

Identifizierung und funktionelle Charakterisierung neuer  
RNA-Transportfaktoren in der *Xenopus laevis* Oozyte

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Jana Löber**  
aus Gera

Göttingen 2008

D7

Referent: Prof. Dr. Pieler

Korreferent: Prof. Dr. Wimmer

Tag der mündlichen Prüfung:

Meinen Großeltern

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis .....	VI
Tabellenverzeichnis .....	VIII
Abkürzungsverzeichnis .....	IX
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Die Rolle der intrazellulären RNA-Lokalisierung .....	1
1.2. Die Oogenese in <i>Xenopus laevis</i> .....	2
1.3. Die unterschiedlichen RNA-Transportwege in der <i>Xenopus</i> Oozyte.....	4
1.4. Die Bedeutung der RNA-Lokalisierung in der Embryonal-entwicklung von <i>Xenopus laevis</i> .....	6
1.4.1. Die Beteiligung früh lokalisierter mRNAs an der Keimzell-Entwicklung .....	6
1.4.2. Die Bedeutung spät lokalisierter mRNAs für die frühen Musterbildung.....	7
1.5. Mechanismen der RNA-Lokalisierung.....	9
1.5.1. <i>Cis</i> -Elemente in der RNA vermitteln die Lokalisierung.....	9
1.5.2. Die Bedeutung <i>trans</i> -agierender Faktoren in der RNA-Lokalisierung .....	12
1.5.2.1. Vg1RBP / Vera .....	12
1.5.2.2. Prpp.....	13
1.5.2.3. VgRBP60 / PTB / hnRNP I .....	13
1.5.2.4. Staufen .....	14
1.5.2.5. 40LoVe .....	15
1.5.3. Die Rolle des Zytoskeletts bei der Lokalisierung und Verankerung der RNAs .....	15
1.5.4. Model des RNA-Transportes entlang des späten Lokalisationsweges .....	16
1.5.4.1. Bildung des primären RNP-Komplexes im Kern.....	16
1.5.4.2. Remodellierung und Assemblierung des Transportkomplexes .....	17
1.5.4.3. Mikrotubuli-abhängiger Transport des Komplexes zum vegetativen Kortex.....	18
1.5.4.4. Verankerung der RNA am Kortex und Dissoziation des Komplexes .....	19
1.6. Zielsetzung.....	20

---

<b>2. Materialien und Methoden.....</b>	<b>21</b>
2.1. Materialien.....	21
2.1.1. Organismen.....	21
2.1.2. Mikroskope und Zubehör.....	21
2.1.3. Software.....	21
2.1.4. Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.5. Chemikalien.....	22
2.1.6. Enzyme und Kits.....	22
2.1.7. Molekulargewichtsstandards.....	22
2.1.8. Radioaktiv-markierte Aminosäuren.....	23
2.1.9. Antibiotika.....	23
2.1.10. Antikörper.....	23
2.1.11. Nährmedien.....	23
2.1.12. Reinstwasser und RNase-freies Wasser.....	23
2.1.13. Puffer und Stammlösungen.....	23
2.1.14. Plasmide.....	26
2.1.15. Primer.....	26
2.1.16. Morpholino-Oligonukleotide.....	28
2.2. Methoden.....	29
2.2.1. DNA-Methoden.....	29
2.2.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	29
2.2.1.2. Isolierung genomischer DNA aus Oozyten.....	29
2.2.1.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gel.....	29
2.2.1.4. Konzentrationsbestimmung von DNA.....	29
2.2.1.5. Nichtdenaturierende Agarose-Gelelektrophorese.....	29
2.2.1.6. Polymerase-Ketten-Reaktion.....	30
2.2.1.7. DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme.....	31
2.2.1.8. Ligation und Transformation in kompetente Bakterien.....	31
2.2.1.9. Mutagenese.....	32
2.2.1.10. DNA-Sequenzierung.....	32
2.2.2. RNA-Methoden.....	33
2.2.2.1. RNA-Isolierung aus Embryonen und Oozyten.....	33
2.2.2.2. <i>In-vitro</i> -Transkription von Cap-mRNA.....	33
2.2.2.3. <i>In-vitro</i> -Transkription Fluoreszenz- und Digoxigenin-markierter RNA.....	33
2.2.2.4. Konzentrationsbestimmung von RNA.....	34
2.2.2.5. Reverse Transkription.....	34

---

2.2.2.6. Agarose-Gelelektrophorese.....	35
2.2.2.7. Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	35
2.2.2.8. Ko-Immunopräzipitation von RNA ( <i>in vitro</i> ).....	35
2.2.2.9. Ko-Immunopräzipitation von RNA ( <i>in vivo</i> ).....	36
2.2.2.10. Quantitative Ko-Immunopräzipitation von RNA.....	36
2.2.2.11. <i>Whole Mount In Situ</i> Hybridisierung.....	38
2.2.3. Protein-Methoden.....	40
2.2.3.1. Präparation von Oozytenextrakten.....	40
2.2.3.2. <i>In-vivo</i> -Expression von Proteinen in <i>Xenopus</i> Oozyten.....	41
2.2.3.3. <i>In-vitro</i> -Translation.....	41
2.2.3.4. Konzentrationsbestimmung nach Bradford.....	41
2.2.3.5. Aufkonzentrierung von Proteinlösungen.....	42
2.2.3.6. Proteinfällung.....	42
2.2.3.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	42
2.2.3.8. Gelfärbung mit kolloidalem Coomassie-Blau.....	43
2.2.3.9. Affinitätschromatographische Aufreinigung Vg1RBP-bindender Proteine.....	43
2.2.3.10. Massenspektrometrische Proteinanalyse.....	44
2.2.3.11. <i>Western Blot</i> Transfer.....	44
2.2.3.12. Proteindetektion mit Antikörpern.....	45
2.2.3.13. Ko-Immunopräzipitation von Proteinen aus Oozytenlysat.....	45
2.2.3.14. Zonalzentrifugation.....	45
2.2.4. Tierexperimentelle Methoden.....	46
2.2.4.1. Testis-Präparation.....	46
2.2.4.2. Eiablage und <i>in-vitro</i> -Befruchtung.....	46
2.2.4.3. Gewinnung von <i>Xenopus</i> Ovarien.....	47
2.2.4.4. Mikroinjektionen in Embryonen und Oozyten.....	47
2.2.4.5. Kultivierung von Embryonen und Oozyten.....	48
2.2.4.6. Herstellung transgener Embryonen.....	48
2.2.4.7. Identifizierung transgener Embryonen.....	48
2.2.4.8. Aufzucht transgener <i>Xenopus</i> -Embryonen.....	48
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>50</b>
3.1. Isolierung neuer Lokalisationsfaktoren.....	50
3.1.1. Versuchsstrategie.....	50
3.1.2. Promotoranalysen.....	53

3.1.3. Generierung transgener <i>Xenopus laevis</i> Frösche und Analyse der transgenen Tiere .....	55
3.1.3.1. DNA-Analyse der transgenen Frösche .....	56
3.1.3.2. Analyse der RNA-Expression in den Oozyten transgener Frösche .....	57
3.1.3.3. Analyse der Proteinexpression .....	58
3.1.4. Expression der rekombinanten Proteine durch Mikroinjektion von mRNA ....	60
3.1.5. Aufreinigung der Riboproteinkomplexe mittels Tandem-Affinitätschromatographie .....	63
3.1.6. Funktionelle Analyse der identifizierten Interaktionspartner .....	67
3.1.6.1. ePAB, FRGY-2B und EF-1 $\alpha$ assoziierten in Abhängigkeit von RNA mit Vg1RBP .....	67
3.1.6.2. ePAB, FRGY-2B und EF-1 $\alpha$ interagieren auch mit anderen <i>trans-</i> agierenden Lokalisationsfaktoren .....	69
3.1.6.3. ePAB, FRGY-2B und EF-1 $\alpha$ binden ebenso wie Vg1RBP an lokalisierte und nicht lokalisierte Transkripte .....	72
3.2. Funktionsanalyse vegetal lokalisierter RNAs .....	78
3.2.1. Untersuchung der Proteinfunktion durch Herunterregulierung der Expression .....	80
3.2.2. Analyse der Genfunktion durch Delokalisation bzw. Überexpression .....	85
3.2.3. Zusammenfassung der funktionellen Übersichtsanalyse .....	87
3.2.4. Weiterführende Untersuchungen des Klons Velo 40.....	88
3.3. Anreicherung lokalisierter mRNAs in den primordialen Keimzellen .....	92
3.3.1. Lokalisationselemente Keimplasma-spezifischer mRNA vermitteln die Anreicherung der RNAs in primordialen Keimzellen.....	92
3.3.2. Zeitlicher Verlauf der somatischen Degradation Keimzell-spezifischer RNA im Embryo .....	94
3.3.3. Keimplasma-spezifische RNA-Protein-Interaktionen.....	95
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>98</b>
4.1. Generierung und Analyse transgener Frösche .....	99
4.2. Aufreinigung Vg1RBP-bindender Proteine.....	102
4.2.1. Aufreinigungsstrategie.....	102
4.2.2. Embryonales Poly(A)-bindendes Protein .....	102
4.2.3. Y-Box-bindendes Protein 2 (FRGY-2B) .....	103
4.2.4. Elongationsfaktor-1 $\alpha$ (42Sp50).....	104





## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Die Stadien der Oogenese in <i>Xenopus laevis</i> .....	2
Abb. 1.2: Schematische Darstellung des frühen Lokalisationsweges.....	4
Abb. 1.3: Schematische Darstellung des späten Transportweges.....	5
Abb. 1.4: Modell der Mesoderm- und Spemann-Organisator-Induktion durch Zusammenwirken vegetal lokalisierter und dorsaler Faktoren. ....	8
Abb. 1.5: Lokalisationselemente vegetal lokalisierter mRNAs.....	11
Abb. 1.6: Schematische Darstellung des Mikrotubuli-abhängigen RNA-Transportes in der <i>Xenopus</i> Oozyte.....	17
Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Versuchsstrategie zur Isolierung und Charakterisierung neuer RNA-Lokalisationsfaktoren. ....	50
Abb. 3.2: Schematische Darstellung des Meganuklease-Plasmids und der TAP- Vg1RBP-Fusionsproteine.....	53
Abb. 3.3: Das 670bp-Fragment des TFIIIA-Promotors ist in frühen <i>Xenopus</i> -Oozyten aktiv. ....	54
Abb. 3.4: Expression des $\gamma$ -Crystallin1-GFP-Reporters in den Linsen transgener <i>Xenopus laevis</i> .....	55
Abb. 3.5: Nachweis der transgenen DNA und RNA in den Oozyten GFP- exprimierender Frösche. ....	58
Abb. 3.6: Analyse der Expression von TAP-Vg1RBP in den Oozyten transgener Frösche. ....	59
Abb. 3.7: TAP-Vg1RBP ist in Komplexen derselben Größenordnung gebunden wie endogenes Vg1RBP und kann daraus mit IgG-Sepharose gebunden werden.....	62
Abb. 3.8: Schematische Darstellung der Affinitätsaufreinigung Vg1RBP-bindender Proteine im großen Maßstab.....	63
Abb. 3.9: TAP-Vg1RBP-bindende Proteine können spezifisch durch Affinitäts- chromatographie mit IgG-Sepharose isoliert werden. ....	65
Abb. 3.10: ePAB, FRGY-2B und EF-1 $\alpha$ binden indirekt und RNA-abhängig an Vg1RBP.....	68
Abb. 3.11: ePAB, FRGY-2B und EF-1 $\alpha$ binden auch an andere Proteinkomponenten des mRNA-lokalisierenden Komplexes. ....	70
Abb. 3.12: ePAB, FRGY-2B und EF-1a ko-sedimentieren im Schwerefeld mit den Lokalisationsfaktoren Vg1RBP und 40LoVe. ....	71
Abb. 3.13: <i>In-vitro</i> -Interaktionen zwischen lokalisierten mRNAs und Kandidaten- Proteinen. ....	74

---

Abb. 3.14: RNA-Protein-Interaktionen in der Oozyte .....	77
Abb. 3.15: Vegetale mRNA-Lokalisierung der zu untersuchenden Gene .....	80
Abb. 3.16: <i>In vitro</i> Test zur Überprüfung der Funktionalität der Morpholino- Oligonukleotide.....	81
Abb. 3.17: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes zu Herunterregulierung der Proteinexpression. ....	82
Abb. 3.18: Funktionsanalyse vegetal lokalisierter mRNAs durch Herunterregulierung der Proteintranslation. ....	84
Abb. 3.19: Schematische Darstellung der Über-/Missexpression vegetal lokalisierter mRNAs. ....	86
Abb. 3.20: Funktionsanalyse vegetal lokalisierter mRNAs durch Miss- bzw. Überexpression. ....	87
Abb. 3.21: Miss-/Überexpression von Velo 40 bewirkt eine Inhibition der Zellteilung im Blastula-Embryo. ....	88
Abb. 3.22: Velo 40/Plx3 unterscheidet sich in der RNA-Lokalisation und funktionell von Plx1. ....	89
Abb. 3.23: Der Effekt nach Missexpression von Velo 40 wird über dessen Kinase- Aktivität vermittelt. ....	91
Abb. 3.24: Die Lokalisationselemente Keimplasma-spezifischer mRNAs vermitteln eine Anreicherung der RNA in den primordialen Keimzellen. ....	93
Abb. 3.25: Zeitlicher Verlauf der somatischen RNA-Degradation des <i>XDead End</i> Lokalisationselementes. ....	95
Abb. 3.26: Verschiedene Proteine binden an das <i>XDead end</i> Lokalisationselement. .	97
Abb. 4.1: Sequenzvergleich zwischen Formen des Elongationsfaktors 1 $\alpha$ aus <i>Xenopus</i> <i>laevis</i> und <i>Dictyostelium discoideum</i> und der Aktin-bindenden Region von Depactin. ....	106
Abb. 4.2: Die Lokalisationselemente Keimzell-spezifischer und –unspezifischer mRNAs enthalten mehrere potentielle mikro-RNA-Bindungsstellen.....	116

---

## Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1: Die Effizienz der Meganuklease-Methode.....	56
Tab. 3.2: Gesamtzahl der adulten transgenen Frösche mit GFP-Expression.....	56
Tab. 3.3: Zusammenfassung der Analyse aller untersuchten transgenen Tiere.....	60
Tab. 3.4: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse.....	66
Tab. 3.5: Zusammenfassung der von K. Horvay neu identifizierten, vegetal lokalisierten Klone, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.....	79
Tab. 3.6: Ergebnisse der Morpholino-Mikroinjektionsexperimente.....	85
Tab. 3.7: Zusammenfassende Darstellung des funktionellen Screens.....	87
Tab. 3.8: Anreicherung der Lokalisationselemente bzw. 3'UTRs Keimplasma- spezifischer RNAs in den primordialen Keimzellen nach Mikroinjektion in Embryonen.....	94

---

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
APB	Alkalische-Phosphatase-Puffer
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BP	Bandpass
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CBP	Calmodulin-bindendes Peptid
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonsäure
CMV	Cytomegalovirus
CoA	Koenzym A
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
Dig	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsRBP	Doppelstrang-RNA-bindende Domäne
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-1 $\alpha$	Elongationsfaktor 1 alpha
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-tetraessigsäure
ePAB	embryonales Poly(A)-bindendes Protein
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor

---

FRGY-2B	Y-Box-bindendes Protein 2B aus dem Frosch
G	Guanin
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
Hepes	N-(2-Hydroxymethyl)piperazin,N'-3-propansulfonsäure
hnRNP	heteronukleäres Ribonukleoprotein
HRP	Meerettich-Peroxydase
I	Isoleucin
IgG	Immunglobulin
IP	Immunopräzipitation
K	Lysin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KH	hnRNP K – Homologie-Domäne
LB	Luria-Bertani
LE	Lokalisationselement
M	molar
MAB	Maleinsäure-Puffer
MBS	modifiziertes Barth's-
MEM	MOPS-EGTA-MgCl <sub>2</sub> -Puffer
MEMFA	MOPS-EGTA-MgCl <sub>2</sub> -Puffer mit Formaldehyd
METRO	messenger-Transport-Organisator
min	Minute
MO	Morpholino-Oligonukleotid
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
n.a.	nicht analysiert
NET-2	NaCl-EDTA-Tris-Puffer 2
NP40	Nonidet P-40
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

---

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein (-Partikel)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RRM	RNA-Erkennungsmotif
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumchlorid-Natriumzitat-Puffer
T	Thymin
TAP	Tandem-Affinitätsaufreinigung
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBP	Tubulin-bindende Domäne
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Uracil
UTP	Uridintriphosphat
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
Velo	vegetative lokalisiertende RNA
Vol	Volumen
WMISH	<i>whole mount in situ</i> Hybridierung
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
<i>β-gal</i>	beta-Galaktosidase

# 1. Einleitung

## 1.1. Die Rolle der intrazellulären RNA-Lokalisierung

Die räumliche Trennung biochemischer Prozesse ist die Voraussetzung für die Entwicklung hochkomplexer Organismen. So ermöglicht die Bildung membranbegrenzter Kompartimente in eukaryotischen Zellen eine präzise Regulation verschiedenster Stoffwechselprozesse. Doch nicht nur innerhalb der Zelle findet man diese Spezialisierung. In vielzelligen Organismen werden verschiedene Aufgaben auf Zelltypen übertragen, die sich strukturell und funktionell teilweise sehr stark unterscheiden. Diese Differenzierung muß im Laufe der Embryonalentwicklung aus einer einzigen, totipotenten Zelle bewerkstelligt werden, der Zygote.

