1,2 % Agarosegelen mit 2,2 M Formaldehyd aufgetrennt. Es wurde ein 5fach konzentrierter Gelpuffer (Tabelle 23) vorbereitet - Die entsprechende Menge Agarose wurde in Wasser geschmolzen, auf 60 °C abgekühlt und mit 5fach konzentriertem Gelpuffer versetzt, um eine einfach konzentrierte Lösung herzustellen. Vor dem Lauf

wurde 10 µg RNA für 5 min auf 68 °C erhitzt und dann sofort auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgte in einfach konzentriertem Gelpuffer bei 4 V/cm bis die Bromphenolblaubande das untere Drittel des Gels erreichte (ca.1,5 h).

Danach wurde das Gel zweimal 15 min in 20x SSC Puffer (Tabelle 24) unter Schütteln gewaschen und die RNA mithilfe des 20x SSC Puffers auf eine Hybond N Membran (Amersham) mittels der Saugkapillarblottechnik überführt. Die Filter wurden zweimal in SSC gewaschen und waren somit bereit für die Hybridisierung.

Tabelle 22: Probenpuffer

Substanz	Konzentration
Glycerol ( <i>Roth</i> )	50 %
EDTA ( <i>Roth</i> )	1 mM
Bromphenolblau ( <i>Sigma</i> )	0,25 %
Xylene Cyanol FF ( <i>Sigma</i> )	0,25 %

Tabelle 23: Gelpuffer

Substanz	Konzentration	pH
MOPS (3 ( N-Morpholino )-Propansulfonsäure) ( <i>Sigma</i> )	100 mM	7,0
Natriumacetat ( <i>Sigma</i> )	40 mM	
EDTA ( <i>Roth</i> )	5 mM	8,0
Formaldehyd ( <i>Sigma</i> )	2,2 M	

Tabelle 24: 20x SSC Puffer

Substanz	Konzentration
NaCl ( <i>Roth</i> )	3 M
Na <sub>3</sub> Citrat ( <i>Roth</i> )	0,3 M

#### 4.8.3. Herstellung der complementary DNA (cDNA)

Die Herstellung von cDNA aus einer RNA erfordert den Einsatz einer reversen Transkriptase-Polymerasenkettenreaktion (RT PCR).

Für die Herstellung der cDNA wurde Superscript II Reverse Transkriptase (*Invitrogen*) verwendet. Die cDNA wurde aus 1,5 µg RNA hergestellt und mit einem High Purification Kit (*Roche*) aufgereinigt und anschließend in 50 µl Wasser eluiert. 5 µl dieser Lösung wurden für den ersten PCR-Zyklus mit der „Fast Start Taq DNA Polymerase Kit“ (*Roche*) verwendet. Während der ersten elf Zyklen wurde die Annealing Temperatur von 72 °C auf 60 °C gesenkt. Der Zyklus setzte sich aus 1min Denaturierung bei 95 °C, 1 min Annealing

und 3 min Extension bei 72 °C zusammen. Danach wurden 30 Zyklen bei 60 °C Annealingtemperatur durchgeführt.

Die Sequenzen für die Primer wurden aus evolutionär konservierten Regionen der bovinen cDNA-Sequenz dieses Faktors erhalten. Es wurde das Oligonukleotid eF4rl (5'-GAGAATACTCAGAAGGTGTCTTC-3') verwendet. Dieses Sequenzmotiv befindet sich direkt stromabwärts vom Translations-Stop-Codon. Um den größten Teil der codierenden Region des eIF4E aus dem Schwein zu amplifizieren, wurden die Oligonukleotid Primer eF4-f1 (5'-AGATCGATCTAAG ATGGCGAC-3', vorwärts, Translations-Start-Codon unterstrichen dargestellt) und eF4-r3 (5'-ATGGGACTGA TAACCAATCACTATC-3', rückwärts) verwendet.

#### Sonden für die Hybridisierung

Zur Herstellung der Sonden wurden 25 ng klonierte cDNA mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP] markiert. Es wurden folgende Sonden verwendet: Für Aktin-DNA Klon 636 und für eIF-DNA Klon 1333. Für die Markierung wurde das „Mega prime DNA labelling Kit“ (*Amersham*) verwendet. Wie vom Hersteller angegeben, wurden 25 ng DNA in TE Puffer gelöst. Diese Template DNA wurde mit 5 µl Primer versetzt. Es wurde mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Die Denaturierung erfolgte durch Erhitzen auf 100 °C für 5 min. Danach erfolgte die Zugabe von 10 µl labelling Puffer, 4 µl unmarkierten Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs), 5 µl Reaktionspuffer, 5 µl radiomarkierten dNTPs und 2 µl Enzym. Die Mischung wurde mit einer Pipette vorsichtig hochgezogen und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl 0,2 M EDTA gestoppt.

Eine anschließende Chromatografie über Mini quick spin colums (*Roche*) entfernte nicht inkorporierte Radionukleotide von den markierten Sonden. Die Filter wurden für 1 h bei 68 °C in ExpressHyb Lösung (*BD Biosciences*) vorhybridisiert. Vor der Hybridisierung wurde die Sonde für 5 min auf 100 °C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt. Die Hybridisierung erfolgte bei 68 °C in 50 µl SSC pro cm<sup>2</sup> Membran für 1 h. Anschließend wurde dreimal mit 2x SSC mit 0,05 % SDS für 10 min gewaschen. Danach wurde weitere zweimal 15 min bei 50 °C in 0,1x SSC mit 0,1 % SDS gewaschen. Die radioaktiven Banden wurden nach 5 Tagen Auflegen auf einen Bildverstärker mit einem STORM-Phospho-Imager (*Molecular Dynamics*) sichtbar gemacht und ausgewertet.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Bestätigung des Auftretens der 23 kDa-Variante im Zeitraum der Implantation

In vorangegangenen Untersuchungen (Wollenhaupt et al. 2007) wurde eine verkürzte Variante des Cap-Bindungsproteins eIF4E im Endometrium trächtiger Sauen gefunden. Ziel des ersten Experimentes war zu analysieren, ob diese Variante auch im vorliegenden Versuchsmaterial auftrat. Es wurde die Expression des eIF4E im Endometriumzytosol von Sauen am ZT 13 sowie an den TT 13, 15 und 30 untersucht. Für die Analyse wurde ein Antikörper gegen den gesamten eIF4E sowie für die am Ser-209 phosphorylierte Form verwendet.

Am ZT 13 wurde predominant die prototypische Form des eIF4E mit einem Molekulargewicht von 25 kDa nachgewiesen (Abbildung 5A). An den TT 13 und 15 war die 25 kDa-Variante immer weniger nachweisbar und eine bisher nicht beschriebene eIF4E-Variante mit einem Molekulargewicht von etwa 23 kDa konnte beobachtet werden. Das Molekulargewicht dieser Variante wurde mithilfe einer SDS-PAGE und des entsprechenden Molekulargewichtsmarkers annähernd bestimmt. Die fehlenden Aminosäuren wurden mithilfe der Massenspektroskopie (MALDI-TOF-TOF) ermittelt (siehe Punkt 5.6.3.).

Am TT 30 wurde neben der 23 kDa-Variante auch der 25 kDa-eIF4E wieder detektiert. Beide Varianten traten in etwa dem gleichen Verhältnis auf. Eine Ladungskontrolle erfolgte mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin (ACTB). Die Ladungskontrolle ist hier exemplarisch dargestellt (Abbildung 5A).

In Abbildung 5B sind die Ergebnisse als Mittelwerte mit Standardabweichungen der Verhältnisse 25 kDa- zu 23 kDa-eIF4E dargestellt. Die Western Blots von 6 Versuchstieren wurden eingescannt und mithilfe der Aida Software ausgewertet. Die zusammengefassten Ergebnisse spiegeln die im Immunoblot dargestellten Banden, beispielsweise die Dominanz der 23 kDa-Variante des eIF4E an den TT 15 und 30, wieder.

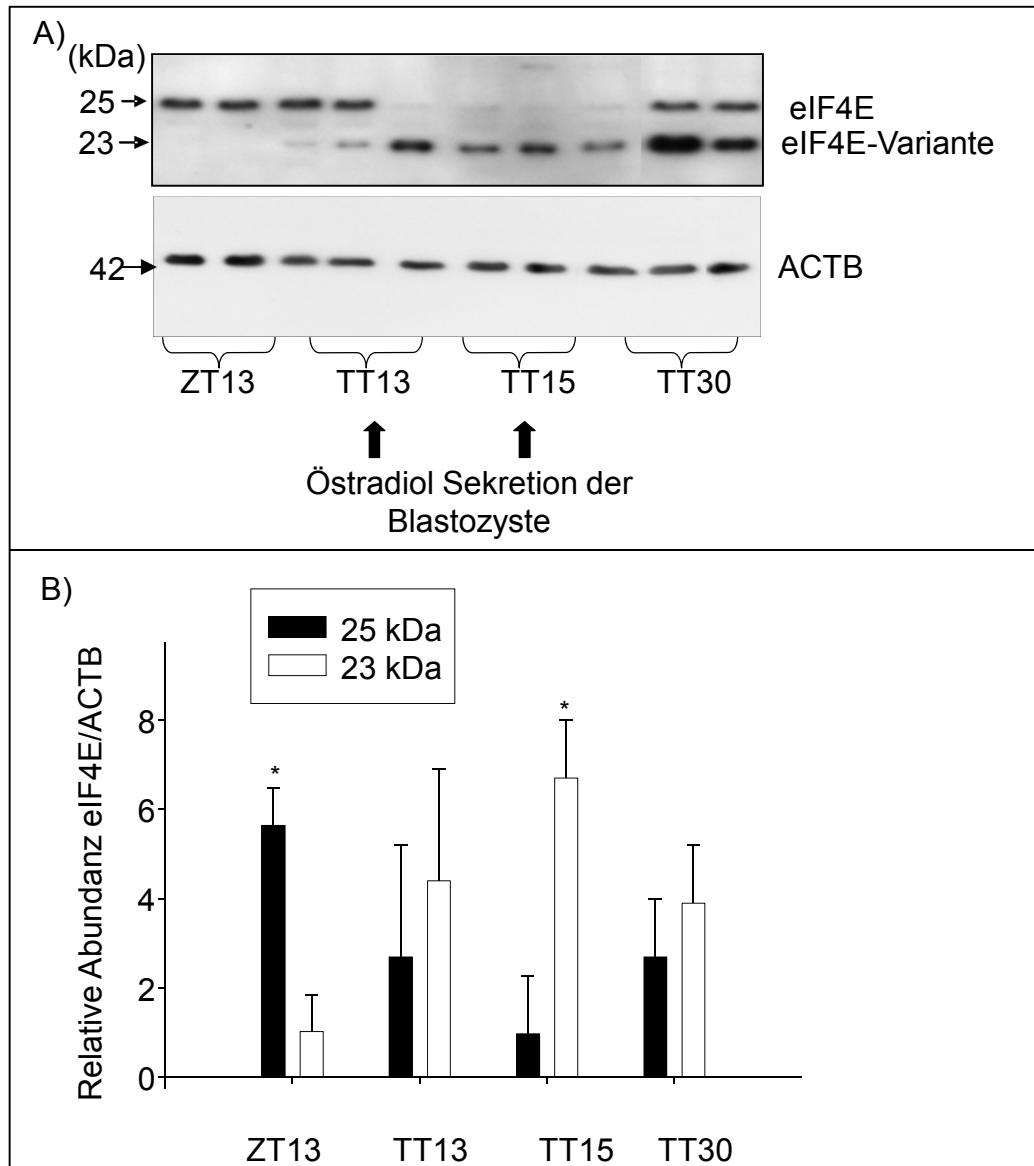


Abbildung 5: A) eIF4E im Endometrium zyklischer und trächtiger Sauen/Western Blot

Dargestellt ist eine 13,5 % SDS-PAGE mit anschließender Western Blot Detektion mit einem Antikörper gegen eIF4E an den ZT 13, TT 13, 15 und 30. Am ZT 13 dominierte die 25 kDa-Variante des eIF4E. An den TT 13 und 15 dominierte die 23 kDa-Variante bei Abnahme der 25 kDa-Variante. Am TT 30 sind beide Varianten im gleichen Verhältnis zu beobachten.

**B) Relative Expression der 25 kDa- und 23 kDa-Variante des eIF4E im Endometrium zyklischer und trächtiger Sauen**

Es sind die Mittelwerte der Verhältnisse der 25 kDa-Variante zur 23-kDa Variante mit Standardabweichung der Western Blot Detektion dargestellt. Auch hier dominiert am ZT 13 die 25-kDa Variante. Mit Beginn der Trächtigkeit (TT 13 und 15) dominiert die 23 kDa-Variante und am TT 30 sind beide Varianten in etwa im gleichen Verhältnis zu finden.

Ein ähnliches Verteilungsmuster des eIF4E wurde bei Verwendung des phosphospezifischen Antikörpers erhalten (Abbildung 6A). Die 25 kDa-eIF4E-Variante dominierte in OVX-Tieren sowie am ZT 13. An den TT 13 und 15 dagegen war es die 23 kDa-Variante, bei Abnahme der 25 kDa-eIF4E-Variante. Am TT 30 waren auch hier beide Varianten in etwa dem gleichen Verhältnis zu finden. Beide Varianten des eIF4E konnten mittels des Antikörpers gegen eIF4E Ser-209 detektiert werden.

Die 23 kDa-eIF4E-Variante war endometriumsspezifisch und konnte in keinem anderen untersuchten Gewebe des Schweins, wie Muskelgewebe, Herz, Gehirn, Milz, Leber und Ovarien sowie Oozyten oder Blastozysten, nachgewiesen werden (Abbildung 6B). Spuren von kleineren Proteinen (< 25 kDa) wurden in der Niere und der Leber nachgewiesen. Diese unterschieden sich jedoch in der Größe von der 23 kDa-eIF4E-Form und waren mit dem phosphospezifischen eIF4E-Antikörper nicht feststellbar.

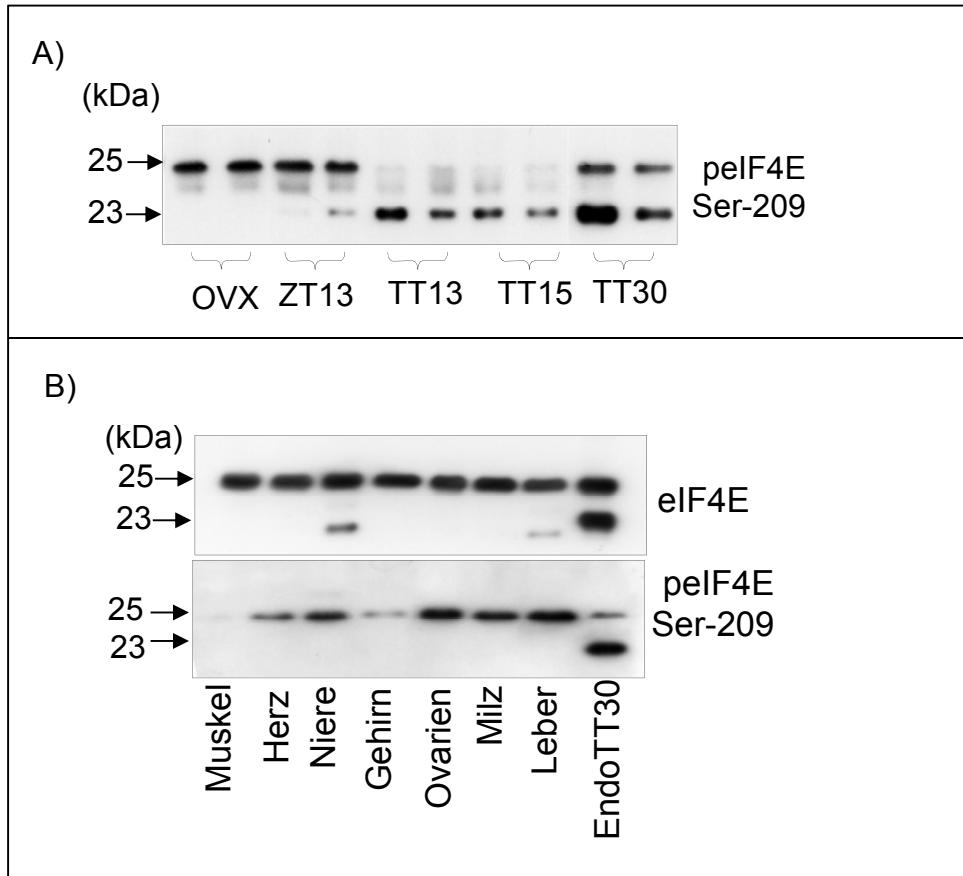


Abbildung 6: A) Phosphorylierung des eIF4E am Ser-209

Dargestellt ist eine 13,5 % SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Detektion mit einem Antikörper gegen eIF4E Ser-209. Sowohl die 25 kDa-Variante als auch die 23 kDa-Variante des eIF4E konnten mittels dieses Antikörpers detektiert werden.

B) Nachweis des eIF4E in den verschiedenen Organen des Schweins

Dargestellt ist eine 13,5 % SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Detektion mit einem Antikörper gegen eIF4E. Verwendet wurden Lysate von verschiedenen Geweben eines Tieres vom TT 30. Die verkürzte Variante des eIF4E tritt nur im Endometrium auf.

## 5.2. Untersuchung des eIF4E Repressorproteins 4E-BP1

Neben der eIF4E Expression und Phosphorylierung wurde auch das eIF4E-Repressorprotein 4E-BP1 hinsichtlich seiner Expression bzw. seines Phosphorylierungsstatus im Zyklus- und Trächtigkeitsverlauf untersucht (Abbildung 7). Am ZT 13 waren zwei Banden beobachtbar – die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Bande. Sie zeigten unterschiedlich phosphorylierte Formen des 4E-BP1. An den TT 13 und 15 war nur die  $\alpha$ -Bande vorhanden. Es sank die Phosphorylierung des 4E-BP1, so dass nun eine stark hypophosphorylierte 4E-BP1-Form vorlag. Die Hypophosphorylierung geht mit dem verstärkten Auftreten der 23 kDa-Variante des eIF4E einher. Neben der Phosphorylierung

nahm auch die Expression des Repressorproteins, erkennbar an der Abschwächung des Signals, deutlich ab (TT 15).

Am TT 30, zu einem Zeitpunkt an dem die 25 kDa-Variante des eIF4E wieder auftritt, war neben der  $\alpha$  und  $\beta$ -Bande zusätzlich eine dritte Bande, die  $\gamma$ -Bande, des 4E-BP1 beobachtbar. Zusätzlich nahm die Signalstärke für 4E-BP1 zu.