Da die Aktivierung des zygotischen Genoms erst im Blastula-Stadium während der sogenannten Blastula-Transition erfolgt, muss die Oozyte den Großteil der Materialien liefern, die der frühe Embryo zum Überleben und für die Ausführung der ersten Zellteilungen benötigt. Dazu gehören neben Dotter auch Strukturproteine, Enzyme, Zellorganellen, Ribosomen und mRNAs. Ribosomale und Boten-RNA wird in der Oozyte transkribiert und gespeichert, um eine schnelle Proteinexpression noch vor der Blastula-Transition zu ermöglichen. Zusätzlich zur zeitlichen kann mit Hilfe maternaler mRNAs auch eine räumliche Kontrolle der Proteinsynthese gewährleistet werden. Dafür werden die mRNA-Moleküle bereits in der Oozyte an den zukünftigen Wirkungsort ihrer Proteinprodukte transportiert. Die so geschaffene Zellasymmetrie ist essentiell für die spätere Entwicklung des Embryos.

mRNA-Moleküle werden jedoch nicht nur während der frühen Embryonalentwicklung, sondern auch in anderen biologischen Zusammenhängen spezifisch lokalisiert. So wird *β-aktin* RNA in Hühner-Fibroblasten zu den Lammellipodien (Kislauskis *et al.* 1994) und *tau* RNA in die Axone von Neuronen transportiert (Litman *et al.* 1993) wo sie räumlich begrenzt translatiert werden können. Die Zellen der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* deponieren *ASH1* mRNA während der Knospung spezifisch in die Tochterzelle (Long *et al.* 1997; Takizawa *et al.* 1997), wo das *ASH1* Protein über den *Mating*-Typ der Tochterzellen entscheidet.

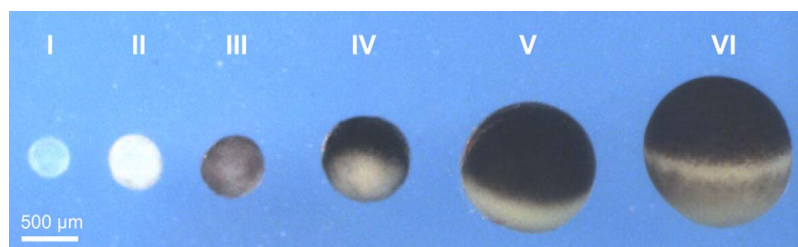
In zwei biologischen Systemen wurden die Bedeutung und die Mechanismen der maternalen RNA-Lokalisierung bisher besonders eingehend untersucht: in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und im Afrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis*. Die intrazelluläre, asymmetrische Verteilung von RNA-Molekülen in der Oozyte führt zu einer lokal begrenzten Protein-Synthese und zur Ausbildung von lokalen Protein-Anreicherungen bzw. Proteingradienten, die für die weitere Embryogenese und

die frühembryonale Musterbildung essentiell sind (Bashirullah *et al.* 1998). Zwei gut untersuchte Beispiele aus *Drosophila* sind die RNAs *bicoid* und *nanos*. Die anteriore Lokalisierung der *bicoid* RNA in der Oozyte verursacht einen Konzentrationsgradienten für Bicoid Protein im Embryo, der von anterior nach posterior abfällt (Driever und Nusslein-Volhard 1988). Die *nanos* RNA ist dagegen posterior in der Oozyte lokalisiert, somit ist die höchste Konzentration des Proteins im Embryo ebenfalls posterior zu finden (Wang und Lehmann 1991). Während Bicoid für die Ausbildung von Kopf- und Thorax-Strukturen verantwortlich ist, inhibiert Nanos die Aktivierung anteriorer Determinanten am posterioren Pol (Driever und Nusslein-Volhard 1989; Irish *et al.* 1989; Driever *et al.* 1990; Lehmann und Nusslein-Volhard 1991).

In den folgenden Unterkapiteln soll speziell auf die RNA-Lokalisierung in *Xenopus laevis* Oozyten eingegangen werden. Dabei wird sowohl die Bedeutung lokalisierter RNAs für die frühe Embryonalentwicklung erläutert, als auch der Mechanismus des RNA-Transportes beleuchtet.

## 1.2. Die Oogenese in *Xenopus laevis*

Die Oozyten des Afrikanischen Krallenfrosches entstehen aus primordialen Keimzellen, welche schon im frühen Embryo in die Gonaden einwandern. Dort entwickeln sie sich zu Stammzellen, welche durch Zellteilung die Oogonien produzieren. Diese bilden durch weitere 4 Teilungen primäre Oozyten, die in die Prophase der Meiose I eintreten. In dieser Phase verbleiben sie die nächsten Monate und synthetisieren und akkumulieren in dieser Zeit alle Materialien, die sie für die Eireifung und die frühe Embryonalentwicklung benötigen. Man unterteilt die Prophase in 6 Stadien, welche man wiederum in eine vorvitellogene (Stadien I und II) und eine vitellogene Phase (Stadien III bis VI) einordnen kann (Abb. 1.1, Dumont 1972).



**Abb. 1.1: Die Stadien der Oogenese in *Xenopus laevis*.**

Die Stadien I bis VI sind von links nach rechts aufgereiht. Oozyten im Stadium I sind transparent. Im Stadium II erscheint die Oozyte weiß. Ab Stadium III sind die dunklen Pigmentgranula zu sehen, die sich im Stadium VI am animalen Kortex anreichern. Die Stadium VI Oozyte ist deutlich an dem hellen äquatorialen Ring zu erkennen.



Im Stadium I beträgt die Größe der Oozyten ca. 50 bis 300  $\mu\text{m}$ . Sie sind transparent und der Zellkern und die mitochondriale Wolke sind deutlich zu erkennen. Die mitochondriale Wolke wird auch als Balbiani-Körper bezeichnet und ist der Ort extensiver Mitochondrien-Synthese. Außerdem befindet sich hier das Keimplasma mit den Keimgranula, die u.a. Determinanten für die spätere Keimbahnbildung enthalten. In diesem Stadium findet eine Amplifikation der ribosomalen Gene statt, wodurch später die Synthese großer Mengen ribosomaler RNAs ermöglicht wird (Wehner und Gehring 1995).

Im Stadium II fragmentiert die mitochondriale Wolke und ein Teil wandert zum vegetativen Kortex, wo das Keimplasma deponiert wird (Hausen und Riebesell 1991).

Die Stadium III Oozyten haben einen Durchmesser von 450 – 600  $\mu\text{m}$  erreicht und beginnen mit der Aufnahme von Vitellogenin. Dies ist ein Dottervorläuferprotein, das in der Leber nach Induktion durch Östrogene synthetisiert wird. Es wird phosphoryliert, glykosyliert, mit Lipiden assoziiert und ins Blut abgegeben. Die Oozyten nehmen das Vitellogenin von dort über rezeptorvermittelte Endozytose auf und spalten es in Lipovitellin und Phosvitin. Beide Proteine werden in Dotterschollen eingelagert, (Hausen und Riebesell 1991; Wehner und Gehring 1995). Außerdem wird in der Oozyte die Syntheserate für weitere Komponenten stark erhöht. Die gesteigerte Transkriptionsaktivität ist am Auftreten der sogenannten Lampenbürsten-Chromosomen zu erkennen. Der Zellkern vergrößert sich so stark, dass er jetzt als Keimbläschen bezeichnet wird. Es werden hauptsächlich ribosomale RNAs und tRNAs, aber auch mRNAs sowie verschiedene Proteine, wie z. B. Transkriptionsfaktoren, synthetisiert und gespeichert. Auch die Einlagerung von Pigmentgranula findet nun statt und wird durch die dunkle Färbung der Oozyten sichtbar (Wehner und Gehring 1995).

Im Stadium IV reichern sich die Pigmentgranula im animalen Kortex an. Die Dotterschollen sinken in die vegetale Hälfte und schieben den Zellkern langsam zum animalen Pol. Damit wird die animal-vegetale Asymmetrie der Oozyte erstmals von außen sichtbar.

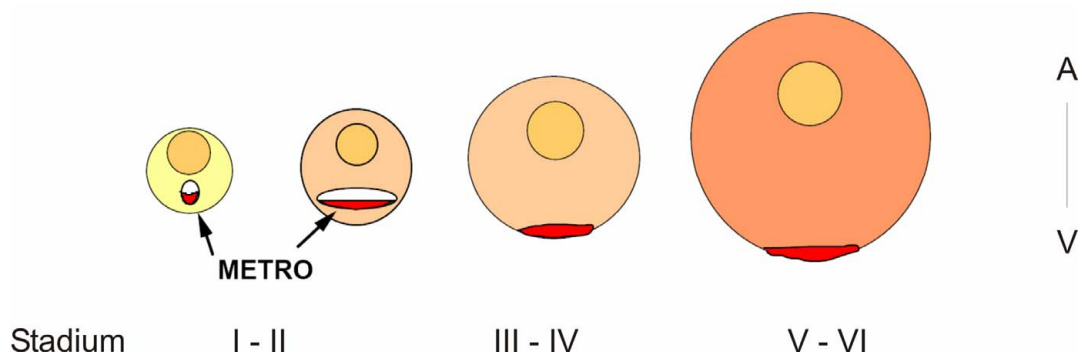
Die Synthese und Einlagerung von RNAs und Proteinen dauert mehrere Monate und endet erst im Stadium VI, wenn die Oozyten ihren endgültigen Durchmesser von ca. 1,3 mm erreicht haben. Die Transkriptionsaktivität wird eingestellt und das Chromatin kondensiert wieder. Äußerlich sind diese Oozyten durch einen pigmentfreien Ring zwischen der dunklen animalen und der helleren, nur leicht pigmentierten vegetalen Hälfte zu erkennen. Die Oozyten verharren nun solange in der späten Prophase der Meiose I, bis die endgültige Eireifung und die Fortführung der

meiotischen Teilungen durch hormonelle Stimulation ausgelöst wird (Wehner und Gehring 1995; Gilbert 2003).

### 1.3. Die unterschiedlichen RNA-Transportwege in der *Xenopus* Oozyte

Die ersten Arbeiten zur RNA-Lokalisierung in *Xenopus* Oozyten zeigen, dass der RNA-Transport auf mindestens zwei scheinbar diskreten Wegen erfolgt.

Als Beispiel für den frühen Weg soll die *Xcat-2* RNA dienen. In den frühen Stadien I und II ist *Xcat-2* in der mitochondrialen Wolke zu finden und wandert mit dieser zum vegetativen Pol, wo die RNA im Stadium III mit dem Kortex assoziiert (Forristall *et al.* 1995). Am Kortex nimmt die RNA nur eine kleine, kreisrunde Fläche ein (Abb. 1.2). Kloc und Etkin analysierten die Verteilung von *Xcat-2* und anderer früh lokalisierender mRNAs genauer. Dabei stellten sie fest, dass die RNAs in einer besonderen Struktur innerhalb der mitochondrialen Wolke vorliegen, die sie *messenger transport organizer* (METRO) nannten. Wahrscheinlich akkumulieren die frühen RNAs passiv über einen *Diffusion-Entrapment*-Mechanismus in der METRO-Region, d.h. sie diffundieren solange frei im Zytoplasma umher, bis sie von Strukturen innerhalb der mitochondrialen Wolke "eingefangen" und festgehalten werden. Gemeinsam mit den Keimgranula wandern sie anschließend zum vegetativen Pol (Kloc und Etkin 1995).

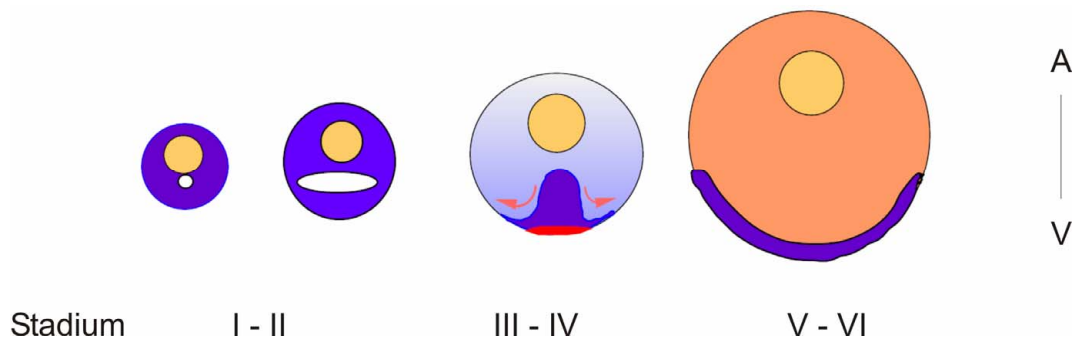


**Abb. 1.2: Schematische Darstellung des frühen Lokalisationsweges.**

Die früh lokalisierenden RNAs sind rot dargestellt, die mitochondriale Wolke ist weiß. Rechts ist die Ausrichtung der animal (A) – vegetativen (V) Achse angegeben. In den Oozyten der Stadien I – II befinden sich die RNAs in einem Teil der mitochondrialen Wolke, der als *messenger transport organizer* (METRO) bezeichnet wird, und wandern mit diesem zum vegetativen Pol, wo sie im Stadium III verankert werden (Abbildung modifiziert nach Kloc und Etkin 1995).

Über einen zweiten, den sogenannten späten Lokalisationsweg werden RNAs erst ab Stadium III der Oogenese zum vegetativen Pol transportiert. Dabei assoziieren sie nicht mit der mitochondrialen Wolke. Die spät lokalisierenden RNAs werden am Kortex der gesamten vegetativen Hemisphäre verankert und nicht nur an der Polspitze. Die am besten untersuchte spät lokalisierende mRNA ist *Vg1*. Es ist die erste vegetativ lokalisierte RNA, die in *Xenopus* Oozyten entdeckt und charakterisiert wurde (Melton 1987).

*Vg1* findet man in den Stadien I und II im gesamten Ooplasma mit Ausnahme der mitochondrialen Wolke. Im späten Stadium II findet eine Konzentration der RNA im vegetativen Zytoplasma statt. *Vg1* wandert dann zum Kortex und wird dort in den Stadien III und IV verankert. Schließlich nimmt es den gesamten vegetativen Kortex von der Spitze bis zum Äquator ein Abb. 1.3 (Kloc und Etkin 1995).



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung des späten Transportweges.**

Die spät lokalisierenden RNAs sind blau dargestellt, die mitochondriale Wolke weiß. Die RNA ist in frühen Oozyten im gesamten Cytoplasma außer der mitochondrialen Wolke zu finden. Im Stadium III wandert sie zum vegetativen Pol und bedeckt in späten Oozyten den gesamten vegetativen Kortex. Rechts ist die Ausrichtung der animal-vegetativen (A-V) Achse angegeben (Abbildung modifiziert nach Kloc und Etkin 1995).

Einige RNAs zeigen allerdings ein Lokalisierungsmuster, welches sich keinem der beiden Transportwege eindeutig zuordnen lässt, wie z.B. *fatvg*, *XPace4* und *Hermes*. Man findet sie in Stadium I und II Oozyten zwar in der mitochondrialen Wolke, in späteren Stadien sind sie aber wie *Vg1* über den gesamten Kortex der vegetativen Oozytenhälfte verteilt (Chan *et al.* 1999; Zearfoss *et al.* 2004; Birsoy *et al.* 2005). Deshalb wird dieser Transportweg als intermediär bezeichnet. Inwiefern der frühe und der späte Weg bei der Lokalisierung intermediärer RNAs konkret überlappen, liegt bisher allerdings im Dunkeln.