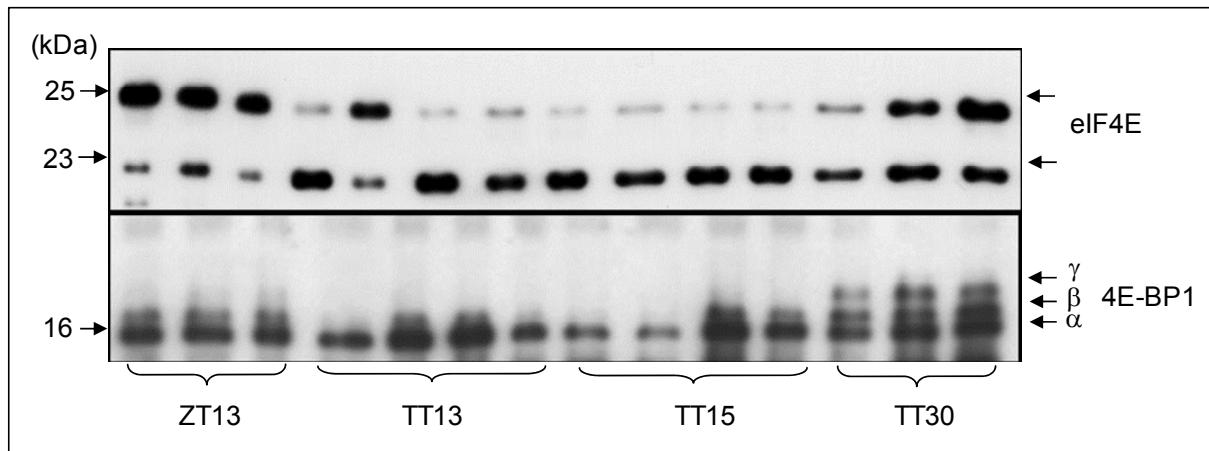


Abbildung 7: **eIF4E und 4E-BP1 im Endometrium zyklischer und trächtiger Sauen**

Dargestellt ist eine 13,5 % SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Detektion mit den Antikörpern gegen eIF4E, sowie 4E-BP1 von Tieren des ZT 13, TT 13, 15 und 30. Am ZT 13 traten die  $\alpha$  und  $\beta$ -Bande auf, somit lag eine moderate Phosphorylierung vor. Diese sank weiter an den TT 13 und 15, so dass eine stark hypophosphorylierte 4E-BP1-Form vorlag. Neben der Phosphorylierung nahm die Expression des Repressorproteins ebenfalls deutlich ab. Am TT 30 stieg die Phosphorylierung an und es wurde ein kräftigeres Signal erhalten. Die  $\gamma$ -Bande kommt hinzu.

### **5.3. Untersuchung der Regulation der Expression der 23 kDa-Variante im Endometrium**

#### **5.3.1. Unilaterale Trächtigkeit**

Um den Einfluss der embryonalen Signale auf die eIF4E-Expression zu untersuchen, wurde bei den Sauen ein Uterushorn vor der Besamung mit einer Titanklammer endoskopisch verschlossen. Die Analyse am TT 15 mittels Western Blot mit dem Antikörper gegen eIF4E der trächtigen und nicht-trächtigen Uterushörner ergab, dass die 23 kDa-eIF4E-Variante dominant im trächtigen Uterushorn exprimiert wurde (Abbildung 8A). Im nicht-trächtigen Uterushorn war lediglich die prototypische 25 kDa-Variante des

eIF4E beobachtbar. Die 25 kDa-Variante des eIF4E war auch im trächtigen Uterushorn noch nachweisbar.

Das eIF4E-Repressorprotein 4E-BP1 war im trächtigen Uterushorn im Vergleich zum nicht-trächtigen Uterushorn deutlich geringer phosphoryliert (Abbildung 8B). Es ist sogar eine Bande kleiner als 16 kDa sichtbar.

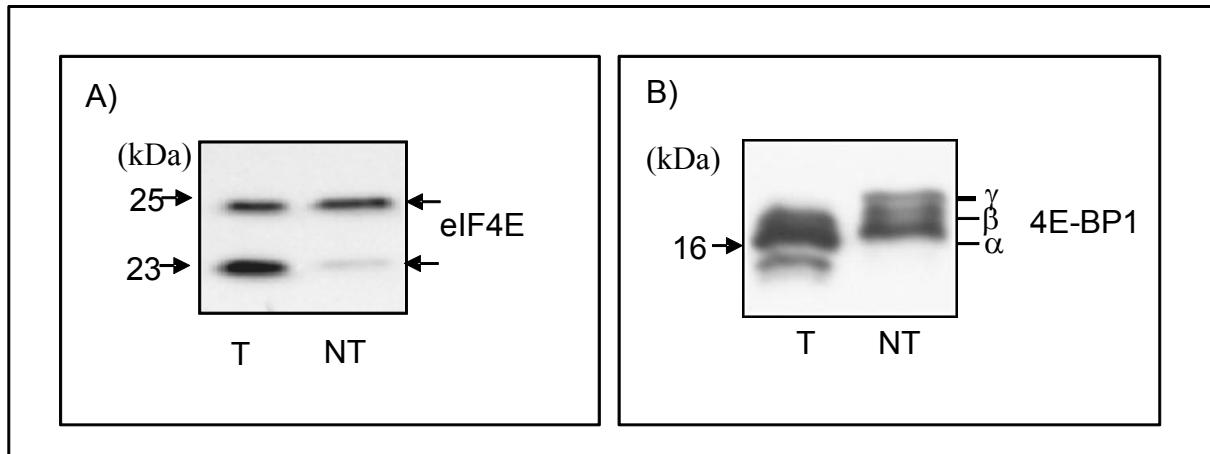


Abbildung 8: A) Verteilung des eIF4E bei unilateraler Trächtigkeit

Dargestellt ist an einem TT 15 Tier eine 13,5 % SDS PAGE mit anschließender Western-Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen eIF4E. Die 23 kDa-eIF4E-Variante war dominant im trächtigen Uterushorn. Die 25 kDa-Variante war im trächtigen Uterushorn nur in Spuren detektierbar. Im nicht-trächtigen Uterushorn dominierte die 25 kDa-Variante.

B) Verteilung des 4E-BP1 bei unilateraler Trächtigkeit

Dargestellt ist an einem TT 15 Tier eine 13,5 % SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen 4E-BP1. 4E-BP1 wies im trächtigen Uterushorn im Vergleich zum nicht-trächtigen Uterushorn eine geringere Phosphorylierung auf.

T = trächtiges Uterushorn, NT = nicht-trächtiges Uterushorn

### 5.3.2. Untersuchung der Implantationsstelle

Untersuchungen der Implantationsstelle sowie des umgebenden Endometriumgewebes an den TT 13 und TT 15 ergaben nach Immunoblotting mit einem Antikörper gegen eIF4E, dass die 23 kDa-eIF4E-Variante fast ausschließlich an der Implantationsstelle zu finden war. Die 25 kDa-Variante ließ sich am TT 13 im umgebenden Endometrium, aber nicht an der Implantationsstelle nachweisen. Am TT 15 konnte an der Implantationsstelle sowie im umgebenden Endometrium nur die 23 kDa-eIF4E-Form nachgewiesen werden (Abbildung 9).

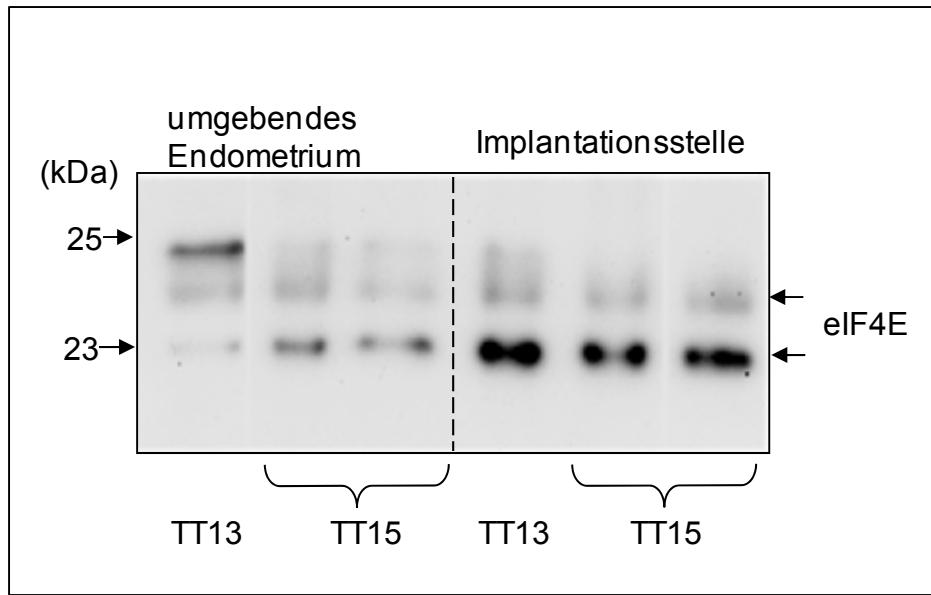


Abbildung 9: **eIF4E in der Implantationsstelle und umgebendem Endometrium von Sauen**  
Dargestellt ist eine 13,5 % SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen eIF4E von Sauen am TT 13 und TT 15. Die 23 kDa-Variante konnte fast ausschließlich an der Implantationsstelle detektiert werden, die 25 kDa-Variante am TT 13 im umgebenden Endometrium.

### 5.3.3. Zelluläre Lokalisation der 23 kDa-Variante des eIF4E

Untersuchungen zur Lokalisation der Expression der kleineren eIF4E-Variante mittels Zelltrennung und Western Blot zeigten, dass diese nur im Luminalepithel analysierbar war (Abbildung 10). Im Glandulärepithel sowie im Stroma war die 23 kDa-eIF4E-Variante nicht nachweisbar. Der prototypische eIF4E mit einem Molekulargewicht von 25 kDa hingegen konnte in allen drei untersuchten Zelltypen aufgefunden werden. Im Kontrollgewebe (nicht-trächtiges Uterushorn) dominierte die 25 kDa-Variante des eIF4E.

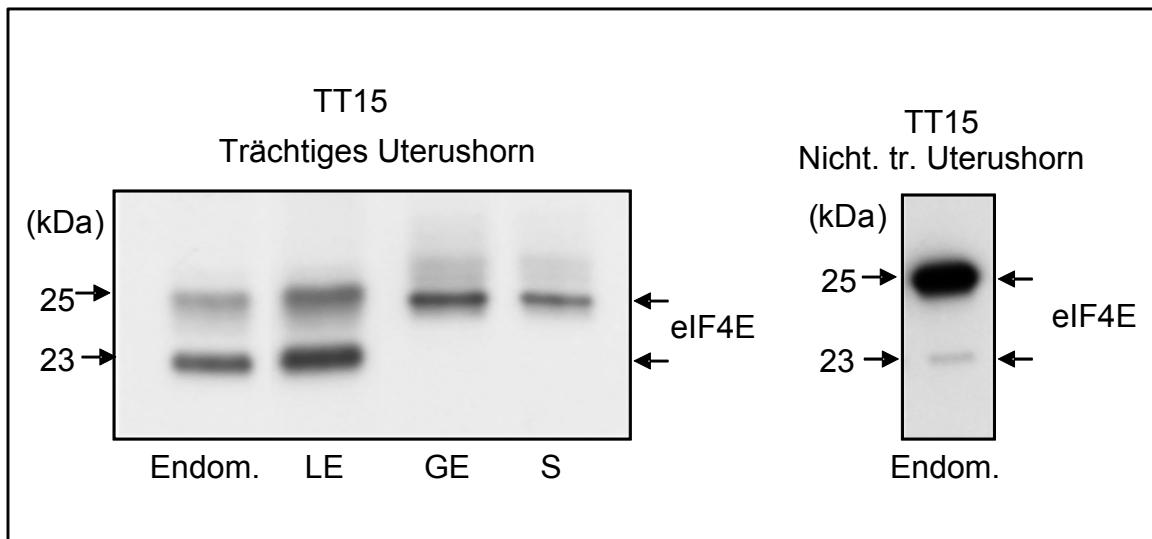


Abbildung 10: **Zelluläre Lokalisation der 23 kDa-eIF4E-Variante**

Dargestellt ist eine 13,5 % SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen eIF4E. Am TT 15 sind beide Varianten des eIF4E im trächtigen Uterushorn mit Dominanz der 23 kDa-Variante erkennbar. Die 25 kDa-Variante findet sich in allen Zelltypen wieder, die 23 kDa-Variante ist nur im Luminalepithel detektierbar. Die Kontrolle (nicht-trächtiges Uterushorn) zeigte die Dominanz der 25 kDa-Variante. LE = Luminalepithel, GE = Glandulärepithel, S = Stroma

### 5.3.4. Steroidhormon-Replacement

Der Einfluss der maternalen Steroidhormone auf die Bildung der 23 kDa-eIF4E-Variante im Endometrium wurde mittels Steroidhormon-Replacement-Experimenten untersucht.

Die Western Blot Analyse mit einem Antikörper gegen eIF4E zeigte, dass Tiere nach OVX nur die 25 kDa-Variante exprimierten. Nach Applikation nur eines der Hormone Östradiolbenzoat (EB) oder P<sub>4</sub> nach OVX kam es hauptsächlich zur Bildung der 25 kDa-Variante des eIF4E (Abbildung 11A). Applizierte man jedoch P<sub>4</sub> und EB in Kombination, so konnte auch die 23 kDa-eIF4E-Variante sicher nachgewiesen werden. Statistische Auswertungen (Abbildung 11B) bestätigten die im Western Blot erhaltenen Ergebnisse. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen von 7 Versuchstieren.

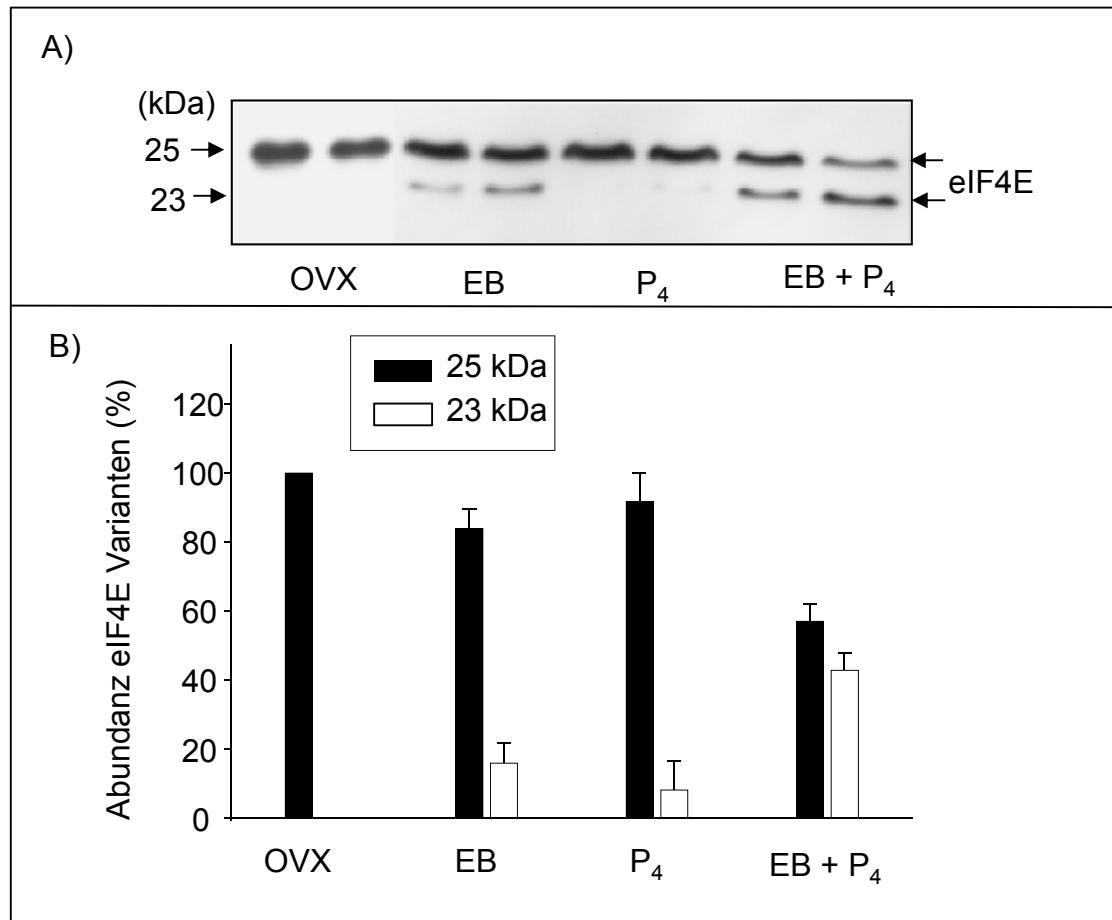


Abbildung 11:

**A) Einfluss maternaler Steroidhormone auf die Bildung der 23 kDa-eIF4E-Variante/Steroidhormon-Replacement**

Dargestellt ist eine 13,5 % SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen eIF4E. Tiere nach OVX oder nach Applikation von EB oder P<sub>4</sub> zeigten nur die 25 kDa-Variante oder dominant die 25 kDa-Variante. Applikation von EB und P<sub>4</sub> führte zur Detektion der 25 kDa- und der 23 kDa-Variante des eIF4E; OVX = Ovarioktomie, EB = Östradiolbenzoat.

**B) Mittelwerte und Standardabweichung der Steroidhormon-Replacement-Experiments**

Dargestellt sind die Mittelwerte von je 7 Versuchstieren. In Tieren nach OVX trat nur die 25 kDa-Variante auf. Nach Behandlung mit EB oder P<sub>4</sub> dominierte die 25 kDa-Variante. Bei Behandlung mit beiden Steroidhormonen traten beide Varianten in etwa im gleichen Verhältnis auf.

## 5.4. In-vitro-Experimente: Explantatkultur

Es wurde sowohl die Induktion als auch der Erhalt der kleinen eIF4E Variante mithilfe von Hormonzusätzen *in vitro* an Explantatkulturen untersucht.

### 5.4.1. Induktion der 23 kDa-Variante des eIF4E

Um die 23 kDa-Variante *in vitro* zu induzieren, wurden dem Explantatkultursystem auf Grundlage der in den Steroidhormon-Replacement-Versuchen gewonnenen Erkenntnisse die Hormone E<sub>2</sub> und P<sub>4</sub> zugesetzt. Als Substrate dienten endometriale Gewebe von Sauen nach OVX. Im Nativgewebe (K<sub>0</sub>) war nur die 25 kDa-Variante des eIF4E nachweisbar. Es wurde zwischen 4 h und 48 h kultiviert, um den Zeitraum der Induktion abzupassen. In Abbildung 12 ist exemplarisch die Kultivierung nach 4 h und 24 h dargestellt. Zu allen Kultivierungszeitpunkten war nur die 25 kDa-Variante feststellbar. Dies änderte sich auch nicht über längere Kultivierungszeiträume (Daten nicht gezeigt). Die 23 kDa-Variante konnte nicht induziert werden.