In den folgenden Abschnitten soll nun auf die Funktionen der vegetativ lokalisierten RNAs bzw. ihrer Proteinprodukte in der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* näher eingegangen werden.

#### **1.4. Die Bedeutung der RNA-Lokalisierung in der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis***

Die asymmetrische Verteilung bestimmter RNAs wurde ungefähr zur selben Zeit in den Oozyten von *Drosophila melanogaster* und *Xenopus laevis* entdeckt (Weeks *et al.* 1985; Frigerio *et al.* 1986). Die Möglichkeit, Fruchtfliegen mit hoher Effizienz genetisch zu manipulieren, führte aber dazu, dass die Bedeutung der RNA-Lokalisierung für die frühe Embryonalentwicklung zuerst in *Drosophila* demonstriert werden konnte. Die intrazelluläre RNA-Verteilung in *Drosophila* Oozyten und daraus resultierende Proteingradienten in den Embryonen sind die Voraussetzung für die Achsenspezifizierung und die daraus resultierende Musterbildung, sowie für die Entwicklung primordialer Keimzellen. Im Folgenden soll erläutert werden, inwieweit dies auch auf die Lokalisation von RNAs in *Xenopus* Oozyten zutrifft.

##### **1.4.1. Die Beteiligung früh lokalisierter mRNAs an der Keimzell-Entwicklung**

RNAs, die den frühen Transportweg für die Lokalisierung nutzen, reichern sich am vegetativen Pol in derselben Region an wie das Keimplasma, welches später die Urkeimzellen spezifiziert. Diese Kolo-kalisation kann auch während der frühen Embryogenese noch beobachtet werden (Houston *et al.* 1998; MacArthur *et al.* 1999; Berekelya *et al.* 2003; Tarbashevich *et al.* 2007). *Xpat* mRNA ist sogar bis zum Embryonal-Stadium 40 in den primordialen Keimzellen zu finden und dient als molekularer Marker für diese Zellen (Hudson und Woodland 1998). Es wurde deshalb postuliert, dass früh lokalisierte RNAs maßgeblich an der Entwicklung der primordialen Keimzellen beteiligt sind. Allerdings gibt es bisher nur wenige Studien, in denen ein direkter Zusammenhang nachgewiesen werden kann. So scheint *XGrip* für das Überleben und die Migration der Urkeimzellen verantwortlich zu sein (Tarbashevich *et al.* 2007). Die Herunterregulation der Expression von *XDazl* blockiert ebenso die Keimzellentwicklung und –wanderung (Houston und King 2000). Die frühe Assoziation dieser mRNAs mit dem Keimplasma scheint also ein effektiver Weg zu sein, um Proteine spezifisch in den frühen Urkeimzellen zu exprimieren.

Interessanterweise gibt es auch eine spät lokalisierte RNA, deren Produkt für die Keimzellbildung wichtig ist. Dem Lokalisierungsmuster in der Oozyte nach kann *XDead*

*end* eindeutig dem späten Transportweg zugeordnet werden (Horvay *et al.* 2006). Allerdings ist die RNA in Zweizell-Embryonen mit dem Keimplasma assoziiert. Im Schwanzknospenstadium ist *XDead end* ähnlich wie *Xpat* spezifisch in den primordialen Keimzellen zu finden. Eine Herunterregulierung der *XDead end* Proteinexpression hat den Verlust der Keimzellen zur Folge (Horvay *et al.* 2006).

Erst kürzlich wurde entdeckt, dass die Keimplasma-assoziierten RNAs *DEADSouth* und *XDead end* die Eigenschaft besitzen, in *Xenopus* in den primordialen Keimzellen spezifisch angereichert zu werden (Kataoka *et al.* 2006; Koebernick *et al.*, Manuskript eingereicht). Diese Eigenschaft von RNAs, die für die Entwicklung primordialer Keimzellen verantwortlich sind, war bisher nur im Zebrafisch bekannt (Koprunner *et al.* 2001).

#### 1.4.2. Die Bedeutung spät lokalisierter mRNAs für die frühen Musterbildung

RNAs die über den späten Weg zum vegetativen Pol transportiert werden, werden am Kortex der gesamten vegetativen Hemisphäre verankert. Ähnlich wie in der Fruchtfliege könnte die Lokalisierung dieser RNAs zur Ausbildung von Proteingradienten im Embryo führen, die z. B. für die Achsenspezifizierung notwendig sind.

*Vg1*, die erste bekannte vegetal lokalisierende mRNA kodiert für ein Mitglied der TGF- $\beta$ -Familie und wird als Propeptid ab dem Oogenese-Stadium IV bis zum Gastrula-Stadium exprimiert. Deshalb gab es schon früh die Vermutung, dass es als vegetal exprimierter Signalfaktor eine Rolle in der Induktion des Mesoderms spielen könnte.

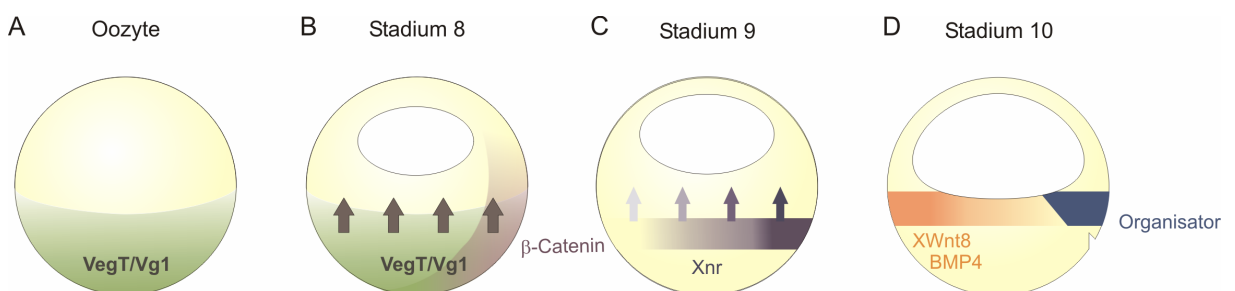
Um den Funktionsverlust von *Vg1* zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Strategien angewendet. Die Überexpression dominant-negativer Versionen von *Vg1* führt zum Verlust des Mesoderms (Joseph und Melton 1998). Wird *Vg1* zerstört, werden dorsale Markergene herunter und ventrale Marker hochreguliert. Dieser Effekt kann durch die Injektion von *Vg1* mRNA neutralisiert werden (Birsoy *et al.* 2006).

Die Überexpression der aktiven Form von *Vg1* Protein induziert in animalen Kappen dorsal-mesodermale Strukturen. Expression in ventralen Zellen führt zur Ausbildung einer zweiten Achse (Dale *et al.* 1993) und zur Rettung der UV-induzierten Ventralisierung von Embryonen (Thomsen und Melton 1993). Außerdem wird die Ventralisierung  $\beta$ -Catenin-depletierter Embryonen durch *Vg1* gerettet (Wylie *et al.* 1996). Schließlich konnten Agius *et al.* zeigen, dass *Vg1* die Expression der *Xenopus Nodal-related (Xnr)* Gene aktiviert, die wiederum für die Spezifizierung des Mesoderms benötigt werden. Diese Aktivierung erfolgt synergistisch mit  $\beta$ -Catenin, das im Embryo

an der dorsalen Seite vorliegt (Agius *et al.* 2000). Diese Erkenntnis führte zur Entwicklung folgenden Modells (Abb. 1.4): Unter dem vegetalen Einfluss von *Vg1* und dem dorsalen Einfluss von  $\beta$ -Catenin entsteht im Embryo ein *Xnr*-Konzentrationsgradient, der von dorsal nach ventral abnimmt. Hohe Konzentrationen von *Xnr* führen zur Expression dorsaler Gene und der Ausbildung des Spemann-Organisators, mittlere Konzentrationen haben die Bildung lateralen Mesoderms zur Folge und schließlich werden in Regionen mit niedriger *Xnr*-Konzentration ventrale Gene exprimiert und ventrales Mesoderm gebildet. *Vg1* ist also ein endodermales Signal zur Induktion von Mesoderm und die vegetative Lokalisation der *Vg1* RNA damit eine Grundvoraussetzung für seine spezifisch endodermale Expression.