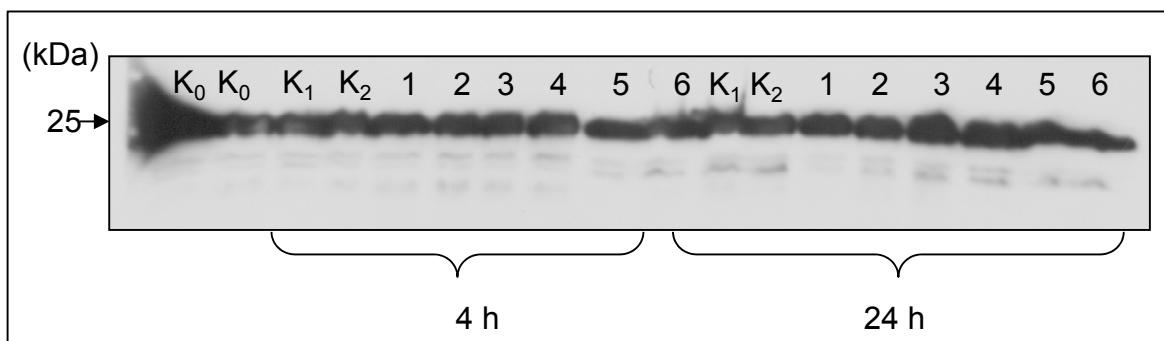


Abbildung 12: **Induktion der 23 kDa-Variante**

Dargestellt ist eine 13,5 % SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Detektion mittels des Antikörpers eIF4E eines OVX-Tieres. Die Kultivierungszeiten betragen 4 h und 24 h in RPMI Medium.

K<sub>0</sub> – Nativprobe, K<sub>1,2</sub> – Kontrolle ohne Zusätze, 1- E<sub>2</sub> 500 pg/ml, 2- E<sub>2</sub> 5 ng/ml, 3- P<sub>4</sub> 3 ng/ml, 4- P<sub>4</sub> 30 ng/ml, 5- E<sub>2</sub> 500 pg/ml + P<sub>4</sub> 3 ng/ml, 6- E<sub>2</sub> 500 pg/ml + P<sub>4</sub> 30 ng/ml

#### 5.4.2. Aufrechterhaltung der Expression der 23 kDa-Variante

Da eine Induktion der 23 kDa-Variante des eIF4E nicht erfolgreich war, wurde versucht die Expression der 23 kDa-Variante in Kultur zu erhalten. Es wurden Versuchstiere vom TT 15 eingesetzt, welche die 23 kDa-Variante aufwiesen. Das Medium wurde ebenfalls mit den Steroidhormonen E<sub>2</sub> und P<sub>4</sub> substituiert. Bereits nach 0,5 h Kultivierungszeit kam es zur Abnahme des Signals für die 23 kDa-Variante (Daten nicht gezeigt). Spätestens nach 24 h kam es mit wenigen Ausnahmen zum totalen Verlust der 23 kDa-Variante (Abbildung 13). Die 25 kDa-Variante des eIF4E dominierte in allen Kulturen.

Zur Unterstützung der Hormonwirkung wurde der Kultur deshalb Ca-Ionophor zugesetzt. CaCl<sub>2</sub> war im Protease Assay (siehe Punkt 5.4.1.) in der Lage, die Bildung der 23 kDa-Variante zu unterstützen. In der Kultur jedoch hatte der Zusatz von Ca-Ionophor keine Auswirkung auf den eIF4E. Als weiterer Zusatz wurde der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) eingesetzt, um den Differenzierungsgrad der Zellen zu erhalten. Auch hier konnte die 23 kDa-Variante nicht analysiert werden.

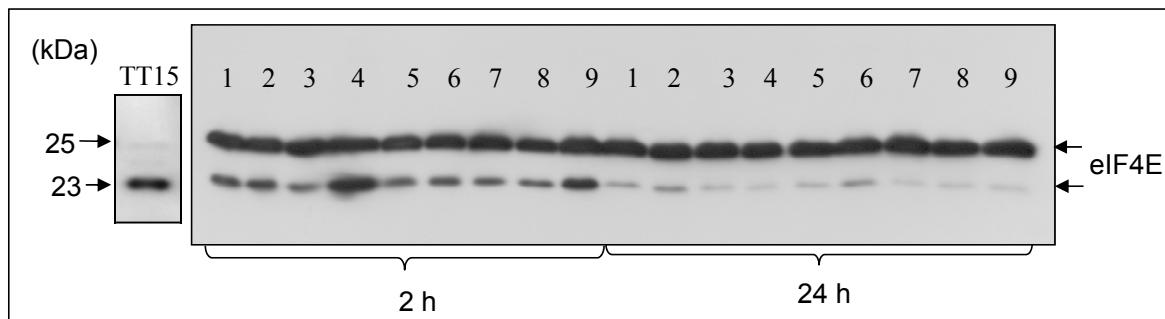


Abbildung 13: Einfluss von Steroidhormonen und EGF auf die Expression des eIF4E in Explantatkulturen (01.07.08)

Dargestellt ist eine 13,5 % SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Detektion mittels des Antikörpers gegen eIF4E eines TT 15-Tieres (Versuch vom 08.07.08). Zum Vergleich ist eine Nativprobe vom TT 15 dargestellt. Die Kultivierungszeiten betrugen 2 h und 24 h in RPMI Medium. Es ist eine Abnahme der Expression der 23 kDa Variante des eIF4E sichtbar. Die 25 kDa-Variante dominiert in allen Fällen.

1- Kontrolle, 2- E<sub>2</sub> 125 pg/ml + P<sub>4</sub> 30 ng/ml , 3- E<sub>2</sub> 800 pg/ml + P<sub>4</sub> 80 ng/ml , 4- Ca-Ionophor 20 ng/ml, 5- Ca-Ionophor 20 ng/ml + E<sub>2</sub> 125 pg/ml + P<sub>4</sub> 30 ng/ml, 6- Ca-Ionophor 20 ng/ml + E<sub>2</sub> 800 pg/ml + P<sub>4</sub> 80 ng/ml, 7- E<sub>2</sub> 125 pg/ml + P<sub>4</sub> 30 ng/ml + O<sub>2</sub>, 8- EGF 1 ng/ml, 9- EGF 1 ng/ml + E<sub>2</sub> 125 pg/ml + P<sub>4</sub> 30 ng/ml

#### 5.4.3. Einfluss der Kultivierung auf die Phosphorylierung von 4E-BP1

Durch eine Kultivierung der Gewebe konnte in den Versuchen zur Induktion immer eine Erhöhung der Phosphorylierung des 4E-BP1 im Vergleich zu den Nativgeweben beobachtet werden. Zeigte das Nativgewebe die  $\alpha$ - oder  $\alpha$ - und  $\beta$ -Banden, so waren es nach Kultur immer drei Banden ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Bereits nach 0,5 h begann dieser Anstieg der Phosphorylierung und war spätestens nach 48 h sehr stark ausgeprägt (Daten nicht gezeigt).

Um die Ursache des Anstiegs in der Phosphorylierung zu ergründen, wurden Versuchstiere gewählt, die eine Hypophosphorylierung im Nativgewebe aufwiesen. Es wurde ein Zusammenhang mit ITS, Hydrocortison und stickstoffreichen Aminosäuren der Medien vermutet. Daher wurde der Einfluss von Medien, die hinsichtlich ihrer Aminosäuren unterschiedlich zusammengesetzt waren, untersucht. Neben RPMI-1640 wurden auch die Minimalmedien MEM und DMEM untersucht. Auch der Einfluss von ITS und Hydrocortison wurde untersucht, wobei beim ITS bedingt durch das enthaltene Insulin eine erhöhte Phosphorylierung zu erwarten war.

In Abbildung 14 ist exemplarisch der Einfluss der Medien und ITS auf die Phosphorylierung des 4E-BP1 dargestellt. Im Frischgewebe ( $K_0$ ) sind die Banden  $\alpha$  und  $\beta$  vorhanden. Nach Kultivierung ist in allen Proben auch die  $\gamma$ -Bande nachweisbar und zwar unabhängig von der Behandlungsvariante. Es konnte keine Möglichkeit gefunden werden, diese erhöhte Phosphorylierung zu umgehen.

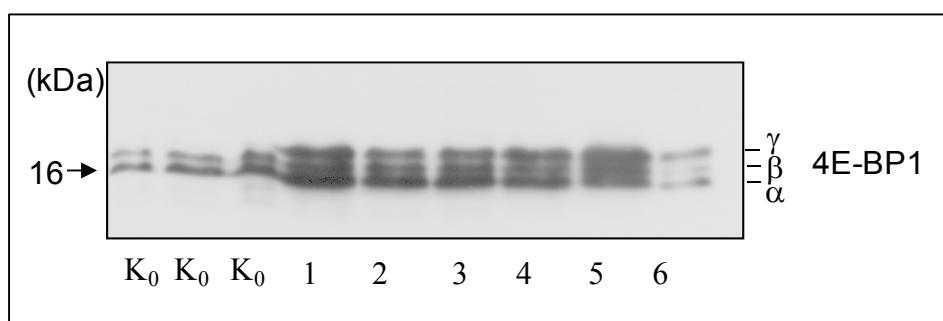


Abbildung 14: Einfluss der Kulturmedien auf die Phosphorylierung von 4E-BP1

Dargestellt ist eine 13,5 % SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Detektion mittels des Antikörpers gegen 4E-BP1 eines Tieres im Midzyklus (25.03.08). Die Kultivierungszeit betrug 48 h. In der Nativprobe waren jeweils nur die Banden  $\alpha$  und  $\beta$  zu beobachten. Bei Kultivierung trat immer eine dritte Bande ( $\gamma$ ) auf.

1- RPMI, 2- RPMI +ITS, 3- MEM, 4- DMEM + ITS, 5- DMEM, 6- DMEM + ITS

## **5.5. Untersuchungen auf mRNA Ebene**

Um zu untersuchen, ob die 23 kDa-eIF4E-Variante durch eine alternativ gespleißte mRNA kodiert wird, wurde die cDNA Sequenz des Faktors des Schweins bestimmt. Hierfür wurde Lebergewebe genutzt und die Primer aufgrund der hohen Homologie der kodierenden Region des eIF4E bei den Spezies Rind, Maus und Mensch vom Rind abgeleitet. Die erhaltene cDNA des Schweins war > 97 % homolog zur kodierenden Sequenz des Rindes und des Menschen. Es waren 16 Nukleotide different, was in zwei Fällen zu einem Austausch von Aminosäuren führte (Abbildung 15). So ist die Aminosäure 24 in der bovinen Sequenz Glycin, in der Spezies Schwein dagegen Serin. Die bovine Aminosäure 194 ist Glutamin und in der Spezies Schwein Asparaginsäure.

Abbildung 15: cDNA Sequenz Rind und Schwein

Dargestellt ist die Basen- und Aminosäuresequenz des 25 kDa-eIF4E des Rindes sowie Abweichungen für die Spezies Schwein (blau). Unterstrichen dargestellt sind die Sequenzen der Primer. Die beiden Stellen des Aminosäureaustauschs sind rot dargestellt.

Unter Verwendung der klonierten cDNA als Sonde wurde die eIF4E kodierende mRNA mittels Northern Blotting in Tieren nach OVX (im Zytosol nur die 25 kDa-eIF4E-Form) sowie am TT 15 (im Zytosol nur die 23 kDa-eIF4E-Variante) bestimmt (Abbildung 16A). Als Ladungskontrolle wurde eine Sonde gegen ACTB benutzt.

Als Ergebnis trat eine einfache dominante Bande von etwa 1,8 kb auf. Die mittels Northern-Blotting ermittelte Größe der mRNA im Gewebe von TT 15-Tieren stimmte mit der mRNA des prototypischen Faktors überein (Wollenhaupt et al. 2010).

Es konnten mittels RT-PCR cDNAs identischer Größe im Endometrium von Sauen vom TT 15 und nach OVX nachgewiesen werden (Abbildung 16B), deren Sequenz mit der der prototypischen eIF4E Form übereinstimmten. Diese Ergebnisse liefern keinen Hinweis dafür, dass die 23 kDa-eIF4E-Variante durch ein alternatives Gen oder eine Spleißvariante der 25 kDa-Form kodiert wird.

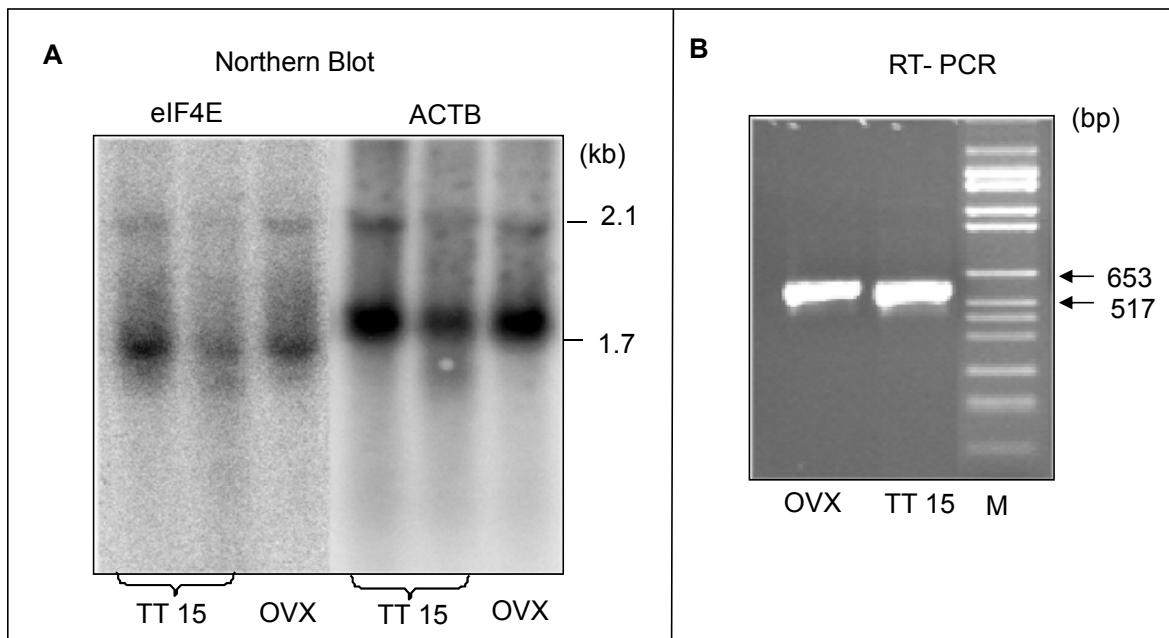


Abbildung 16: mRNA-Analyse

#### A) Northern Blot

Dargestellt ist ein Northern Blot mit Sonden gegen eIF4E sowie als Kontrolle Beta Aktin. Es war im Bereich von 1,8 kb nur eine dominante Bande des eIF4E zu beobachten.

#### B) RT PCR

Es konnten cDNAs identischer Größe in OVX- und TT 15-Tieren beobachtet werden.

## 5.6. Strukturelle und funktionelle Untersuchungen der 23 kDa-Variante des eIF4E

### 5.6.1. Epitope mapping

Endometriumzytosole von Tieren des TT 30 und TT 15 wurden mithilfe verschiedener eIF4E-Antikörper untersucht, die gegen verschiedene Epitope des eIF4E gerichtet waren. Sowohl mit dem Antikörper gegen das Gesamtprotein als auch mit dem Antikörper gegen den C-Terminus waren nach Immunoblotting beide Varianten des eIF4E analysierbar (Abbildung 17).

Mit dem Antikörper, der gegen den N-terminalen Bereich gerichtet war, konnte nur die prototypische Form beobachtet werden, woraus sich schließen lässt, dass der 23 kDa-Variante Aminosäuren im N-terminalen Bereich fehlen. Durch diese Untersuchung ist nicht klar definiert, welche Aminosäuren fehlen.

Der Einsatz des korrespondierenden „Blocking Peptids“ für die jeweiligen Antikörper zeigte ihre spezifische Bindungsfähigkeit.

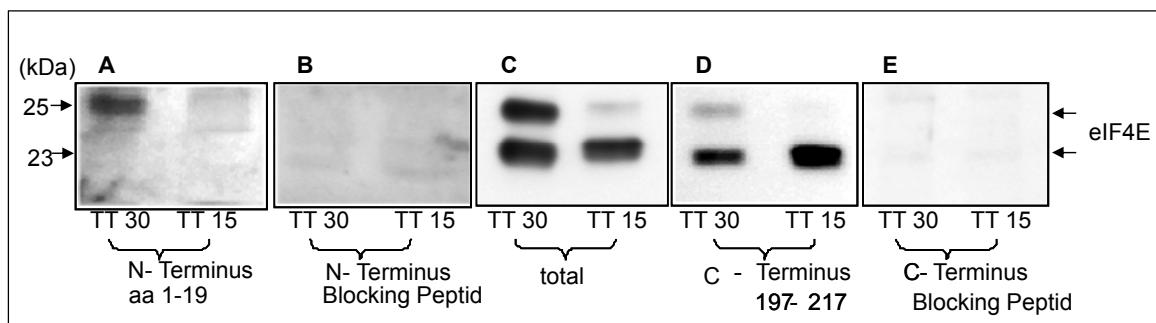


Abbildung 17: Nachweis des eIF4E mit verschiedenen Antikörpern

Dargestellt ist eine 13,5 % SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Detektion mittels des Antikörpers gegen eIF4E. Verwendet wurden Zytosole von TT 30 und TT 15 Tieren. Der Antikörper, der gegen das ganze Protein gerichtet war bzw. gegen den C-Terminus zeigte im Western Blot beide Varianten an. Der Antikörper gegen den N-terminalen Bereich zeigte nur die 25 kDa-Form.

### 5.6.2. Protease-Assay

Um zu prüfen, ob die 23 kDa-eIF4E-Variante aus der 25 kDa-eIF4E-Form durch proteolytische Spaltung gebildet wird, wurde ein In-vitro-Protease-Assay mit einem N-terminal mit Glutathiontransferase (GST) markierten eIF4E-Fusionsprotein (GST-eIF4E-Fusionsprotein) als externes Substrat durchgeführt (Abbildung 18). Dieses Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von 51 kDa beinhaltete die gesamte Sequenz des eIF4E-Proteins. Dieses Molekulargewicht ergibt sich aus dem 25 kDa-eIF4E und der 26 kDa-GST-Markierung. Es wurde Endometriumzytosol von OVX und TT 15 Tieren genutzt. Das Prozessing wurde mittels Western Blotting gegen eIF4E und GST analysiert.

Die Western Blot Analyse mit einem Antikörper gegen eIF4E zeigte, dass im OVX-Lysat keine Spaltung des rekombinanten eIF4E erfolgte. Im Lysat vom TT 15 dagegen nahm die Abundanz der 23 kDa-eIF4E-Form deutlich zu und die des GST-eIF4E-Fusionsproteins ab. Zusätzlich ließ sich mittels GST-Antikörper eine Bande bei 28 kDa nachweisen, deren Molekulargewicht sich aus der Summe der 26 kDa-GST-Markierung und dem abgespaltenen 2 kDa-eIF4E-Fragment errechnen lässt. Die Spaltung wird durch EDTA stark gehemmt, deutlich erkennbar an der Abnahme des Signals für die Bande mit dem Molekulargewicht 28 kDa. Zugabe von CaCl<sub>2</sub> zusätzlich zu EDTA führte zu einer deutlich sichtbaren Bande mit dem Molekulargewicht von 28 kDa. CaCl<sub>2</sub> führt folglich zur Überwindung der Inhibition des EDTA.

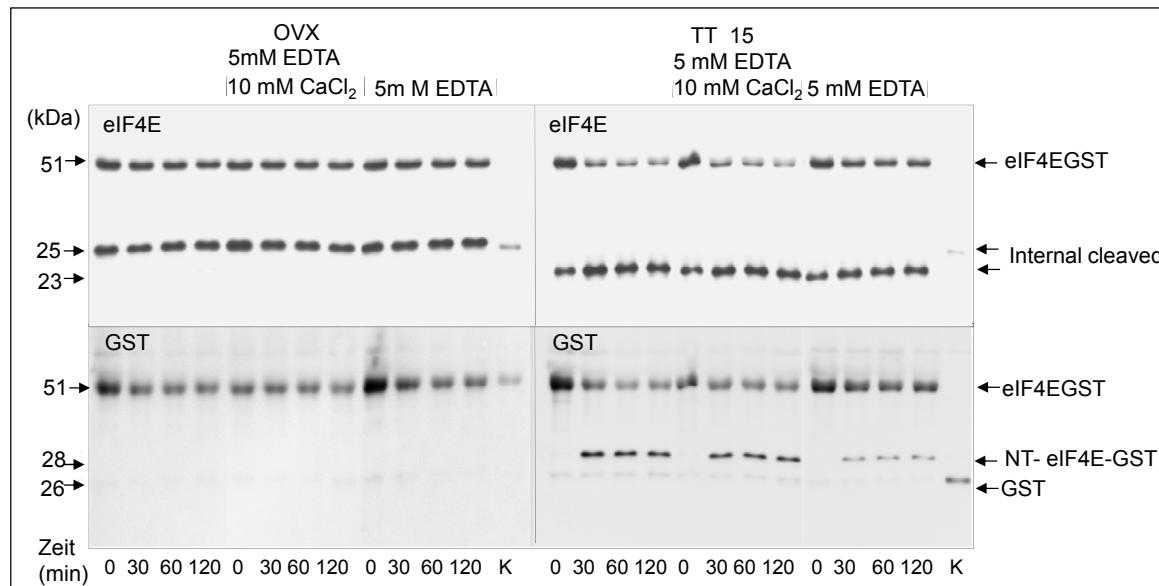


Abbildung 18: Protease-Assay

Dargestellt ist eine 13,5 % SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Detektion mittels der Antikörper gegen eIF4E und GST von Endometriumzytosolen von Tieren nach OVX sowie vom TT 15. Im OVX-Lysat erfolgte keine Spaltung des rekombinanten eIF4E. Im Lysat vom TT 15 nahm die Abundanz der 23 kDa-eIF4E-Variante zu und die des GST-eIF4E-Fusionsproteins ab. Zusätzlich ließ sich mittels GST Antikörper eine Bande bei 28 kDa nachweisen, deren Molekulargewicht sich aus der Summe der 26 kDa GST-Markierung und dem abgespaltenen 2 kDa-eIF4E-Fragment ergibt. Bei Zugabe von EDTA kommt es zu einer Abnahme des Signals bei 28 kDa. Bei gleichzeitiger Gabe von CaCl<sub>2</sub> und EDTA war ausschließlich die 28 kDa-Bande beobachtbar.

### 5.6.3. MALDI -TOF-TOF

Da es nicht möglich war, eine für die Analyse mittels Massenspektrometrie ausreichende Mengen der 23 kDa-eIF4E-Form aus nativen Proben anzureichern, wurde ein In-vitro-Protease-Assay mit großen Mengen des GST-eIF4E-Fusionsproteins durchgeführt. Dadurch konnten mit Coomassie Blau anfärbbare Fragmente für die Lokalisation der Spaltstelle erhalten werden. Die Coomassiefärbung (Abbildung 19A) zeigt das externe Substrat, das rekombinante GST-eIF4E-Fusionsprotein – hier mit Protein 1 bezeichnet und zwei spezifische Banden (2 und 3), die nur im Protease-Assay nach Zusatz des Lysats vom TT 15 gefunden wurden. Die Identität dieser Banden wurde mittels Western-Blot-Analyse (Abbildung 20B) gesichert. Die Ergebnisse zeigten, dass es sich bei Protein 1 um das Fusionsprotein handelt, bei Protein 2 um die GST-Markierung, verbunden mit dem abgespaltenen N-terminalen Fragment des eIF4E, und bei Protein 3 um die verkürzte eIF4E-Variante. Die aus dem Gel ausgeschnittenen und tryptisch verdauten Proteine der Banden wurden mittels MALDI-TOF-TOF hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz analysiert (Abbildung 19C). Die Aminosäuresequenz von Protein 1 (GST-eIF4E-Fusionsprotein) konnte fast vollständig bestimmt werden. Bande 2 wurde als GST-cloning-Vektor identifiziert. Das N-terminale eIF4E-Fragment konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. In Protein 3, der verkürzten Variante des eIF4E, konnte durch Analyse der Aminosäuresequenz das Fehlen der Aminosäuren 1 bis 21 belegt werden. Daraus ergibt sich das Molekulargewicht von 23 kDa für die verkürzte eIF4E-Variante.

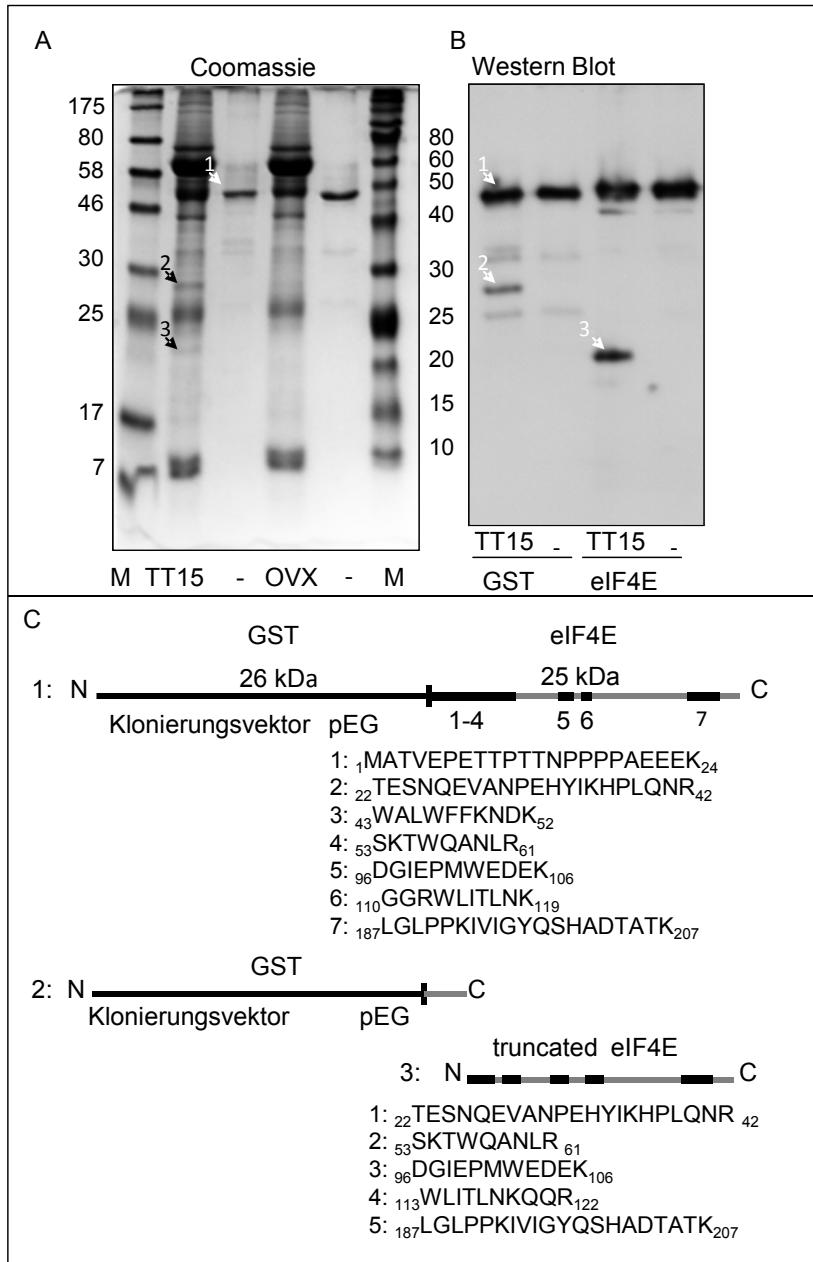


Abbildung 19: MALDI-TOF-TOF

**A) Coomassie Färbung nach Gelektrophorese**

Dargestellt ist die Proteintrennung mittels 13,5 % SDS-PAGE. 1 µg des externen Substrates wurde in verdünnten Endometriumlysaten von OVX- und TT 15-Tieren inkubiert und die Spaltprodukte mit Coomassie Färbung (Bande 2 und 3) sichtbar gemacht. Als Kontrolle wurde das GST-eIF4E-Fusionsprotein (Bande 1) ohne Lysatzusatz inkubiert. M=Molekulargewichtsmarker,

**B) Western Blot**

Dargestellt ist die Western-Blot-Detektion mittels der Antikörper gegen eIF4E, sowie GST des Tieres vom TT 15

**C) Fragmente nach trypsischem Verdau und Analyse der Aminosäuresequenz mittels MALDI-TOF-TOF**

Dargestellt sind die Proteine 1-3, welche aus dem Gel ausgeschnitten wurden und mit Hilfe von Trypsin verdaut wurden. Von den Fragmenten wurde die Aminosäuresequenz bestimmt. Im Fusionsprotein (1) waren fast alle Aminosäuren des eIF4E nachweisbar. Beim Fragment 2 handelte es sich um die GST-Markierung. Das Fragment 3 war die verkürzte Variante des eIF4E. Hier konnte das Fehlen der Aminosäuren 1-21 nachgewiesen werden.

### 5.6.4. Funktionelle Analyse der eIF4E-Varianten

#### 5.6.4.1. Bindungsverhalten der eIF4E-Varianten an die Cap-Struktur

Um die Cap-Bindungseigenschaften der eIF4E-Varianten zu analysieren, wurden Präzipitationen mit  $m^7GTP$ -Sepharose, eine quervernetzte Agarose, die Eigenschaften der Cap-Struktur aufweist, durchgeführt. Für die Bindung der eIF4E-Varianten an die  $m^7GTP$  Sepharose wurden Endometriumzytosole von OVX-Tieren sowie von ZT 13-, TT 13- und TT-30 Tieren analysiert. Die Western-Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen eIF4E (Abbildung 20) zeigte in den gebundenen Fraktionen (g) für die 25 kDa- sowie für die 23 kDa-Variante ein deutliches Signal. Demzufolge sind sowohl die prototypische eIF4E-Form mit einem Molekulargewicht von 25 kDa als auch die kleinere, 23 kDa-Variante des eIF4E, mit  $m^7GTP$ -Sepharose präzipitierbar.

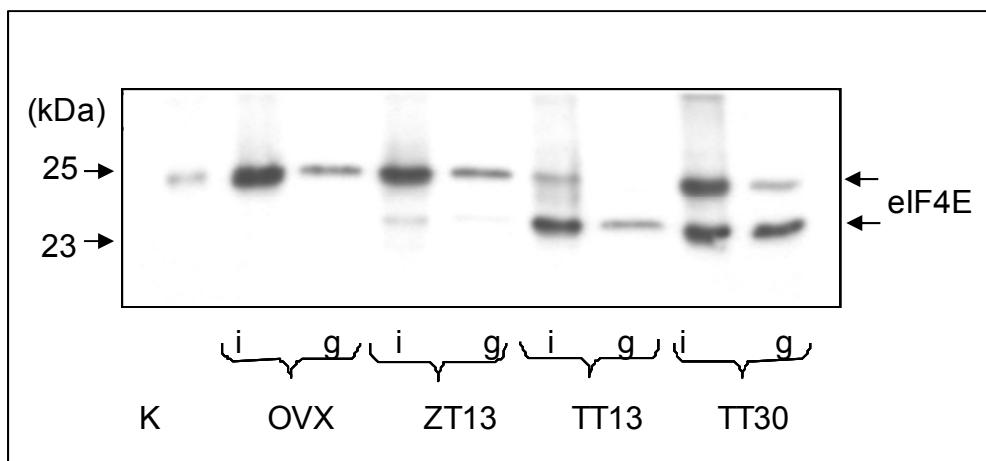


Abbildung 20: **Interaktion der eIF4E Varianten mit  $m^7GTP$ -Sepharose**

Dargestellt ist eine 13,5 % SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Detektion mittels des Antikörpers gegen eIF4E. Verwendet wurden Endometriumzytosole von Tieren nach OVX sowie vom ZT 13, TT 13 und TT 30. Im Ergebnis werden beide Varianten an die  $m^7GTP$ -Sepharose gebunden. i = Input, g = gebundene Fraktion

#### 5.6.4.2. Interaktion der eIF4E-Varianten mit dem Repressorprotein 4E-BP1

Die Interaktion der beiden eIF4E-Varianten mit dem Repressorprotein 4E-BP1 wurde sowohl in einem Immunopräzipitationsexperiment als auch in einem Protein-Interaktionsassay mit „Ni-NTA Magnetic Agarose Beads“ und rekombinantem „His-tagged“ 4E-BP1 analysiert.

Die Immunopräzipitation mit anti-4E-BP1 wurde mit Versuchstieren vom TT 15, die ausschließlich die 23 kDa-Variante exprimierten, und vom TT 30, die beide Varianten zeigten, durchgeführt (Abbildung 21). Die nachfolgende Westernblot-Analyse für eIF4E zeigte, dass nur die 25 kDa-eIF4E-Form mit dem 4E-BP1 co-präzipitierte, erkennbar an den Banden der gebundenen Fraktion (g). Die 23 kDa-Variante war in den gebundenen Fraktionen nicht beobachtbar.

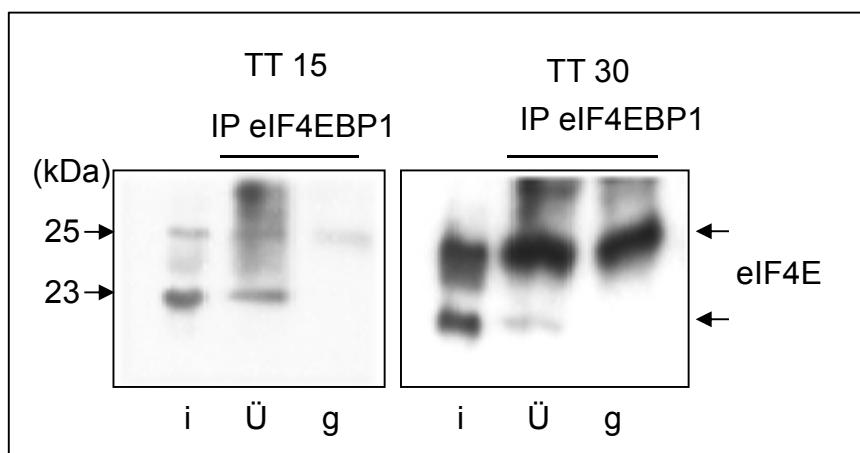


Abbildung 21: **Immunopräzipitation**

Dargestellt ist eine 13,5 % SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Detektion mittels des Antikörpers gegen eIF4E eines TT 15 und TT 30 Tieres. Nur die 25 kDa Form des eIF4E co-präzipitierte mit 4E-BP1. i = input, Ü = Überstand, g = gebundene Fraktion

Im Protein-Interaktionsassay (Abbildung 22) wurden die rekombinanten „His-tagged“ 4E-BP1 Beads (4E-BP1-(His)<sub>6</sub> Beads) mit Endometriumlysaten nach OVX, die ausschließlich die 25 kDa-Variante, und vom TT 15, die nur die 23 kDa-Variante des eIF4E aufwiesen, inkubiert. Die eIF4E Bindung an die 4E-BP1-(His)<sub>6</sub> Beads wurde mittels Westernblot Analyse bestimmt, wobei neben dem eIF4E Antikörper auch ein Antikörper gegen His-4E-BP1 verwendet wurde. Im Lysat des OVX-Tieres ist bei Anwesenheit der des 4E-BP1-

(His)<sub>6</sub> in der gebundenen Fraktion (g) eine ausgeprägte Bande beobachtbar. Im Lysat des Tieres vom TT 15 ist diese sehr viel schwächer nachweisbar.

Daraus folgt, dass die 25 kDa-Variante des eIF4E stark an das 4E-BP1 bindet und die Bindung der kleinen Variante stark reduziert ist.

Beide Analysemethoden zeigten, dass die verkürzte 23 kDa-eIF4E-Variante, sehr schwach oder gar nicht mit dem Repressorprotein 4E-BP1 interagiert.

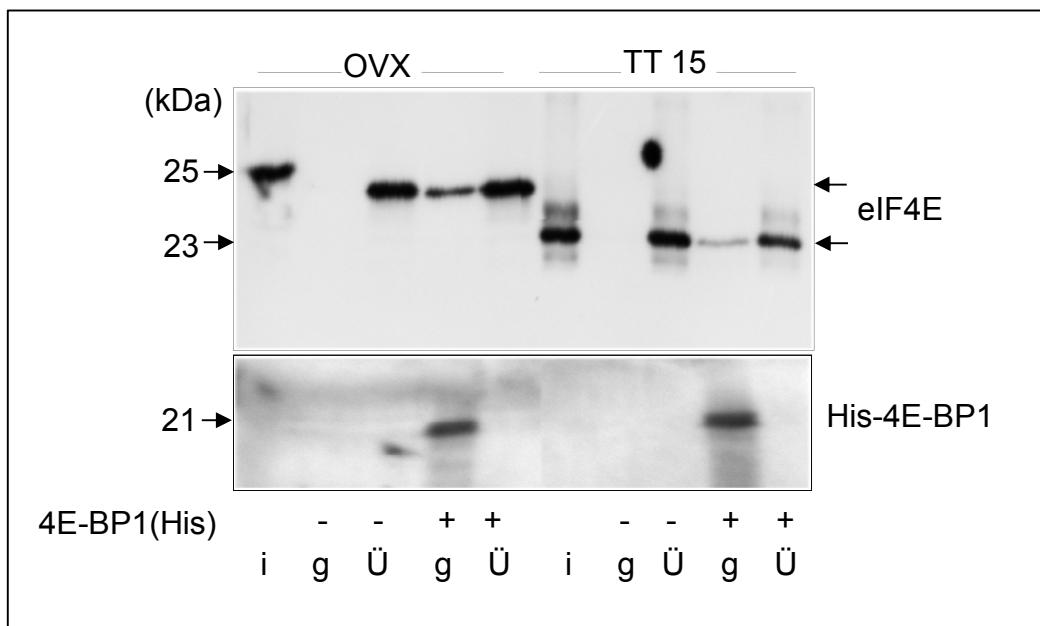


Abbildung 22: Protein-Interaktionsassay mit „Ni-NTA Magnetic Agarose Beads“ und rekombinantem „His-tagged“ 4E-BP1

Die gesättigten Beads wurden mit Endometriumlysaten von OVX-Tieren und Tieren vom TT 15 inkubiert und die eIF4E Bindung wurde mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. Die Daten zeigen auch, dass die His-4E-BP1 Bindung an die Beads in beiden Experimenten gleich war. Dargestellt ist der input (i), die gebundene Fraktion (g) und der Überstand (Ü) von gesättigten Beads mit (+) oder ohne (-) His-tagged 4E-BP1.