Auch *VegT*, das ebenfalls über den späten Weg lokalisiert wird, spielt eine Rolle bei der Induktion des Mesoderms. So induziert der Transkriptionsfaktor *VegT* wie *Vg1* die Expression endodermaler und mesodermaler Gene (Abb. 1.4, Zhang und King 1996; Clements *et al.* 1999). Nach der Depletion von *VegT* werden mesodermale Marker dagegen gar nicht oder verspätet exprimiert (Zhang *et al.* 1998).

*XPace4*, das über dem intermediären Weg lokalisiert wird, ist in diesem Zusammenhang besonders interessant. Die *XPace4* RNA kodiert für eine Pro-Protein-Konvertase, zu deren Substraten nicht nur *Vg1*, sondern auch *Xnr1* – 3 gehören. Es ist essentiell für die Prozessierung dieser Mesoderm-induzierenden Signalfaktoren und somit maßgeblich an der Mesoderm-Spezifizierung beteiligt (Birsoy *et al.* 2005).



**Abb. 1.4: Modell der Mesoderm- und Spemann-Organisator-Induktion durch Zusammenwirken vegetal lokalisierter und dorsaler Faktoren.**

(A) In der Oozyte liegen die *Vg1* und *VegT* mRNAs am vegetalen Kortex vor. (B) Im Stadium 8 sind beide Faktoren in der vegetalen Blastula-Hälfte zu finden, während  $\beta$ -Catenin auf der dorsalen Seite des Embryos vorliegt. (C) *Vg1* und *VegT* aktivieren synergistisch mit  $\beta$ -Catenin die *Xnr*-Gene. Dies führt zu einem *Xnr*-Gradienten mit der höchsten Konzentration auf der dorsalen Seite. (D) Der *Xnr*-Gradient spezifiziert das Mesoderm. Hohe Konzentrationen auf der dorsalen Seite führen zur Ausbildung des Spemann-Organisators. Niedrige Konzentrationen auf der ventralen Seite haben die Expression von *Xwnt8* und *BMP4* und die Bildung ventralen

Mesoderms zur Folge. Die Regionen mit mittleren Xnr-Konzentrationen bilden laterales Mesoderm. (Abbildung modifiziert nach Agius *et al.* 2000).

Weitere Beispiele lokalisierter mRNAs, die die frühembryonale Musterbildung beeinflussen sind *fatvg*, dessen Depletion eine Ventralisierung zur Folge hat (Chan *et al.* 2007) und *XBicaudal-C*, dessen RNA spät lokalisiert, und das die Formation von Endoderm induziert (Wessely und De Robertis 2000).

## 1.5. Mechanismen der RNA-Lokalisierung

Obwohl die Bedeutung der RNA-Lokalisation in der frühembryonalen Entwicklung von *Xenopus laevis* längst etabliert ist, weiß man bisher recht wenig über die Mechanismen, über welche der Transport und die Verankerung der RNA-Moleküle ermöglicht werden.

Die Injektion von *in vitro* transkribierten Versionen vegetal lokalisierter RNAs in *Xenopus* Oozyten führt zu deren Lokalisierung an den vegetativen Pol (Yisraeli und Melton 1988; Mowry und Melton 1992). Das bedeutet, dass die Information, die die RNA für die Lokalisierung markiert, in ihr selbst vorhanden ist. Tatsächlich gibt es Regionen innerhalb der RNA, die sowohl ausreichend und als auch notwendig sind, um den Transport zum und die Verankerung am vegetativen Kortex der Oozyte zu vermitteln. Da diese Bereiche selbst Teil der lokalisierenden RNA-Moleküle sind, werden sie als *cis*-agierende Lokalisationselemente bezeichnet.

Die RNA-Elemente werden spezifisch von Proteinen gebunden, die als *trans*-agierende Faktoren bezeichnet werden. Zumindest für den späten Transportweg konstituieren diese Faktoren die Lokalisationsmaschinerie, die die RNA aktiv zum Kortex transportiert und dort verankert. Es wird angenommen, dass neben RNA-Bindeproteinen auch Adaptor- und Motorproteine im Transportkomplex enthalten sind (Jansen 2001; Tekotte und Davis 2002; Czaplinski und Singer 2006).

In den folgenden Unterkapiteln soll auf die Bedeutung der *cis*-Elemente und der *trans*-Faktoren anhand bereits beschriebener Beispiele näher eingegangen werden.

### 1.5.1. *Cis*-Elemente in der RNA vermitteln die Lokalisierung

Es wurden mittlerweile viele Lokalisationselemente identifiziert, die für den Transport sowohl früh als auch spät lokalisierender RNAs verantwortlich sind (Mowry und Melton 1992; Zhou und King 1996; Chan *et al.* 1999; Betley *et al.* 2002; Kwon *et al.* 2002; Claussen *et al.* 2004; Claussen und Pieler 2004; Horvay *et al.* 2006). Diese Regionen befinden sich meist in der 3' untranslatierten Region der RNA. Bislang ist nur

ein einziger Fall bekannt, in dem das Lokalisationselement in der 5' UTR zu finden ist (Claussen *et al.* 2004).

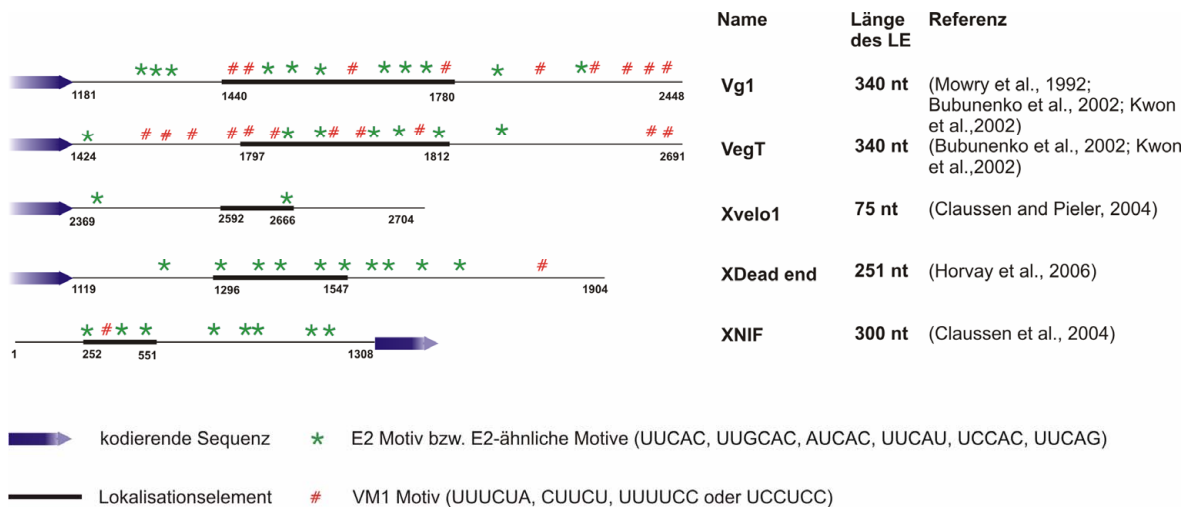
Doch welche Eigenschaften machen ein RNA-Fragment zu einem Lokalisationselement? Zunächst wurde davon ausgegangen, dass bestimmte Sequenzmotive die RNA für den Transport markieren. Im Lokalisationselement von *Vg1* finden sich eine Reihe sehr kurzer Basenabschnitte (E1 bis E4), die wiederholt auftreten. Deletionsexperimente zeigten, dass von diesen die E2-Motive (UUCAC, UUGCAC) für die Lokalisation von *Vg1* unentbehrlich sind (Abb. 1.5, Deshler *et al.* 1997).

Unabhängig davon wurde ein zweites Motiv (Vg1-Motiv 1 - VM1) identifiziert, welches in mehreren Kopien ebenso für den RNA-Transport notwendig zu sein scheint (Abb. 1.5, Gautreau *et al.* 1997). Wird VM1 innerhalb eines synthetischen Lokalisationselementes durch Mutationen zerstört, kann die RNA nicht mehr vegetal lokalisiert werden (Gautreau *et al.* 1997). Allerdings ist allein die Präsenz der Motive nicht ausreichend, wichtig für die Lokalisierung sind außerdem ihre Anzahl und ihre räumliche Anordnung (Lewis *et al.* 2008).