## 5.7. Speziesvergleiche Rind und Maus

Um zu analysieren, ob die 23 kDa-Variante auch in anderen Spezies im Zeitraum der Implantation auftritt, wurde Endometriumgewebe verschiedener Spezies untersucht, deren Plazentationsformen sich vom Schwein unterscheiden. Es wurden die Spezies Rind mit der *Placenta epitheliochorials cotyledonaria adeciduata* und die Spezies Maus mit der *Placenta haemochorialis* ausgewählt.

### 5.7.1. Speziesvergleich Rind

Es wurde das Endometriumgewebe von Rindern am ZT 10, ZT 19, TT 18, und TT 19 im Rind untersucht (Abbildung 23). Das Gewebe wurde getrennt nach Karunkeln (K) und umgebendem Endometriumgewebe (E), sowie nach trächtigen und nicht-trächtigen Uterushörnern analysiert. In allen untersuchten Proben des Endometriums konnte nur die prototypische 25 kDa-Variante des eIF4E detektiert werden. Untersuchungen des Repressorproteins 4E-BP1 ergaben, dass die Phosphorylierung und Abundanz im Untersuchungszeitraum nicht differierte. Es wurden zwei Banden ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) ermittelt, die unterschiedlich phosphorylierte Formen des Proteins darstellen.

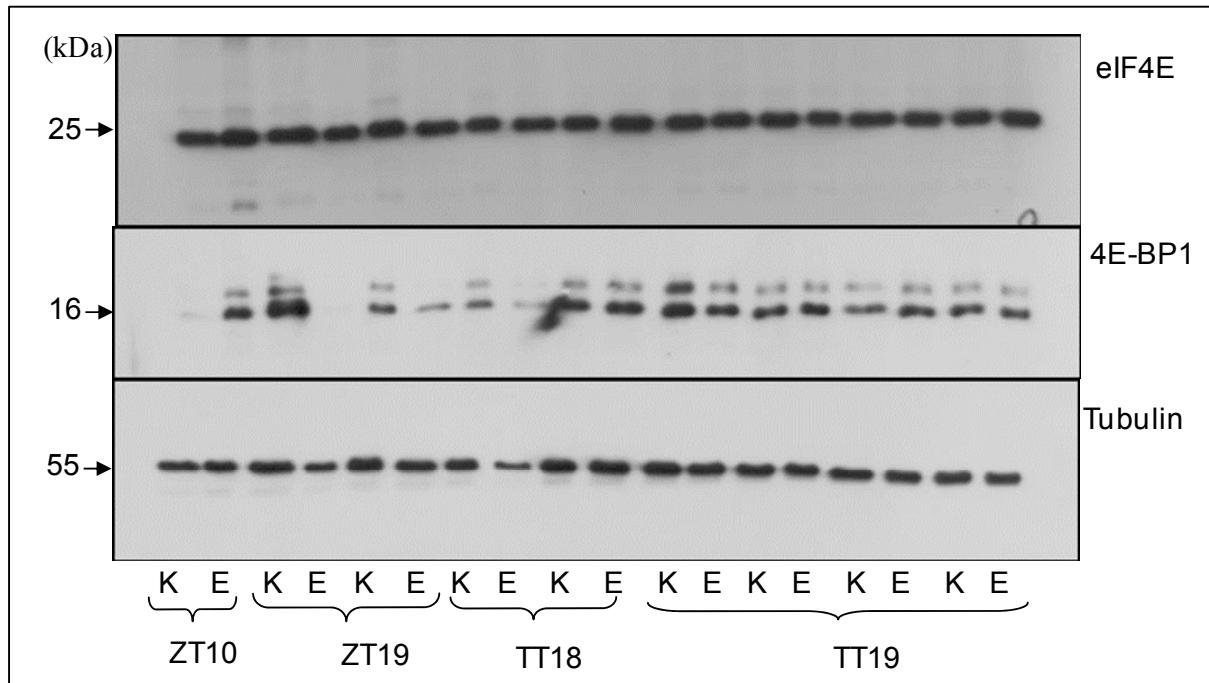


Abbildung 23: **Speziesvergleich Rind**

Dargestellt ist eine 13,5 % SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Detektion mittels der Antikörper eIF4E, 4E-BP1 und Tubulin von Rindern des ZT 10, 19, sowie der TT 18 und 19. Es war nur 25 kDa-Variante des eIF4E nachweisbar. Das Repressorprotein 4E-BP1 zeigte in allen untersuchten Zytosolen 2 Banden. K= Karunkel, E= umgebendes Endometrium

### 5.7.2. Speziesvergleich Maus

In der Spezies Maus wurden Tiere 72 h nach der Insemination untersucht, sowie Tiere an den TT 5 und TT 16 (Abbildung 24). Auch hier konnte nur die prototypische 25 kDa-Variante des eIF4E detektiert werden. Das Repressorprotein 4E-BP1 zeigte 72 h nach Insemination die  $\alpha$ -Bande. Ab dem TT 5 waren die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Bande zu beobachten. Es liegt eine Hyperphosphorylierung des 4E-BP1 vor.

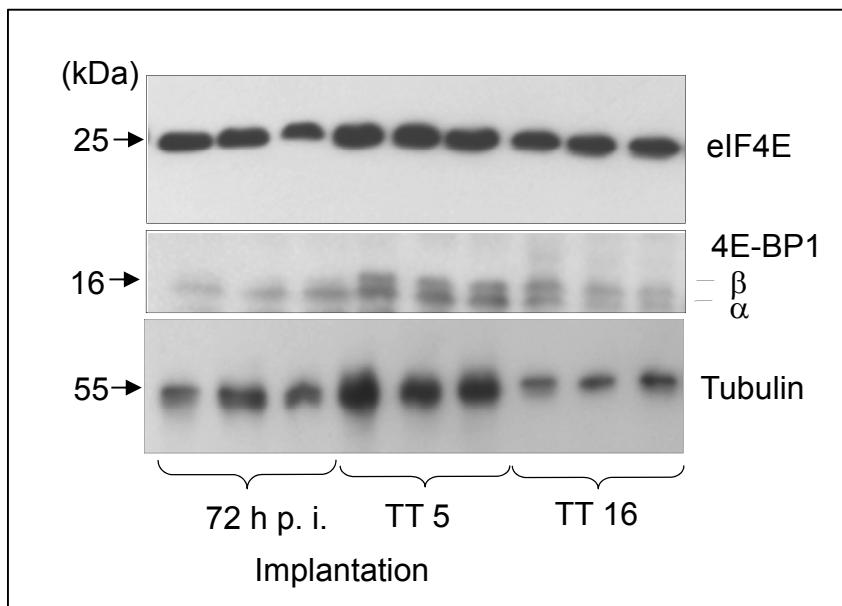


Abbildung 24: **Speziesvergleich Maus**

Dargestellt ist eine 13,5 % SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Detektion mittels der Antikörper eIF4E, 4E-BP1 und Tubulin von Mäusen 72 h nach Insemination sowie an den TT 5 und TT 16. Es war nur die 25 kDa-Variante des eIF4E nachweisbar. Das Repressorprotein 4E-BP1 zeigte 72 h p. i. die  $\alpha$ -Bande, am TT 5 und TT 16 die Banden  $\alpha$  und  $\beta$ .

## 6. Diskussion

### 6.1. Das mRNA-Cap-Bindungsprotein eIF4E in vivo

#### 6.1.1. Die 23 kDa-Variante des eIF4E und ihre Entstehung durch hormonelle Einflüsse

Die Implantation stellt ein Schlüsselereignis für den weiteren erfolgreichen Trächtigkeitsverlauf dar (Cencić & Bonnardiere 2002). Um die Implantation der Blastozyste zu ermöglichen, proliferiert und differenziert das Endometriumgewebe. Diese Prozesse stehen in engem Zusammenhang mit der Proteinbiosynthese, welche auch auf Translationsebene reguliert wird. Durch Veränderungen im Steroidhormonhaushalt kann es über Signaltransduktionskaskaden zu einer veränderten Phosphorylierung der Proteine führen, die an der Translation maßgeblich beteiligt sind. Solche Proteine sind das Cap-Bindungsprotein eIF4E, welches als Rate-begrenzender Faktor für die Translationsinitiation angesehen wird (Schepers & Proud 2002).

Ziel der Arbeit war es daher, eIF4E im Zeitraum der Implantation im Endometrium des Schweins genauer zu charakterisieren. Es wurde eine veränderte Expression, sowie Phosphorylierung des eIF4E durch Modulation der Signaltransduktionskaskaden durch die veränderte Steroidhormonproduktion erwartet. Es ist bekannt, dass 17-β Östradiol (Dry et al. 2003, Wollenhaupt et al. 2007) und Progesteron (Migliaccio et al. 1998) Signaltransduktionswege der MAPK und Akt modulieren und so zu einer veränderten Phosphorylierung von eIF4E und/oder seines Repressorproteins 4E-BP1 führen können (Sonenberg & Gingras 1998).

Expressionsanalysen zeigten jedoch überraschenderweise eine verkürzte Variante des eIF4E, die zuvor noch nicht beschrieben wurde. Der prototypische eIF4E besitzt ein Molekulargewicht von 25 kDa und wurde erstmals von Sonenberg et al. (1978) beschrieben. Das Molekulargewicht der neuen Variante des eIF4E wurde mit 23 kDa ermittelt (siehe Punkt 6.1.3.).

Die 23 kDa-Variante zeigt eine räumlich und zeitlich begrenzte Expression. Sie konnte in keinem anderen untersuchten Gewebe des Schweins nachgewiesen werden. Die 23 kDa-Variante trat nur im Endometriumgewebe und zwar explizit im Luminalepithel auf, welches in engem Kontakt zum Embryo steht. Ein Zusammenhang mit embryonalen Signalen bei der Bildung dieser Variante war daher zu vermuten.

---

Durch Untersuchungen an Implantationsstellen und Nicht-Implantationsstellen (umgebendes Endometriumgewebe) sowie an trächtigen und nicht-trächtigen Uterushörnern (unilaterale Trächtigkeit) konnte der Zusammenhang mit dem Vorhandensein von Embryonen bestätigt werden.

Vermutet wird, dass vor allem vom Embryo am TT 13 und 15 abgegebenes  $17\beta$ -Östradiol, welches im Schwein eine zentrale Rolle bei der Erkennung der Trächtigkeit einnimmt (Anderson et al. 1993, Ying et al. 2000, Spencer et al. 2004) hier eine Schlüsselfunktion hat. Aber auch maternales Progesteron, welches für die Aufrechterhaltung der Trächtigkeit von Bedeutung ist (Cencic & Bonnardiere 2002, Spencer et al. 2004), muss zur Entstehung der 23 kDa-Variante beitragen. Dies konnte durch Steroidhormon-Replacement-Versuche belegt werden. Nur die Applikation beider Hormone hatte eine starke Expression der 23 kDa-Variante zur Folge. Verabreichung nur eines der Steroidhormone führte zu keiner nennenswerten Expression der 23 kDa-Variante. Dies zeigt die Abhängigkeit der Expression der 23 kDa-Variante vom hormonellen Status des Endometriums und von lokal abgegebenen embryonalen Signalen.

Am TT 30 tritt die 25 kDa-Variante in beträchtlichen Mengen auf, also während einer Periode in der es zur Bildung von Östradiol durch den Embryo kommt (Robertson & King 1974, Robertson et al. 1985). Das ausgeschüttete Östradiol wird in dieser Phase jedoch vom Endometrium zum inaktiven Östronsulfat umgewandelt. Das periphere Östronsulfatniveau steigt ab dem TT 17-18 an und bleibt während des weiteren Trächtigkeitsverlaufes erhöht (Schneider & Brüssow 2006). Eine weitere Möglichkeit könnte eine Desensibilisierung der Endometriumzellen durch ein anhaltend hohes Östrogenniveau sein, was zu einer Deaktivierung des eIF4E-prozessierenden Systems führt.

#### 6.1.2. mRNA-Analytik und proteolytische Spaltung des 25 kDa-eIF4E

Die Analyse der cDNA-Sequenz zeigte, dass die 25 kDa-Variante des eIF4E im Endometrium das funktionale Äquivalent zum prototypischen eIF4E darstellt. Die erhaltene cDNA wies eine 97 %ige Homologie zur kodierenden Sequenz des Rindes und des Menschen auf. Dabei waren 16 Nukleotide different, was zu einem Austausch von zwei Aminosäuren führte. Zum einen ist Glycin-24 im Schwein durch ein Serin ersetzt und die Glutamin-194 durch Asparaginsäure. Diese Aminosäuren ähneln sich chemisch und

---

daher ist davon auszugehen, dass nur geringe strukturelle und möglicherweise funktionelle Unterschiede auftreten.

Durch Northern Blot-Analysen waren RNAs gleicher Größe bei Versuchstieren vom TT 15 und nach OVX zu beobachten. Die beobachtete Größe von 1,8 kb stimmt mit der Größe der mRNA des eIF4E-1 kodierenden 25 kDa-Protein überein, welches in Mäusegeweben gefunden wurde (Wollenhaupt et al. 2010).

Unter Verwendung von RNA, extrahiert aus dem Endometrium von Sauen am TT 15 und nach OVX wurden cDNAs identischer Größe generiert, die in ihrer Sequenz mit der prototypischen eIF4E Form übereinstimmten. Deletionen von internen Exons hätten die Amplifikation kürzerer cDNA-Segmente zur Folge. Diese konnten jedoch nicht beobachtet werden.

Die Ergebnisse legen nahe, dass die 23 kDa-Variante des eIF4E weder durch eine alternativ gespleißte mRNA noch durch ein alternatives Gen kodiert ist. Daher wurde die Möglichkeit einer proteolytischen Spaltung des 25 kDa-eIF4E untersucht.

Da sich die Expression der prototypischen Form bei Auftreten der verkürzten Form abschwächt, ist eine Entstehung der 23 kDa-Variante aus der 25 kDa-Variante wahrscheinlich und konnte in einem eigens entwickelten Protease-Assay belegt werden.

In diesem Assay wurde die Spaltung eines N-terminalen GST-markierten-eIF4E Fusionsproteins durch Zytosol von Versuchstieren vom TT 15 und nach OVX untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass in Endometriumzytosolen von Tieren am TT 15 auch die Spaltung des N-terminalen GST-eIF4E-Fusionsproteins nachweisbar war. Diese Spaltung konnte durch Zugabe von EDTA inhibiert werden. Unter Zusatz von CaCl<sub>2</sub> konnte die Proteolyse des Fusionsproteins befördert oder die Inhibition durch EDTA überwunden werden. Die Spaltung des Fusionsproteins ist nicht mit Zytosol von Tieren nach OVX möglich. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei dem für die Spaltung verantwortlichen Enzym um eine Calcium-abhängige, noch unbekannte Protease handeln muss.

Proteolytische Spaltungen von Initiationsfaktoren in spezifische Fragmente unter Beeinflussung von deren Funktion wurden in verschiedenen Studien beobachtet (Morley et al. 2005). Beispielsweise wird eIF4G durch virale Proteasen gespalten, wodurch die Cap-abhängige Translation des Wirtes inhibiert wird. Außerdem werden eIF4G, eIF3S1 und eIF4B in der prä-apoptotischen Phase von Caspase 3 gespalten (Bushell et al. 2000, Coldwell et al. 2004). Ein Prozessing des eIF4E in einem physiologischen Zusammenhang wurde bisher jedoch noch nicht beschrieben.

### 6.1.3. MALDI-TOF-TOF

Analysen der 23 kDa-Variante des eIF4E mittels Antikörpern gegen eIF4E ergaben, dass die 25 kDa-eIF4E-Form mit allen gegen den eIF4E gerichteten Antikörpern bestimmt werden konnte. Der Antikörper, der gegen den N-Terminus des eIF4E gerichtet war, erkannte die kleine eIF4E-Variante nicht. Folglich liegt eine Verkürzung der 23 kDa-Variante des eIF4E im N-terminalen Bereich vor. Die spezifische Spaltungsstelle sollte mittels Proteinsequenzierung oder massenspektrometrischer Analysen bestimmt werden.

Für die Sequenzierung der 23 kDa-Variante war zunächst der Edmann-Abbau vorgesehen. Diese Methode scheiterte jedoch, da das N-terminale-Ende der 23 kDa-Variante möglicherweise blockiert war. Deshalb wurde eine Massenspektrometrie (MALDI-TOF-TOF) durchgeführt. Ein Problem bei der Anwendung der MALDI-TOF-TOF-Analyse stellte die Anreicherung des Proteins in ausreichender Menge und Reinheit dar. Versuche zur Anreicherung der 23 kDa-eIF4E-Variante aus Nativproben des Endometriumlysats mittels Methoden wie einer herkömmlichen Immunopräzipitation oder einer Fraktionierung mittels einer semi-präparativen isoelektrischen Fokussierung („Mini Rotofor“ Anlage) und anschließender Auf trennung der Proteine auf einem Gel erbrachten nicht die gewünschte Reinheit des Proteins. Verschiedene Proteine des endometrialen Lysats überdeckten die 23 kDa-Variante des eIF4E. Für die MALDI-TOF-TOF-Analyse wurde daher die verkürzte 23 kDa-Variante des eIF4E im Protease-Assay generiert. Eine Anreicherung der Variante war erst möglich, nachdem im Protease-Assay im Zuge der Spaltung des GST-eIF4E-Fusionsproteins viermal Gewebelysat hinzugegeben wurde. Die so erhaltenen Proteine konnten aus einem mit Coomassie Brilliant Blau gefärbten Gel ausgeschnitten und analysiert werden.

Die Ergebnisse der MALDI-TOF-TOF Analyse zeigten, dass in der prozessierten eIF4E-Variante die Aminosäuren 1-21 nicht nachweisbar waren. Das N-proximale-eIF4E-Fragment konnte nicht detektiert werden. Eine Sequenzierung des 23 kDa-eIF4E war ab der Aminosäure 22 möglich. Daraus lässt sich die Verkürzung des prototypischen eIF4E um 2 kDa auf 23 kDa ableiten. Die proteolytische Schnittstelle ist demnach zwischen Lysin (Lys)-21 und Thr-22 lokalisiert. Aber Lys-21 ist auch die proteolytische Schnittstelle für Trypsin, welches während der Analyse verwendet worden ist. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Schnittstelle 2-3 Aminosäuren vorher im N-terminalen Bereich liegt. Da die exakte Spaltungsstelle nicht bekannt ist, ist es schwierig die Protease,

die für die Spaltung des eIF4E verantwortlich ist zu charakterisieren. So ist beispielsweise nicht klar, ob eine spezifische Sequenz oder eher eine Tertiärstruktur die Schnittstelle darstellt (Wollenhaupt et al. 2010).

#### 6.1.4. Strukturelle und funktionelle Eigenschaften der beiden eIF4E-Varianten

Die 25 kDa- und die 23 kDa-Varianten teilen einige Eigenschaften, unterscheiden sich aber in anderen.

Da beide Varianten mit dem Antikörper eIF4E Ser-209 nachgewiesen werden konnten, so ist die 23 kDa-Variante des eIF4E wie die prototypische Form am Ser-209 phosphoryliert. Die Bedeutung dieser Phosphorylierung des eIF4E wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Laut Minich et al. (1994) kann sie zu einer Erhöhung der Translationsraten führen. McKendrick et al. (2001) dagegen stellten fest, dass die Phosphorylierung am Ser-209 nicht unbedingt von Bedeutung für den Ablauf der Translation ist.

In Untersuchungen der Arbeitsgruppe Minich et al. (1994) ging man davon aus, dass die erhöhte Phosphorylierung des eIF4E auch zu einer verbesserten Bindung an die Cap-Struktur führt. Neuere Untersuchungen belegen jedoch, dass die Phosphorylierung am Ser-209 von eIF4E die Affinität zur 5'-Cap-Struktur reduziert (Flynn & Proud 1995, Joshi et al. 1995). Dadurch kommt es zu einer schnelleren Ablösung des eIF4E von der Cap-Struktur der mRNA und die Rekrutierung neuer mRNAs wird stimuliert. Dies führt zu einer Steigerung der Translationsrate (Scheper et al. 2002).

Bindungsstudien mittels  $m^7GTP$ -Sepharose zeigten, dass beide eIF4E-Varianten mit dieser Substanz präzipitierbar waren. Dieses ähnliche Bindungsverhalten ist ein Hinweis für ein ähnliches Bindungsverhalten an die Cap-Struktur der mRNA. Aminosäuresubstitutionsstudien zeigten, dass bestimmte konservierte Aminosäuren für die mRNA-Cap-Bindungsfähigkeit des eIF4E notwendig sind (Joshi et al. 2004). Unverzichtbar für diese Bindung sind die Aminosäuren: Tryptophan (Trp)-56, Trp-102, Glutaminsäure(Glu)-103 und Trp-166. Das Vorhandensein dieser Aminosäuren in der kleinen eIF4E-Variante, nachgewiesen durch die Massenspektrometrie-Analysen, unterstützt deren Bindung an die  $m^7GTP$ -Sepharose.

Analysen zur Bindungsfähigkeit der beiden Varianten des eIF4E an das Repressorprotein 4E-BP1 ergaben, dass die 25 kDa-Variante in der Lage ist, an 4E-BP1 zu binden, die 23 kDa-Variante dagegen in ihrer Bindungsdynamik verändert ist.

---

Die für die 4E-BP1 Bindung wichtigen Aminosäuren Histidin (His)-37, Prolin (Pro)-38, Valin (Val)-69, Trp-73, Leucin (Leu)-131, Glu-132 und Leu-135 (Joshi et al. 2004) konnten mittels Massenspektrometrie in der verkürzten eIF4E Form nachgewiesen werden. Folglich muss das Fehlen der 21 Aminosäuren im N-terminalen Bereich des 23 kDa-eIF4E eine Ursache für die veränderte Bindungsdynamik mit dem 4E-BP1 sein.

Marcotrigiano et al. (1997) zeigte, dass Deletion von 33 Aminosäuren im N-terminal Bereich zu einem Protein führt, welches die gleiche Affinität zur Cap-Struktur hat wie das Gesamtprotein.

Strukturanalysen aus der Arbeitsgruppe Tomoo et al. (2002, 2003) zeigten später, dass der N-terminalen Bereich des eIF4E von 1-40 Aminosäuren eine hohe Flexibilität und geringe Strukturierung im Vergleich zum restlichen Protein aufweist. Es wurde vermutet, dass diese Region wichtig für die biologische Funktion des eIF4E ist. Weitere Untersuchungen ergaben, dass der N-Terminus des eIF4E die Bindung zum 4E-BP1 in Abhängigkeit vom Interaktionsstatus der Proteine moduliert (verstärkt/abschwächt) (Tomoo et al. 2006).

„Surface plasmon resonance“ Analysen (SPR) zum kinetischen Status, bei denen N-terminal 33 Aminosäuren verkürztes eIF4E mit dem intakten Faktor verglichen wurde, ergaben eine ungefähr 2-fach erhöhte Assoziationsratenkonstante und eine 20-fach verminderte Dissoziationsratenkonstante. Im Gegensatz dazu wurde in Steady-state-Fluoreszenzanalysen eine 4-fach verminderte Assoziationskonstante gefunden. Tomoo et al. (2006) diskutieren positive und negative Einflüsse der N-terminalen Region von eIF4E auf die 4E-BP1-Bindung. Die Arbeitsgruppe beschreibt die N-terminalen Region als einen Repressor für Assoziation/Dissoziation mit 4E-BP1. Sie stabilisiert den Komplex unter Gleichgewichtsbedingungen und blockiert die 4E-BP1-Bindung in einem nicht-stationären kinetischen Status. Aktuelle SPR-Analysen zeigten, dass ein binärer Komplex bestehend aus einem um 16 Aminosäuren verkürzten eIF4E und m<sup>7</sup>GTP verglichen mit eIF4E der Gesamtlänge eine mehr oder weniger gleiche Bindungsaffinität für 4E-BP1 besitzt (Abiko et al. 2007). Im Gegensatz dazu zeigte ein um 26 Aminosäuren verkürzter Komplex eine reduzierte Assoziationsrate von 4E-BP1, wohingegen bei dem um 33 Aminosäuren verkürzten eIF4E die Dissoziationsrate sank. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Deletionen von mehr als 16 und weniger als 26 Aminosäuren die Affinität des m<sup>7</sup>GTP/eIF4E Komplexes für 4E-BP1 reduzieren. Dies korrespondiert mit den in unserer Arbeitsgruppe erhaltenen Ergebnissen, die zeigen, dass die um 21 Aminosäuren verkürzte 23 kDa-Variante des eIF4E eine deutlich herabgesetzte Bindungsaffinität zu 4E-BP1 besitzt.

In Bezug auf die Bindungsfähigkeit des eIF4E an den eIF4G beobachteten Gross et al. (2003) an Hefen, dass Deletionen des N-Terminus des eIF4E bis zu 20 Aminosäuren keine verringerte Affinität zum eIF4G zur Folge haben. Zu einer signifikanten Verringerung der Affinität kam es erst bei Deletionen bis zu 35 Aminosäuren. Die Bindung des 23 kDa-eIF4E an eIF4G sollte somit möglich sein.

## 6.2. 4E-BP1 *in vivo*

Mit dem Auftreten der 23 kDa-Variante und dem Abnehmen der prototypischen Variante des eIF4E beim Schwein verminderte sich die Expression und der Phosphorylierungsstatus des eIF4E-Repressorproteins 4E-BP1 – von der hyperphosphorylierten Form zur hypophosphorylierten Form. Durch die verringerte Phosphorylierung waren nur noch die Banden  $\alpha$  und  $\beta$  analysierbar (Elleederova et al. 2005). Die  $\gamma$ -Bande war nicht mehr nachweisbar.

Das Auftreten des hypophosphorylierten 4E-BP1 mit Beginn der Trächtigkeit sowie sein Vorhandensein in den trächtigen Uterushörnern lassen auf eine Hormonabhängigkeit schließen.

Die hyperphosphorylierte Form des 4E-BP1, wie sie in unseren Untersuchungen am TT 30 auftritt, dissoziiert vom eIF4E und ermöglicht die Ausbildung des eIF4F Initiationskomplexes (Richter & Sonenberg 2005).

Die hypophosphorylierte Form des 4E-BP1 dagegen, wie sie mit Beginn der Trächtigkeit zu finden ist, ist in der Lage, an den prototypischen eIF4E zu binden und die Translationsinitiation zu inhibieren (Gingras et al. 2001). Die Bindungsfähigkeit des 4E-BP1 zur verkürzten 23 kDa-Variante dagegen ist reduziert (siehe Punkt 6.1.4.). Dadurch kann die Translationssuppression überwunden werden und die Translation von spezifischen mRNAs ist möglich, selbst in Situationen, in denen Signalkaskaden, welche 4E-BP1 phosphorylieren nicht aktiv sind und 4E-BP1 in hypophosphorylierter, also biologisch aktiver Form aktiv ist (siehe 6.5.).

Tee & Proud (2002) beobachteten Dephosphorylierung und Spaltung des 4E-BP1 durch Caspase während der Apoptose, die im Schwein in der Phase der Implantation jedoch nicht beobachtet wurde.

### 6.3. eIF4E *in vitro*

Die *in vivo* beobachteten Ereignisse bezüglich der eIF4E-Prozessierung sollten in In-vitro-Experimenten nachvollzogen werden. Es wurden Explantate kultiviert, um mögliche Wechselwirkungen der Zelltypen und somit deren Funktionalität aufrechtzuerhalten. Um in der Kultur ähnliche Bedingungen wie *in vivo* zu erzeugen, wurden zunächst die Hormone Östradiol und Progesteron zugesetzt, welche in den In-vivo-Experimenten (Steroidhormon-Replacement) zur Bildung der 23 kDa-Variante des eIF4E führten.

Grundlage für die zu testenden Hormonkonzentrationen (sowie Zusätze wie Hydrocortison) waren die Versuche mit endometrialen Explantatkulturen zur Induktion des KGF-7 der Arbeitsgruppe Ka et al. (2001).

Da alleinige Gabe der Hormone E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub> nicht zum gewünschten Ergebnis führte, wurden noch weitere Substanzen der Kultur zugesetzt: EGF und Calcium-Ionophor.

EGF ist eine mitogen wirkende Substanz. Cai et al. (1990) kamen zu dem Ergebnis, dass es im Uterus der Maus im Luminal- und Glandulärepetithel zu einer Ausschüttung von EGF unter Östrogeneinfluss kommt. Es spielt sowohl in der Zelldifferenzierung und Angiogenese eine Rolle (Wollenhaupt et al. 2004) als auch bei der Implantation, Entwicklung und Zelldifferenzierung (Andronowska et al. 2006). Erhöhte EGF mRNA-Mengen finden sich im Ovidukt und im Endometriumgewebe zwischen den ZT 6-12, sowie ab dem TT 6 (Wollenhaupt et al. 1999). Kleinstein et al. (1993) kommen zu dem Ergebnis, dass EGF bei Kaninchen und Menschen in der Prä-implantationsperiode eine große Rolle spielt. Aus diesen Gründen wurde auch ein Zusatz des EGF zum Medium getestet, um die hormonvermittelnde Wirkung zu unterstützen und den Differenzierungsgrad sowie die Vitalität der Zellen positiv zu beeinflussen. Es konnte jedoch die Expression der 23 kDa-eIF4E-Variante nicht aufrechterhalten werden.

Bereits Geisert et al. (1982) beobachtete, dass es im Zuge der Östrogenstimulation am Beginn der Trächtigkeit zu einer vermehrten Ausschüttung von Calcium in den Uterus kommt. Dieses ausgeschüttete Calcium wird von den Zellen wieder resorbiert und könnte die Aktivität der eIF4E prozessierenden Protease stimulieren. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass im Protease-Assay die Zugabe von CaCl<sub>2</sub> die Proteolyse des rekombinanten eIF4E in TT 15-Proben beförderte. Aus diesem Grund wurde Calcium-Ionophor, welches durch die Zellmembran besser aufgenommen wird als CaCl<sub>2</sub>, zu den Explantatkulturen zugesetzt. Es konnte aber die Expression der kleinen eIF4E-Variante

nicht aufrechterhalten werden. Es kam spätestens nach 2 h zur deutlichen Abschwächung des Signals für den 23 kDa-eIF4E am TT 15.

Überdies konnte auch der hypophosphorylierte Zustand des 4E-BP1 in Kultur nicht aufrechterhalten werden.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die eIF4E-prozessierende-Protease auf der Ebene der Transkription reguliert wird und ihre Expression unter den gewählten Kulturbedingungen nicht neu induziert oder aufrechterhalten werden kann.

#### **6.4. Weitere Faktoren des Translationsinitiationskomplexes**

Es ist denkbar, dass auch andere Proteine des Initiationskomplexes von einer Veränderung im Zeitraum der Implantation betroffen sind, wie eIF4A, eIF4G oder PABP. So wird beispielsweise eIF4G in der prä-apoptotischen Phase von Caspase 3 gespalten oder PABP während der Apoptose abgebaut (Marissen et al. 2004). Mit der Proteolyse weiterer Bindungspartner des eIF4E würde somit die Proteinsynthese gehemmt, wenn nicht gar unterbunden werden. Apoptotische Vorgänge im Schwein wurden von Okano et al. (2007) im Zyklusverlauf zwar beschrieben, treten aber mit Beginn der Trächtigkeit nicht mehr auf. Neuere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen keine generelle Proteolyse oder Apoptose während dieses Zeitraums. Die Caspase-3-Aktivität, welche in der prä-apoptotischen Phase ansteigt, blieb in Tieren nach OVX und am TT 15 unverändert.

Aktuelle Analysen ergaben, dass eIF4A und PABP keiner Proteolyse unterlagen (Wollenhaupt et al. 2010). Diese Untersuchungen zeigen aber, dass eIF4G am TT 15 ebenfalls proteolytisch gespalten wurde. Es entstanden mehrere, N-terminal verkürzte, stabile Fragmente mit einer molekularen Masse zwischen 100-160 kDa. In weiterführenden Untersuchungen konnte belegt werden, dass die Bindung einiger verkürzte eIF4G-Fragmente an den eIF4E noch möglich ist, aber die Bindung von PABP an den eIF4G nicht. Der eIF4F-Komplex kann somit entstehen. Die Bildung des „Closed loop Modells“ dagegen ist beeinträchtigt (Wollenhaupt et al. 2010). Ein zellfreier Translations-Assay zeigte, dass die Translationsrate in Tieren vom TT 15 um 40 % gegenüber OVX-Tieren gesenkt war (Wollenhaupt et al. 2010).

## 6.5. Mögliche biologische Funktion der 23 kDa-Variante

Untersuchungen zur Funktionalität der 23 kDa-Variante des eIF4E ergaben, dass die Bindungsfähigkeit an die Cap-Struktur der mRNA gegeben ist, während die Bindungsfähigkeit an das Repressorprotein 4E-BP1 herabgesetzt ist.

Die prototypische 25 kDa-Variante des eIF4E dagegen bindet an das hypophosphorylierte Repressorprotein 4E-BP1 (Gingras et al. 1999b). Die Folge ist, dass die Bindungsstelle für eIF4G am eIF4E besetzt ist und der Prä-initiationskomplex nicht gebildet werden kann. Dadurch kommt es zur Repression der Translation (Abbildung 25A).

Bei der 23 kDa-Variante ist trotz Hypophosphorylierung des 4E-BP1 die Entstehung des Translationsinitiationskomplexes durch Bindung des eIF4E an den eIF4G möglich und die Proteinsynthese kann ablaufen (Abbildung 25B). Andererseits kann eine Reduktion der Translationsraten durch eine unterbleibende „Closed loop“-Bildung der mRNA vermutet werden, denn durch die Spaltung des eIF4G sind die Bindungsstellen für eIF4E und PABP entkoppelt.

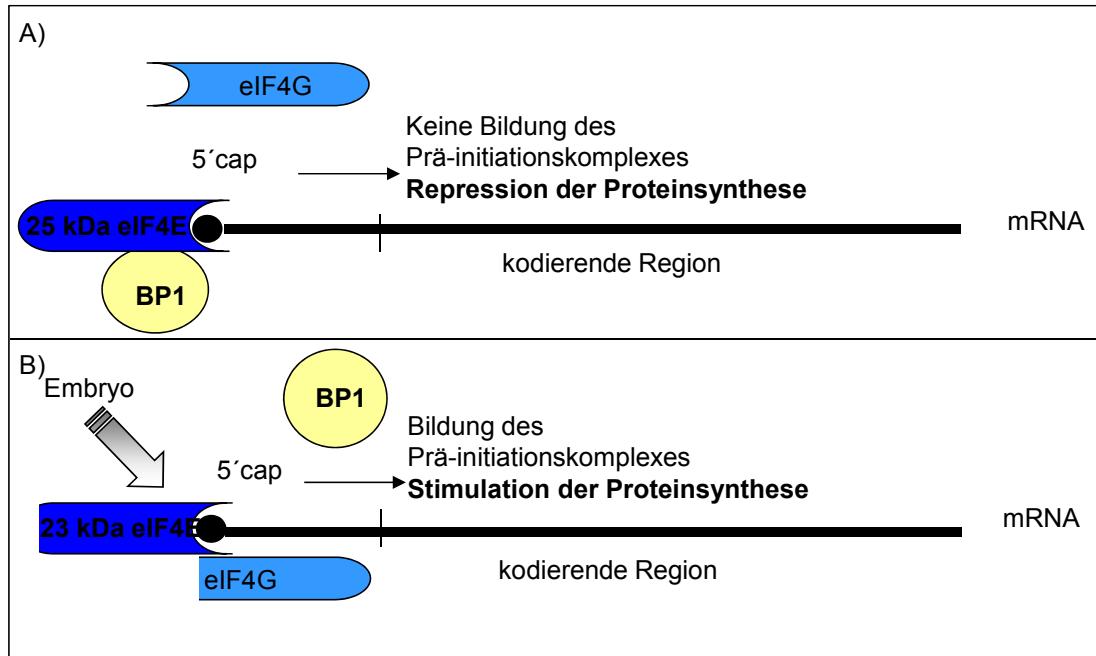


Abbildung 25: Hypothese zur Funktionsweise der 23 kDa-Variante des eIF4E

A) Die prototypische 25 kDa-Variante des eIF4E bindet an das hypophosphorylierte Repressorprotein 4E-BP1. Die Folge ist die Repression der Translation durch Verhinderung der Entstehung des Translationsinitiationskomplexes.

B) Die verkürzte 23 kDa-Variante des eIF4E bindet nicht oder nur sehr schwach an das hypophosphorylierte Repressorprotein 4E-BP1. In der Folge ist die Entstehung des Translationsinitiationskomplexes möglich und die Proteinsynthese kann ablaufen. Dies ist möglicherweise notwendig, um die Proteinsynthese im Zeitraum der Implantation besonders zu regulieren.

Diese proteolytischen Vorgänge scheinen einen alternativen Regelmechanismus der Translationsinitiation im Zeitraum der Implantation zu schaffen.

Es könnten dadurch spezifische, für die Implantation der Blastozyste erforderliche mRNAs bevorzugt translatiert werden. Es ist anzunehmen, dass dies für die nicht-invasive Implantation im Schwein notwendig ist. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass eine solche Variante nicht in Spezies mit invasiver Plazentation wie der Maus auftritt. Auch Schweineembryonen wirken invasiv, wenn sie aus dem Uterus entfernt und beispielsweise in der Bauchhöhle platziert werden (Samuel & Perry 1972). Diese Invasivität wird durch die Expression von Proteasen verursacht (Salamonsen 1999). Schweineembryonen sind beispielsweise in der Lage, Metalloproteinase 2 und 9 zu bilden (Menino et al. 1997). Die Arbeitsgruppe Menino et al. (1997) entdeckte auch, dass erst die Expression von Proteaseinhibitoren, beispielsweise MMP-1, -2, -3, die Invasivität der Embryonen verhindert. Reed et al. (1998) wiesen die Expression des Proteaseinhibitors SLP1 im Endometrium trächtiger Sauen an den TT 16-25 nach und Hettinger et al. (2001) den Proteaseinhibitor Bikunin an den TT 15-18. Die Expression dieser Proteaseinhibitoren

könnte erst dadurch ermöglicht werden, dass die Translationsrepression, ausgelöst durch das hypophosphorylierte 4E-BP1, und durch das Auftreten der 23 kDa-Variante des eIF4E überwunden werden kann.