Auch die Lokalisationselemente anderer RNAs enthalten E2 und VM1 Motive, wie z.B. *VegT* (Bubunenko *et al.* 2002; Kwon *et al.* 2002), *DEADSouth* (MacArthur *et al.* 2000), *Xcat-2* (Zhou und King 1996) oder *XDazl* (Betley *et al.* 2002). Interessant ist hierbei, dass diese Sequenzmotive in den Lokalisationselementen sowohl früh als auch spät lokalisierter mRNAs zu finden sind.

Es gibt allerdings auch eine Reihe lokalisierter mRNAs, deren Lokalisationssignale überhaupt keine VM1-Motife (z. B. *XDead end*, *fatvg*) oder nur eine einzige Kopie des E2-Motivs (*Xvelo1*, *Xwnt11*) enthalten (Abb. 1.5, Chan *et al.* 1999; Betley *et al.* 2002; Claussen und Pieler 2004; Horvay *et al.* 2006). Trotzdem lokalisieren diese mRNAs über den frühen, den intermediären oder den späten Transportweg. Dies zeigt, dass die Ansammlung kurzer Sequenzmotive zwar ausreichend sein kann, aber nicht in allen Fällen für die Lokalisierung notwendig ist.





**Abb. 1.5: Lokalisationselemente vegetal lokalisierter mRNAs.**

Schematische Darstellung der Lokalisationselemente beispielhafter RNA-Moleküle. Die kodierende Sequenz ist als blauer Pfeil, die untranslatierte Region als dünner, das Lokalisationselement als dicker Strich dargestellt. Grüne Sterne bezeichnen E2-Motive, rote Rauten stehen für VM1-Motive. Die jeweilige Nukleotidposition ist in Zahlen unterhalb der RNA angegeben. Während die Lokalisationselemente von *Vg1* und *VegT* reich an E2- und VM1-Motiven sind, besitzen *Xvelo1*, *XDead end* und *XNIF* nur wenige oder gar keine dieser Motive (Darstellung nach Horvay *et al.* 2005).

Vielmehr könnten zusätzlich sekundäre oder tertiäre Strukturen für die Bindung von Proteinen und damit die Initiierung des Transportes eine Rolle spielen. So konnte für die Lokalisationselemente verschiedener RNAs aus unterschiedlichen Systemen gezeigt werden, dass die Ausbildung von Haarnadelstrukturen für die Proteinbindung und die intrazelluläre Lokalisation notwendig ist. Werden die Doppelstränge bzw. bestimmte einzelsträngige Bereiche innerhalb der Haarnadeln durch Mutationen zerstört, können die RNAs nicht mehr lokalisieren. Als Beispiel können an dieser Stelle die *ASH1* mRNA der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Olivier *et al.* 2005), *bicoid* und *wingless* aus *Drosophila melanogaster* (Macdonald und Kerr 1998; dos Santos *et al.* 2008) und *Xvelo1* RNA aus *Xenopus laevis* (Claussen und Pieler 2004) angeführt werden.

### 1.5.2. Die Bedeutung *trans*-agierender Faktoren in der RNA-Lokalisierung

Die Lokalisationselemente der frühen RNAs werden in der METRO-Region der mitochondrialen Wolke von bisher unbekanntem Strukturen gebunden.

Für spät lokalisierte RNAs wurden mittlerweile jedoch verschiedene Interaktionen mit *trans*-agierenden Faktoren nachgewiesen. Welche Bedeutung diese Proteine für den Transportprozess entlang des späten Lokalisationsweges haben, soll im Folgenden anhand der bisher bekannten Beispiele besprochen werden.

#### 1.5.2.1. Vg1RBP / Vera

Der erste sogenannte Lokalisationsfaktor, der identifiziert wurde, ist das Vg1-RNA-bindende Protein (Vg1RBP), das von zwei Gruppen unabhängig voneinander entdeckt wurde (Deshler *et al.* 1998; Havin *et al.* 1998). Da es im Saccharose-Gradienten mit einem Marker des endoplasmatischen Retikulums (ER) kosedimentiert, wird es auch Vg1-bindendes und ER-assoziiertes Protein (Vera) genannt (Deshler *et al.* 1997).

Vg1RBP wird während der gesamten Oogenese gleichmäßig exprimiert (Zhang *et al.* 1999b) und besteht ausschließlich aus RNA-Bindungsdomänen, nämlich aus zwei N-terminalen RNA-Erkennungsmotiven (RRM 1 und 2) und vier C-terminalen hnRNP-K-Homologie-Domänen (KH1 bis 4). Vg1RBP konnte im Kern von *Xenopus* Oozyten durch *Western Blot* nachgewiesen werden (Kress *et al.* 2004), allerdings zeigen *Whole Mount* Immunfluoreszenzanalysen zwar Lokalisation des Proteins am vegetativen Oozytenkortex, aber keine Kernlokalisierung (Zhang *et al.* 1999b; Rand und Yisraeli 2007).

Zur Isolierung von Vg1RBP wurde die Eigenschaft des Proteins genutzt, sich mit dem Lokalisationselement von *Vg1* unter UV-Bestrahlung zu vernetzen. Dabei zeigte sich, dass es bevorzugt an die oben beschriebenen E2-Motive bindet, nicht aber an Regionen außerhalb des Lokalisationselementes. Da die *Vg1* RNA nicht mehr lokalisiert, wenn die E2-Motive deletiert werden, kommt Vg1RBP als möglicher Transportfaktor in Frage (Deshler *et al.* 1997). Ein weiteres Indiz für die wichtige Bedeutung Vg1RBPs in der RNA-Lokalisation ist die Tatsache, dass es auch an das Lokalisationselement von *VegT* E2-abhängig bindet und *VegT* mit mutierten E2-Motiven nicht mehr vegetativ lokalisiert wird (Kwon *et al.* 2002). Darüber hinaus wurde berichtet, dass die Injektion von anti-Vg1RBP-Antikörpern in *Xenopus* Oozyten die Lokalisation von *Vg1* und *VegT* RNA inhibiert (Kwon *et al.* 2002).

Vg1RBP ko-präzipitiert auch mit weiteren möglichen Transportfaktoren, nämlich den Proteinen VgRBP60, Prrp und Staufen (Kress *et al.* 2004), sowie 40LoVe (Czaplinski und Mattaj 2006), die unten im Detail besprochen werden. Direkte Protein-

Protein-Interaktionen zwischen Vg1RBP und diesen Faktoren sind bisher jedoch im Zytoplasma nicht gefunden worden; vielmehr scheinen die Interaktionen auf der Bindung an dieselbe RNA zu beruhen. Eine interessante Ausnahme stellt hier jedoch VgRBP60 dar. Wie Vg1RBP ist auch dieses Protein im Zellkern zu finden und bindet dort an Vg1RBP in RNA-unabhängiger Weise. Auch die Bindung von Vg1RBP an *Vg1* und *VegT* mRNA findet bereits im Zellkern statt (Kress *et al.* 2004).

Vg1RBP stellt damit einen wichtigen Lokalisationskomplex-Marker dar, der sich als Köder für die Aufreinigung anderer *trans*-agierender Proteine empfiehlt.

#### 1.5.2.2. Prrp

Das Prolin-reiche RNA-bindende Protein (Prrp) wurde in einem *Screen* isoliert, in dem eine Proteinexpressionsbibliothek nach *Vg1*-Lokalisationselement-bindenden Proteinen durchsucht wurde. Es besteht aus zwei N-terminalen RRM-Domänen und einem unstrukturierten, Prolin-reichen C-Terminus. Es bindet *in vivo* an spät, jedoch nicht an früh lokalisierte RNAs (Zhao *et al.* 2001). Im Stadium I kann Prrp im *Western Blot* noch nicht detektiert werden, allerdings steigt die Menge des Proteins vom Stadium II bis zum Stadium VI kontinuierlich an. In einer Immunfluoreszenzanalyse ist Prrp jedoch schon in Stadium I sichtbar. Bis zum Stadium III ist Prrp im gesamten Zytoplasma zu sehen, während es ab Stadium IV am vegetativen Kortex akkumuliert und mit Vg1RBP ko-lokalisiert (Zhao *et al.* 2001). Prrp ist ein rein zytoplasmatisches Protein, welches RNA-abhängig an Vg1RBP und an VgRBP60 bindet. Außerdem assoziiert es RNA-unabhängig mit Staufen, das später noch detailliert besprochen wird (Kress *et al.* 2004). Wie andere Prolin-reiche Proteine auch, bindet Prrp an Profilin, ein Protein, welches die Filamentierung von Aktin fördert (Zhao *et al.* 2001). Diese Interaktion lässt vermuten, dass Prrp eine Rolle bei der Verankerung der RNAs an kortikalen Mikrofilamenten spielen könnte.