Das strikte zeitliche und lokale begrenzte Auftreten der 23 kDa-Variante legt nahe, dass sie als Gewebe-spezifischer Translationsinitiationsfaktor oder als Gewebe-spezifischer Modifikator für die eIF4E-Aktivität im Zeitraum der Implantation fungieren könnte. Embryonale Steroidhormonsignale sind so in der Lage, über Aktivierung eines proteolytischen Systems, welches die Faktoren der Translationsinitiation als Ziel hat, die maternale Proteinbiosynthese zu beeinflussen und zu regulieren.

## 6.6. Speziesvergleich Rind und Maus

Um zu prüfen, ob ein Zusammenhang zwischen der eIF4E Prozessierung im Endometrium und dem Typ der Implantation besteht, wurden die Spezies Rind, welche einen ähnlich oberflächlichen Plazentationstyp (*Placenta epitheliochorialis cotyledonaria*) wie das Schwein besitzt und die Maus mit einem völlig anderen Plazentationstyp (*Placenta haemochorialis*) vergleichend analysiert.

Es zeigte sich, dass bei beiden untersuchten Vergleichsspezies jeweils nur die prototypische Variante des eIF4E im Zyklus sowie im Trächtigkeitsverlauf auftrat (Wollenhaupt et al. 2011). Weiterhin differierten die Abundanz und Phosphorylierung des eIF4E-Repressorproteins 4E-BP1 beim Rind und der Maus im Vergleich zum Schwein. Während diese beim Schwein im Zeitraum der Implantation abfielen, sank weder die Abundanz noch die Phosphorylierung des 4E-BP1 beim Rind. Bei der Maus wurde im Gegensatz zum Schwein eine hyperphosphorylierte Form des 4E-BP1 mit Beginn der Trächtigkeit beobachtet. Diese Form bindet nicht an den eIF4E und führt somit nicht zur Repression der Translation.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Translationsinitiation bei Rind und Maus im Vergleich zum Schwein unterschiedlich reguliert wird. So folgt diese beim Rind und der Maus dem bekannten Mechanismus der eIF4F-Komplexbildung und wird durch unterschiedliche Phosphorylierung des Repressorproteins 4E-BP1 reguliert. Beim Schwein jedoch ist die Bindung der verkürzten eIF4E-Form an das hypophosphorylierte 4E-BP1 reduziert und die Translation kann, möglicherweise für spezifische Proteine, initiiert werden (siehe

Abschnitt 4.5). Es ist zu vermuten, dass diese veränderte Regulation für die nicht-invasive Implantation beim Schwein von Bedeutung ist.

Untersuchungen an anderen Schweinerassen, wie dem ungarischen Mangaliza-Schwein, ergaben hinsichtlich der eIF4E- und 4E-BP1-Verteilung das gleiche Muster wie bei der deutschen Landrasse (unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe).

## 6.7. Forschungsbedarf

Die Protease, die für die Entstehung der 23 kDa-Variante des eIF4E verantwortlich ist, konnte bisher noch nicht näher charakterisiert werden. Möglicherweise könnte eine Fraktionierung des Zelllysats mithilfe eines Ionenaustauschers vorgenommen werden, um anschließend zu analysieren, welche Fraktion proteolytisch aktiv ist. Aber auch eine präparative Gelektrophorese wäre denkbar.

Durch neue Ergebnisse der Arbeitsgruppe Wollenhaupt et al. (2010) wurde die Proteolyse des eIF4G beobachtet. Es handelt sich dabei nicht um dieselbe Protease. Es wäre interessant, auch diese Protease näher zu charakterisieren sowie die entstandenen Fragmente des eIF4G hinsichtlich ihrer proteolytischen Schnittstellen und genauen Längen zu analysieren.

Von ganz grundlegender Bedeutung ist natürlich auch die Identifizierung der mRNAs, die dem neuartigen Regulationsmechanismus im Zeitraum der Implantation unterliegen.

Während die vorliegenden Ergebnisse sich auf die 23 kDa-Variante des eIF4E konzentrieren, könnten weiterführende Versuche den Faktor 4E-BP1 ins Zentrum rücken. Versuche zur Zelltrennung könnten zeigen, ob das Luminalepithel wie im Falle des eIF4E Bildungsort des hypophosphorylierten 4E-BP1 ist. In einem In-vitro-Protease-Assay könnte, analog zum Assay mit eIF4E, die Aktivität von Endometriumzytosolen mit einem rekombinannten 4E-BP1 als externem Substrat untersucht werden.

## 7. Zusammenfassung

Mit Beginn der Trächtigkeit tritt im Endometrium des Schweins eine neue Variante des eIF4E auf, dessen Molekulargewicht sich mit 23 kDa von der prototypischen Variante mit 25 kDa unterscheidet. Beide Varianten können am Ser-209 phosphoryliert vorliegen. Das Repressorprotein 4E-BP1 war im gleichen Zeitraum dephosphoryliert. Die Expression der 23 kDa-eIF4E-Variante konnte an den Implantationsstellen, in den trächtigen Hörnern des Uterus und nur im Luminalepithel nachgewiesen werden. Durch das räumlich und zeitlich begrenzte Auftreten dieser Variante wurde vermutet, dass maternales Progesteron und embryonales Östradiol für das Auftreten verantwortlich sind. Dies konnte *in vivo* in Steroidhormon-Replacement-Experimenten belegt werden. Nur nach Applikation beider Steroidhormone wird die Bildung der 23 kDa-Variante des eIF4E induziert.

Die Ergebnisse der mRNA-Analyse zeigten, dass die 23 kDa-Variante des eIF4E weder durch eine alternativ gespleißte mRNA, noch durch ein alternatives Gen kodiert ist.

Die Spaltung auf Proteinebene konnte in einem Protease Assay nachvollzogen werden und belegt, dass Zytosole des Endometriums von Tieren am TT 15 in der Lage waren ein N-terminales GST-eIF4E-Fusionsprotein zu spalten, Zytosole nach OVX jedoch nicht. Zugestztes EDTA hemmte den proteolytischen Prozess, wohingegen Calcium ihn beförderte und die Hemmung durch EDTA aufhob. Es wird eine Calcium-abhängige Protease vermutet, die noch nicht näher charakterisiert werden konnte. Durch Strukturanalysen der 23 kDa-Variante des eIF4E konnte eine Verkürzung im N-terminalen Bereich um die Aminosäuren 1-21 belegt werden.

Die Bindungsfähigkeit der 23 kDa-Variante an die Cap-Struktur der mRNA scheint gegeben, wohingegen die Bindungsfähigkeit an das Repressorprotein 4E-BP1 reduziert ist. Die genaue Funktion der neuen 23 kDa-Variante bei der Implantation ist noch unklar, abgeleitet von den erzieltem Ergebnissen wurde folgende Hypothese aufgestellt: Da die kleine eIF4E Variante, nur schwach an das Repressorprotein 4E-BP1 jedoch an die Cap-Struktur bindet, kann die Translation mit ihr aufrechterhalten werden. Es ist daher zu vermuten, dass die Translationsinitiation im Endometrium des Schweins im Bereich der Implantationsstelle different reguliert wird. Möglicherweise wird dadurch die Translation für spezifische Proteine (beispielsweise Proteaseinhibitoren), die für die Umwandlung des Endometriums in Vorbereitung auf die Anheftung der Blastozyste von Bedeutung sind, aufrechterhalten.

## 9. Literaturverzeichnis

ABIKO F, TOMOO K, MIZUNO A, MORINO S, IMATAKA H, ISHIDA T, (2007): Binding preference of eIF4E for 4E-binding protein isoforms and function of eIF4E N-terminal flexible region for interaction, studied by SPR analysis, Biochem Biophys Res Comm, **355**, 667-672

ANDERSON LH, CHRISTENSON RK, FORD SP. (1993): Investigations into the control of litter size in swine II. comparisons of morphological and functional embryonic diversity between chinese and american breeds, J Anim Sci, **71**, 1566-1571

ANDRONOWSKA A, POSTEK A, DOBOSZYN SKA T. (2006): Epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor immunoreactivity in the endothelial cells of the uterine artery and its branches during different stages of the estrous cycle in the pig, Pol J Vet Sci, **9(3)**, 165-170

BALL DK, MOUSSAD EEDA, RAGEH MAE, KEMPER SA, BRIGSTOCK DR. (2003): Establishment of a recombinant expression system for connective tissue growth factor (CTGF) that models CTGF processing in utero, Reprod, **125**, 271-284

BAZER, FW. (1992): Mediators of maternal recognition of pregnancy in mammals, Proc Soc Exp Biol Med, **199**, 373-384

BAZER FW, SPENCER TE, OTT TL. (1998): Endocrinology of the transition from recurring estrous cycles to establishment of pregnancy in subprimate mammals, In: Bazer, F.W. (eds), The endocrinology of pregnancy, Humana Press, Inc., Totowa, N.J.,1-34

BAVISTER BD. (1988): role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro. Theriogenol, **29**, 143-153

BAZER FW, BURGHARDT RC, JOHNSON GA, SPENCER TE, WU G. (2008): Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways, Reprod Biol, **8 (3)**, 179-211

BAZER FW, SPENCER TE, JOHNSON GA, BURGHARDT RC. (2009): Comparative aspects of implantation, *Reprod*, **138**, 195-209

BENNETT WM, CONNACHER AA, SCRIMGEOUR CM. (1990): The effect of amino acid infusion on leg protein turnover assessed by L-[<sup>15</sup>N]phenylalanine and [1-<sup>13</sup>C]leucine exchange. *Eur. J. Clin. Invest.* **20**, 412-420

BHOOLA KD, FIGURROA CD, WORTHY K. (1992): Bioregulatory role of the kallikrein-kinin system in the normal pituitary gland and its tumours, *Pharmacol Rev*, **127 (6)**, 481-484

BONNEAU AM, SONENBERG N. (1987): Involvement of the 24 kDa cap-binding protein in regulation of protein synthesis in mitosis, *J. Biol. Chem.*, **262**, 11134-11139

BOWEN JA, BURGHARDT CB. (2000): Cellular mechanisms of implantation in domestic farm animals, *Cell Devel Biol*, **11**, 93-104

BRAILEANU GT, HU J, MIRANDO MA. (2000): Directional secretion of prostaglandin F<sub>2α</sub> by polarized luminal epithelial cells from pig endometrium, *Prostaglandin Other Lipidid Mediat*, **6 (4-6)**, 167-174

BRIGSTOCK DR, HEAP RB, BARKER PJ, BROWN KD. (1990): Purification and characterization of heparin-binding growth factors from porcine uterus, *Biochem J*, **266**, 273-282

BROWN EJ, SCHREIBER SL. (1996): A signalling pathway to translational control, *Cell*, **86**, 517-520

BRÜSSOW KP. (1985): Über die Verteilung der Eizellen im Eileiter von Jungsaenbach Ovulationssynchronisation, *Mh Vet Med*, **40**, 264-268

BUSHELL M, WOOD W, CLEMENS MJ, MORLEY SJ. (2000): Changes in integrity and association of eukaryotic protein synthesis initiation factors during apoptosis, *Eur J Biochem*, **267(4)**, 1083-1091

BUTLER WR, CALAMAN JJ, BEAM SW. (1996): Plasma and urea milk nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle, *J Anim Sci*, **74(4)**, 858-865

CAI L, ZHANG J, DUAN E. (2003): Dynamic distribution of epidermal growth factor during mouse embryo peri-implantation, *Cytokine*, **23 (6)**, 170-178

CAO Q, RICHTER JD. (2002): Dissolution of the maskin-eIF4E complex by cytoplasmatic polyadenylation and poly(A)-binding proteins controls cyclin B1 mRNA translation and oocyte maturation, *Embo J*, **21**, 3852-3862

CARSON DC, BAGCHI I, DEY SK, ENDERS AC, FAZLEBAS AT, LESSEY BA, YOSHINAGA K. (2000): Embryo implantation, *Devel Bio*, **233**, 217-237

CENCIĆ A, LA BONNARDIERE C. (2002): Trophoblastic interferon-gamma: current knowledge and possible role(s) in early pig pregnancy, *Vet Res*, **3382**, 139-157

CENCIĆ A, GUILLOMOT M, KOREN S, LA BONNARDIERE C. (2003): Trophoblastic interferons: do they modulate uterine cellular markers at the time of conceptus attachment in the pig?, *Placenta*, **24 (8-9)**, 862-869

CHEN JR, CHENG JG, SHATZER T, SEWELL L, HERNANDEZ L, STEWART CL. (2000): Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis, *Endocrin*, **141 (12)**, 4365-4372

COLDWELL MJ, HASHEMZADEH-BONEHI L, HINTON TM, MORLEY SJ, PAIN VM. (2004): Expression of fragments of translation initiation factor eIF4GI reveals a nuclear localisation signal within the N-terminal apoptotic cleavage fragment N-FAG. *J Cell Sci*, **15**, 2545-2555

CRAIG AW, HAGHIGHAT A, YU AT, SONENBERG N. (1998): Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation, *Nature*, **392(6675)**, 520-523

DRY MC, LEBLANC V, SHOONER C, ASSELIN E. (2003) Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17 $\beta$ -estradiol in the rat uterus during estrous cycle, Reprod Biol Endocrinol, **1**, 1-47

DEY SK, LIM K, SANJOY KD, REESE J, PARIA BC, DAIKOKU T, WANG H. (2004): Molecular cues to implantation, Endocrine Reviews, **25(3)**, 341-373

ELLEDEROVA Z, KOVAROVA H, MELO-STERZA F, LIVINGSTONE M, TOMEK W, KUBELKA M. (2005): Suppression of translation during in vitro maturation of pig oocytes despite enhanced formation of cap-binding protein complex eIF4F and 4E-BP1 hyperphosphorylation, Mol Reprod Devel, **73**, 68-76

FADDEN P, HAYSTED TAJ, LAWRENCE JC. (1997): Identification of phosphorylation sites in the translational regulator, PHAS-I that are controlled by insulin and rapamycin in rat adipocytes, J Biol Chem, **272**, 10240-10247

FAZLEBAS AT, BAZER FW, ROBERTS RM. (1982): Purification and properties of a progesterone-induced plasmin/trypsin inhibitor from uterine secretions of pigs and its immunocytochemical localization in the pregnant uterus, J Biol Chem, **257 (12)**, 6886-6897

FECHTER P, BROWNLEE GG. (2005): Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins, J Gen Virol, **86**, 1239-1249

FLYNN A, PROUD CG. (1995): Serine 209, not serine 53, is the major site of phosphorylation in initiation factor eIF-4E in serumtreated Chinese hamster ovary cells, J Biol Chem, **270**, 21684-1688.

GEBAUER F, XU W, COOPER GM, RICHTER JD. (1994): Translational control by cytoplasmatic polyadenylation of c-mos mRNA is necessary for oocyte maturation in the mouse, EMBO J, **13**, 5712- 5720

GEISERT RD, RENEGAR RH, THATCHER WW, ROBERTS RM, BAZER FW. (1982): Establishment of pregnancy in pig: I. interrelationship between preimplantation, development of the pig blastocyst and uterine endometrial secretions, *Endocrinol*, **27**, 925-939

GEISERT RD, ZAVY MT, MOFFATT RJ, BLAIR RM, YELLIN T. (1990): Embryonic steroids and the establishment of pregnancy in pigs, *Reprod Fertil Suppl*, **40**, 293-305

GEISERT RD, CHAMBERLAIN CS, VONNAHME KA, MALAYER JR, SPICER LJ. (2001): Possible role of kallikrein in proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins during the oestrous cycle and early pregnancy in pigs, *Reprod*, **121(5)**, 719- 28

GINGRAS AC, RAUGHT B, SONENBERG N. (1999a): eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation, *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 913-963

GINGRAS AC, GYGI SP, RAUGHT B, POLAKIEWICZ RD, ABRAHAM RT, HOEKSTRA MF, AEBERSOLD R, SONENBERG N. (1999b): Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism, *Gen Devel*, **13**, 1422-1437

GINGRAS AC, RAUGHT B, GYGI SP, NIEDZWIECKA A, MIRON M, BURLEY SK, POLAKIEWICZ RD, WYSLOUCH-CIESZYN SKA A, AEBERSHOLD R, SONENBERG N. (2001): Hierarchical phosphorylation of the translational inhibitor 4E-BP1, *Genes Dev*, **15**, 2852-2864

GLASS CK, ROSENFELD MG. (2000): The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors, *Genes Dev*, **14 (2)**, 121-141

GRAY NK, WICKENS M. (1998): Control of translation initiation in animals, *Annu Rev Cell Dev Biol*, **14**, 399-458

**Greenstein JS, Foley RC.** (1958): The early embryology of the cow with notes on comparable human development, *Int J Fertil*, **3**, 67-79

GROSS JD, MOERKE NJ, VON DER HAAR T, LUGOVSKOY AA, SACHS AB, McCARTHY JE, WAGNER G. (2003): Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E, *Cell*, **115** (6), 739-750

GUILLOMOT M. (1995) : Cellular interactions during implantation in domestic ruminants, *J Reprod Fertil Suppl*, **49**, 39-51

HAGHIGHAT A, MADER S, PAUSE A, SONENBERG N. (1995): Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E, *Embo J*, **14**(22), 5701-5709

HARDING PA, SURVEYOR GA, BRIGSTOCK DR. (1998): Characterization of pig connective tissue growth factor (CTGF) cDNA, mRNA and protein from uterine tissue, *DNA Seq*, **8** (6), 385-390

HAY N, SONENBERG N. (2004): Upstream and downstream of mTOR, *Gen Devel*, **18**, 1936- 1945

HETTINGER AM, ALLEN MR, ZHANG BR, GOAD DW, MALAYER JR. (2001): Presence of the acute phase protein, bikunin, in the endometrium of gilts during estrous cycle and early pregnancy, *Biol Reprod*, **65**, 507-513

JACKSON RJ, STANDART N. (1990): Do poly (A) tail and 3'untranslated region control mRNA translation?, *Cell*, **62**, 15-24

JAEGER LA, JOHNSON GA, KA H, GARLOW JG, BURGHARDT RC, SPENCER TE, BAZER FW. (2001): Functional analysis of autocrine and paracrine signalling at the uterine-conceptus interface in pigs, *Reprod Suppl*, **58**, 191-207.

JOHNSON GA, BURGHARDT RC, JOYCE MM, SPENCER TE, BAZER FW, PFARRER C, GRAY CA. (2002): Osteopontin expression in uterine stroma indicates a decidualization-like differentiation during ovine pregnancy, *Biol Reprod*, **68**, 1951-1958

JOSHI B, CAI AL, KEIPER BD, MINICH WB, MENDEZ R, BEACH CM, STEPINSKI J, STOLARSKI R, DARZYNKIEWICZ E, RHOADS RE. (1995): Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E at Ser209, *J Biol Chem*, **270**, 14597-14603

JOSHI B, CAMERON A, JAGUS R. (2004): Characterization of mammalian eIF4E-family members, *Eur J Biochem*, **271**, 2189-2203

JOSHI B, LEE K, MAEDER DL, JAQUIS R. (2005): Phylogenetic analysis of eIF4E-family members, *BMC Evol Biol*, **28**, 5: 48 (open access)

JOYCE MM, BURGHARDT RC, GEISERT RD, BURGHARDT JR, HOOPER RN, ROSS JW, ASHWORTH MD, JOHNSON GA. (2007): Pig conceptuses secrete estrogen and interferons to differentially regulate uterine STAT1 in a temporal and cell type-specific manner, *Endocrin*, **148 (9)**, 4420-4231

KA H, JAEGER LA, JOHNSON GA, SPENCER TE, BAZER FW. (2001): Keratinocyte growth factor is up-regulated by estrogen in the porcine uterine endometrium and functions in trophectoderm cell proliferation and differentiation, *Endocrin*, **142**, 2303-2310

KACZMAREK MM, WACLAWIK A, BLITEK A, KOWALCZYK AE, SCHAMS D, ZIECIK AJ. (2008): Expression of the vascular endothelial growth factor-receptor system in the porcine endometrium throughout the estrous cycle and early pregnancy, *Mol Reprod Devel*, **75(2)**, 362-372

KING GJ, ATKINSON BA, ROBERTSON HA. (1981): Development of the intercaruncular areas during early gestation and establishment of bovine placenta, *J Reprod Fertil*, **61(2)**, 469-474

KLEINSTEIN J, WESTERMANN W, MENNENGA K, GIPS H. (1993): Estrogen induces expression of endometrial epidermal growth factor receptors before implantation, *Am J Reprod Immunol*, **30 (2-3)**, 58-62

KOCHETOV AV, PONOMARENKO MP, FROLOV AS, KISSELEV LL, KOLCHANOV NA. (1999): Prediction of eukaryotic mRNA translational properties, *Bioinf*, **15**, 704-712

KRZYMOWSKI T, STEFANCZYK-KRZYMOWSKI S. 2002 Uterine blood supply as a main factor involved in the regulation of the estrous cycle – a new theory, *Reprod Biol*, **2**, 93-114

LA BONNARDIERE C, FLECHON JE, BATTEGAY S, FLECHON B, DEGROUARD J, LEFEVRE F. (2002): Polarized porcine trophoblastic cell lines spontaneously secrete interferon-gamma, *Placenta*, **23(10)**, 716-726

LAMPE B. (1984): Endokrinologische Untersuchungen zur frühen Trächtigkeit beim Schwein, Dissertation, Forschungsinstitut für Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere

LEE KY, DEMAYO FJ. (2004): Animal models of implantation, *Reprod*, **128 (6)**, 679-695

LINß W, FANGHÄNEL J. (1999): Histologie, Zytologie, Allgemeine Histologie, Mikroskopische Anatomie, de Gruyter Lehrbuch

LOPEZ-LASTRA M, RIVAS A, BARRIA MI. (2005): Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap independent translation initiation, *Biol Res*, **38**, 121-146

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent, *J Biol Chem*, **193**, 265-275

MARISSEN WE, TRIYOSO D, YOUNAN P, LLOYD RE. (2004): Degradation of poly(A)-binding protein in apoptotic cells and linkage to translation regulation, *Apoptosis*, **9**, 67-75

MARCOTRIGIANO J, GINGRAS A, SONENBERG N, BURLEY SK. (1997): Cocrystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP, *Cell*, **89**, 951-961

MC EWAN IJ, DAHLMAN-WRIGHT K, AMLÖF T, FORD J, WRIGHT AP, GUSTAFFSON JA. (1995): Mechanisms of transcription activation by nuclear receptors: studies on the human glucocorticoid receptor tau 1 transactivation domain, *Mutat Res*, **333 (1-2)**, 15-22

MCKENDRICK L, MORLEY SJ, PAIN VM, JAGUS R, JOSHI B. (2001): Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) at Ser209 is not required for protein synthesis in vitro and in vivo, *Eur J Biochem*, **268**, 5375-5385

MENINO AR JR., HOGAN A, SCHULTZ GA, NOVAK S, DIXON W, FOXCROFT GH. (1997): Expression of proteinases and proteinase inhibitors during embryo-uterine contact in the pig, *Dev Genet*, **21(1)**, 68-74

MIGLIACCIO A, PICOLLO D, CASTORIA G, DI DOMENICO M, BILANCIO A, LOMBARDI M, GONG W, BEATO M, AURICCHIO F. (1998): Activation of Scr/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor, *EMBO J*, **17**, 2008-2018

MINICH WB, BALASTA ML, GOSS DJ, RHOADS RE. (1994): Chromatographic resolution of in vivo phosphorylated and nonphosphorylated eukaryotic translation initiation factor eIF-4E: increased cap affinity of the phosphorylated form, *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 7668-7672

MORLEY P, WHITFIELD JF, VANDERHYDEN BC, TSANG BK, SCHWARTZ JL. (1992): A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium, *Endocrin*, **131 (3)**, 1305-1311

MORLEY SJ, COLDWELL MJ, CLEMENS MJ. (2005): Initiation factor modifications in the preapoptotic phase, *Cell Death Differ*, **12**, 571-584

OKANO A, OGAWA H, TAKAHASHI H, GESHI M. (2007): Apoptosis in the porcine uterine endometrium during the estrous cycle, early pregnancy and post partum, *J Reprod Dev*, **53(4)**, 923-930

PAIN VM. (1996): Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells, *Eur J Biochem*, **236**, 747-771

PAUSE A, BELSHAM GJ, GINGRAS AC, DONZE O, LIN TA, LAWRENCE J. JR., SONENBERG N. (1994): Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function, *Nature*, **371**, 762-767

PESTOVA TV, KOLUPAEVA VG, LOMAKIN IB, PILIPENKO EV, SHATSKY IN, ANGOL VI, HELLEN CU. (2001): Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes, *Proc Natl Acad Sci USA*, **98(13)**, 7029-7036

PFARRER CD, HEEB C, LEISER R. (2006): Expression of gap junctional connexins 26, 32 and 43 in bovine placentomes during pregnancy, *Placenta*, **27**, 79-86

PRZALA J, GREGORASZCZUK EL, KOTWICA G, STEFAŃCZYK-KRZYMOWSKA S, ZIECIK AJ, BLITEK A, PTAK A, RAK A, WÓJTOWICZ A, KAMIŃSKI T, SIAWRYS G, SMOLIŃSKA N, FRANCZAK A, KUROWICKA B, OPONOWICZ A, WASOWSKA B, CHŁOPEK J, KOWALCZYK AE, KACZMAREK MM, WACŁAWIK A. (2006): Mechanisms ensuring optimal conditions of implantation and embryo development in the pig, *Reprod Biol*, **6 (1)**, 59-87

PTUSHKINA M, VON DER HAAR T, KARIM MM, HUGHES JMX, McCARTHY JEG. (1999): Repressor binding to a dorsal regulatory site traps human eIF4E in a high cap-affinity state, *EMBO*, **18 (4)**, 4068-4075

RAUGHT B, GINGRAS AC. (1999): eIF4E activity is regulated at multiple levels, *Int J Biochem Cell Biol*, **31**, 43-57

RAUGHT B, GINGRAS AC, SONENBERG N. (2000): Regulation of ribosome recruitment in eukaryotes, In translational control of gene expression (Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews MB eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 245-294

REED KL, BLAESER LL, DANTZER V, GREEN ML, SIMMEN RCM. (1998): Control of secretory leukocyte protease inhibitor gene expression in the porcine periimplantation endometrium: a case of maternal-embryo communication, *Biol Reprod*, **58**, 448-457

RICHTER JD, SONENBERG N. (2005): Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins, *Nature*, **433**, 477-480

ROBERTS RM, XIE S, MATHIALAGAN N. (1996): Maternal recognition of pregnancy, *Biol Reprod*, **54**, 297-302

ROBERTSON HA, KING GJ. (1974): Plasma concentrations of progesterone, oestrone, oestradiol-17 $\beta$  and of oestrone sulphate in the pig at implantation, during pregnancy and at parturition, *J Reprod Fertil*, **40**, 133-141

ROBERTSON HA, DWYER RJ, KING GJ. (1985): Oestrogens in fetal and maternal fluids throughout pregnancy in the pig and comparison with the ewe and cow, *Endocrinol*, **106**, 355- 60

ROSS JW, MALAYER JR, RITCHEY JW, GEISERT RD. (2003): Characterization of the interleukin-1 $\beta$  system during porcine trophoblastic elongation and early placental attachment, *Biol Reprod*, **69**, 1251-1259

RÜSSE I, SINOWATZ F. (1991): Lehrbuch der Embryologie der Haustiere, Verlag Paul Parey, Hamburg, Berlin

SALAMONSEN LA. (1999): Role of proteases in implantation, *Rev Reprod*, **4**, 11-22

SAMUEL CA, PERRY JS. (1972): The ultrastructure of pig trophoblast transplanted to an ectopic site in the uterine wall, *J Anat*, **113**, 139-149

SCHEPER GC, PROUD CG. (2002): Does phosphorylation of the cap binding protein eIF4E play a role in translation initiation?, *Eur J Biochem*, **269**, 5350-5359

SCHEPER GC, VAN KOLLENBURG B, HU J, LUO Y, GOSS DJ, PROUD CG. (2002): Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduced its affinity for capped mRNA, *J Biol Chem*, **277**, 3303-3309

SCHNORR B. (1996): Entwicklung und Bau der Eizelle in B. Schnorr (Hrsg.) Embryologie der Haustiere, Verlag Enke, Stuttgart, 3-82

SCHNEIDER F, BRÜSSOW KP. (2006): Effects of a preovulatory administered depot gonadotrophin-releasing hormone agonist on reproductive hormone levels and pregnancy outcome in gilts, *Reprod Fertil Dev*, **18 (8)**, 857-866

SCHWICKERT S. (2002): Histomorphometrischer Vergleich des Blutgefäßsystems norm- und hypoxischer geburtsreifer Schafplazenten, Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen

SIMMEN FA, SIMMEN RC, GEISERT RD, MARTINAT-BOTTE F, BAZER FW, TERQUI M. (1992): Differential expression, during the estrous cycle and pre- and postimplantation conceptus development, of messenger ribonucleic acids encoding components of the pig uterine insulin-like growth factor system, *Endocrin*, **130 (3)**, 1547-1556

SINGH CR, CURTIS C, YAMAMOTO Y, HALL NS, KRUSE DS, HE H, HANNING EM, ASANO K. (2005): Eukaryotic translation initiation factor 5 is critical for integrity of the scanning preinitiation complex and accurate control of GCN4 translation, *Mol Cell Biol*, **25 (13)**, 5480-5491

SMOLINSKA N, SIAWRYS G, KAMINSKI T, PRZALA J. (2007): Leptin gene and protein expression in the trophoblast and uterine tissues during early pregnancy and the oestrous cycle of pigs, *J Physiol Pharmacol*, **58 (3)**, 563-581

SPENCER TE, JOHNSON GA, BURGHARDT RC, BAZER, FW. (2004): Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insight from domestic animal, *Biol Reprod*, **71 (2)**, 2-10

SONENBERG N, MORGAN ME, MERRICK WC, SHATKIN AJ. (1978): A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA, *Proc Natl Acad Sci USA*, **75 (10)**, 4843-4847

SONENBERG N. (1996): mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. In: Hershey JWB, Mathews MB, Sonenberg N, eds. Translutionol control. Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 245-269

SONENBERG N, GINGRAS AC. (1998): The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth, *Curr Op Cell Biol*, **10**, 268-275

SONENBERG N. (2008): eIF4E, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research, *Biochem Cell Biol*, **86**, 178-183

SPITSCHAK M, LANGHAMMER M, SCHNEIDER F, RENNE U. (2007): Two high-fertility mouse lines show differences in component fertility traits after long-term selection, *Reprod Fert Devel*, **19**, 815-821

TEE AR, PROUD GP. (2002): Caspase Cleavage of initiation factor 4E-Binding Protein 1 yields a dominant inhibitor of cap-dependent translation and reveals a novel regulatory motif, *Mol Cell Biol*, **22 (6)**, 1674-1683

TOMEK W, MELO STERZA FA, KUBELKA M, WOLLENHAUPT K, TORNER H, ANGER M, KANITZ W. (2002): Regulation of translation during in vitro maturation of bovine oocytes: the role of MAP kinase, eIF4E (cap binding protein) phosphorylation, and eIF4E-BP1, *Biol Reprod*, **66**, 1274-1282

TOMOO K, SHEN X, OKABE K, NOZOE Y, FUKUHARA S, MORINO S, ISHIDA T, TANIGUCHI T, HASEGAWA H, TERASHIMA A, SASAKI M, KATSUYA Y, KITAMURAS K, MIYOSHI H, ISHIKAWA M, MIURA K. (2002): Crystal structures of 7-methylguanosine 5' triphosphate ( $m^7$ GTP)- and P<sup>1</sup>-7-methylguanosine-P<sup>3</sup>-adenosine-5', 5'-triphosphate ( $m^7$ GpppA)- bound human full-length eukaryotic initiation factor 4E: biological importance of the C-terminal flexible region, *Biochem J*, **362**, 539-544

TOMOO K, SASAKI M, TANIGUCHI T, MIYAGAWA H, KITAMURA K, MIURA K, ISHIDA T. (2003): Structural features of human initiation factor 4E studied by X-ray crystal analyses and molecular dynamics simulations, *J Mol Biol*, **328**, 365-383

TOMOO K, ABIKO F, MIYAGAWA H, KITAMURA K, ISHIDA T. (2006): Effect of N-terminal region of eIF4E and Ser65-phosphorylation of 4E-BP1 on interaction between eIF4E and 4E-BP1 fragment peptide, *J Biochem*, **140**, 237-246

VOLPON L, OSBORNE MJ, TOPISIROVIC I, SIDDIQUI N, BORDEN KL. (2006): Cap-free structure of eIF4E suggests a basis for conformational regulation by its ligands, *EMBO J* **25** (21), 5138-5149

VONNAHME KA, FERNANDO SC, ROSS JW, ASWORTH MD, DESILVA U, MALAYER JR, GEISERT RD. (2004): Porcine Endometrial expression of kininogen, factor XII, and plasma kallikrein in cyclic and pregnant gilts, *Biol Reprod*, **70**, 132- 138

WÄHNER M, FISCHER K. (2005): Current physiological aspects of fetal growth and parturition in pig, *Biotech Animal Hus*, **21(5-6)**, 135-148

WANG X, PROUD CG. (2007) Methods for studying signal-dependent regulation of translation factor activity, *Methods Enzymol*, **431**, 113-142

WHATES DC, WOODING FB. (1980): An electron microscopic study of implantation in cow, *Am J Anat*, **159 (3)**, 285-306

WILKIE GS, DICKSON KS, GRAY NK. (2003): Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors, *Trends Biochem Sci*, **28**, 182-188

WOLLENHAUPT K, EINSPANIER R, GABLER C, SCHNEIDER F, KANITZ W, BRÜSSOW KP. (1999): Identification of the EGF/EGF-R system in the oviduct and endometrium of pigs in early stages of pregnancy and early conceptus, *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, **107 (8)**, 530-538

WOLLENHAUPT K, TOMEK W, BRÜSSOW KP, TIEMANN U, VIERGUTZ T, SCHNEIDER F, NÜRNBERG G. (2002): Effects of ovarian steroids and epidermal growth factor (EGF) on Expression and bioactivation of specific regulators of transcription and translation in oviductal tissue pigs, *Reprod*, **123**, 87-96

WOLLENHAUPT K, WELTER H, EINSPANIER R, MANABE N, BRÜSSOW KP. (2004): Expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R), vascular endothelial growth factor receptor (VEGF-R) and fibroblast growth factor receptor (FGF-R) systems in porcine oviduct and endometrium during the time of implantation, *J Reprod Devel*, **50** (3), 269-278

WOLLENHAUPT K, BRÜSSOW KP, TIEMANN U, TOMEK W. (2007): The embryonic pregnancy signal oestradiol influences gene expression at the level of translational initiation in porcine endometrial cells, *Reprod Dom Anim*, **42**, 167-175

WOLLENHAUPT K, REINKE, BRÜSSOW KP, ALBRECHT D, TIEMANN U, SEYFERT HM, TOMEK W. (2010): Natural occurrence and physiological role of a truncated eIF4E in the porcine Endometrium during implantation, *Biochem J*, **432** (2), 353-363

WOLLENHAUPT K, REINKE, BRÜSSOW KP, SPITSCHAK M, KANITZ W, TOMEK W. (2011): Truncation of the mRNA cap-binding protein eIF4E is specific for the non-invasive implantation in pigs, *Reprod Domest Animal*, im Druck

WOODING FB, MORGAN G, ADAM CL. (1997): Structure and function in the ruminant synepitheliochorial placenta: central role of the trophoblast binucleate cell in deer, *Microsc Res Tech*, **38** (1-2), 88-99

YING C, HSU WF, CHENG WTK, YANG YC. (2000): Estrogen receptor is expressed in pig embryos during preimplantation development, *Mol Reprod Devel*, **55**, 83-88

## **Danksagung**

Mein Dank gilt an erster Stelle Frau Dr. Wollenhaupt für das interessante Thema, die sehr gute fachliche Betreuung im Laborbereich, ihrem Interesse und der fachlichen Beratung beim Werdegang der schriftlichen Arbeit sowie für die Möglichkeit, in der ebenso engagierten wie freundschaftlichen Atmosphäre der Arbeitsgruppe zu forschen.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Tomek, dessen wissenschaftlicher Rat und dessen Diskussionsanregungen eine unschätzbare Hilfe beim Erstellen dieser Arbeit für mich waren.

Für die Versuchstievorbereitungen danke ich Herrn Prof. Kanitz für die Vorbereitung der Rinder, für die Versuchstievorbereitungen der Schweine danke ich Herrn Prof. Brüssow und für die Vorbereitungen der Mäuse danke ich Frau Spitschak.

Herrn Prof. Seyfert danke ich für die Versuchsdurchführung der mRNA-Analytik.

Vielen Dank allen Mitarbeitern des Leibniz Institutes für Nutztierbiologie für die freundliche, persönliche und vor allem immer hilfsbereite Art. Besonderer Dank gilt Frau Klückmann, Frau Rodewald, Frau Kroh und Frau Krüger für die tatkräftige, technische Unterstützung.

Dank gilt auch Herrn Dr. Albrecht vom Institut für Mikrobiologie der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald für die Durchführung der MALDI-TOF-TOF Analysen.

Frau Dr. Knoblich von WISPRA danke ich für das Lektorat.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinem Mann und meinen Kinder bedanken, die mir während dieser Zeit eine große Stütze waren und mir immer wieder neuen Mut gegeben haben.