Interessanterweise ist Prrp eine Isoform von *Xenopus* Dazap1, einem kerngängigen Protein, welches in Mäusen an die Proteine Daz bzw. Dazl bindet (Tsui *et al.* 2000). Prrp entsteht wahrscheinlich durch alternatives Spleißen und besitzt das Kernimportsignal von Dazap1 nicht (unveröffentlichte Daten). Für Dazap1 wurde bisher keine Funktion in der RNA-Lokalisierung vorgeschlagen.

#### 1.5.2.3. VgRBP60 / PTB / hnRNP I

Wie Vg1RBP und Prrp wurde auch VgRBP60 aufgrund seiner Bindung an Teile des *Vg1* Lokalisationselementes identifiziert und aufgereinigt. Dabei wurde deutlich, dass dieses Protein bevorzugt an die VM1-Motive bindet (Cote *et al.* 1999). Die Mutation dieser Motive inhibiert die Bindung des Proteins an die RNA (Cote *et al.* 1999; Lewis *et al.* 2004). VgRBP60 ist eng verwandt mit hnRNP I bzw. dem Polypyrimidin-

Trakt-bindenden Protein (PTB) und besitzt wie diese vier RRM-Domänen. Das Protein ist kerngängig und wird während der gesamten Oogenese exprimiert. In Stadium III und IV Oozyten findet man es kolokalisierend mit *Vg1* RNA am vegetativen Kortex angereichert (Cote *et al.* 1999; Kress *et al.* 2004). Ebenso wie Vg1RBP bindet VgRBP60 schon im Kern an *Vg1* und *VegT* mRNA. Außerdem bindet VgRBP60 *in vitro* an 40LoVe (Czaplinski und Mattaj 2006) und Vg1RBP (Kress *et al.* 2004), im Oozytenkern an Vg1RBP und im Zytoplasma an Prrp und Vg1RBP. Interessant ist hierbei, dass die Interaktion mit Vg1RBP im Kern unabhängig von RNA ist, im Zytoplasma allerdings von der Anwesenheit von RNA abhängt (Kress *et al.* 2004). Dies deutet auf einen Remodellierungsschritt des RNP-Komplexes nach dem Export aus dem Kern hin, auf den weiter unten eingegangen werden soll.

#### 1.5.2.4. Staufen

Staufen wurde zunächst in *Drosophila* identifiziert und wegen seiner posterioren Anreicherung in der späten Oozyte mit lokalisierten RNAs in Verbindung gebracht (St Johnston *et al.* 1991). Mutationen in Staufen verhindern die Lokalisation von *oskar* mRNA (Ferrandon *et al.* 1994). Auch in anderen Systemen gibt es Zusammenhänge zwischen Staufen und dem Transport von RNA-Molekülen. So findet man Staufen z. B. in RNPs, die sich in Dendriten an Mikrotubuli entlang bewegen (Kohrmann *et al.* 1999). *Xenopus* Staufen wurde von zwei Gruppen unabhängig voneinander isoliert (Allison *et al.* 2004; Yoon und Mowry 2004). Es gibt zwei Isoformen (Staufen 1 und 2), die beide aus fünf Doppelstrang-RNA-bindenden Domänen (dsRBD) und einer Tubulin-bindenden Domäne bestehen (TBD). Staufen 1 wird über die gesamte Oogenese hinweg exprimiert, während Staufen 2 erstmals in Stadium III Oozyten detektierbar ist. Beide Proteine liegen ausschließlich cytoplasmatisch vor (Allison *et al.* 2004). Ähnlich wie Prrp bindet Staufen 1 zwar an die späten RNAs *Vg1* und *VegT*, aber nicht an die früh lokalisierenden *Xcat2* und *Xwnt11* (Yoon und Mowry 2004). Außerdem läßt sich in Immunofluoreszenz-Färbungen eine Anreicherung von Staufen 1 am vegetativen Kortex und eine Kolokalisation mit *Vg1* RNA in Stadium III Oozyten feststellen. Staufen 1 ko-migriert im Dichtegradienten mit Kinesin und kann mit diesem auch immunopräzipitiert werden (Yoon und Mowry 2004). Eine dominant-negative Variante von Staufen 1, bei der zwei RNA-Bindedomänen und die Tubulin-bindende Domäne deletiert wurden, verhindert bei Überexpression die vegetative Lokalisation von injizierter *Vg1* RNA. Die Bindung dieses dominant-negativen Proteins an VgRBP60 ist stark eingeschränkt (Yoon und Mowry 2004). Staufen scheint also auch in *Xenopus* Oozyten eine bedeutende Rolle in der RNA-Lokalisation zu spielen.

### 1.5.2.5. 40LoVe

Auch für die Isolierung von 40LoVe (für 40 kDa, Lokalisation, vegativ) wurde dessen Eigenschaft, mit großer Affinität an das *Vg1* Lokalisationselement zu binden, ausgenutzt (Czaplinski *et al.* 2005). Das Protein gehört zur hnRNP-D-Familie und enthält zwei RRM-Domänen, eine Glycin-reiche Domäne sowie ein C-terminales Kernimport-Signal. Es gibt drei Isoformen verschiedener Größe, wobei nicht bekannt ist, ob sich diese funktionell unterscheiden. 40LoVe wird während der gesamten Oogenese exprimiert und ist sowohl im Kern als auch im Zytoplasma zu finden (Czaplinski und Mattaj 2006).

Die Assoziation von 40LoVe mit der *Vg1* RNA ist für die Bindung von Vg1RBP und VgRBP60 an dieses RNA-Molekül nicht essentiell. Ob dies auch umgekehrt der Fall ist, wurde noch nicht untersucht. Da rekombinantes 40LoVe *in vitro* an rekombinantes VgRBP60 bindet, scheint es zwischen beiden Proteinen auch eine RNA-unabhängige Protein-Protein-Interaktion zu geben (Czaplinski *et al.* 2005; Czaplinski und Mattaj 2006).

### 1.5.3. Die Rolle des Zytoskeletts bei der Lokalisierung und Verankerung der RNAs

Es konnte bereits sehr früh gezeigt werden, dass sowohl der Transport spät lokalisierender RNAs, als auch die Verankerung sowohl früh als auch spät lokalisierender RNAs am vegetativen Kortex von Komponenten des Zytoskeletts abhängig sind. So findet man *Vg1* und *Xcat2* mRNA und auch andere lokalisierte RNAs in besonders großen Mengen in einer Detergenz-unlöslichen Oozyten-Fraktion, welche stark mit Zytokeratin angereichert ist (Pondel und King 1988; Yisraeli *et al.* 1990; Mosquera *et al.* 1993; Bubunenکو und King 2001; Horvay *et al.* 2006). Dies deutet darauf hin, dass lokalisierte mRNAs mit Komponenten des Zytoskeletts assoziieren und gab Anlass, diese Vermutung experimentell zu überprüfen. Dabei fand man heraus, dass die Zerstörung der Aktin-Mikrofilamente keinen Einfluß auf die vegetative Lokalisierung der späten *Vg1* RNA hat. Werden aber die Mikrotubuli zerstört, kann die Lokalisation von *Vg1* fast vollständig verhindert werden (Yisraeli *et al.* 1990). Die Assoziation früher RNAs mit der mitochondrialen Wolke und ihre Lokalisation zum vegetativen Pol wird dadurch allerdings nicht beeinflusst (Kloc und Etkin 1995). Der Transport auf dem späten Weg ist also von intakten Mikrotubuli abhängig, der frühe Weg jedoch nicht. Werden die kortikalen Aktin-Mikrofilamente durch Inhibitoren zerstört, löst sich das Zytoplasma und die verankerten RNA-Moleküle vom Kortex ab, der Transport selbst wird aber nicht beeinflusst. Dies gilt sowohl für früh

als auch für spät lokalisierte RNAs (Kloc und Etkin 1995). Das Aktin-Skelett scheint also weniger beim Transport selbst, als vor allem bei der kortikalen Verankerung eine Rolle zu spielen.

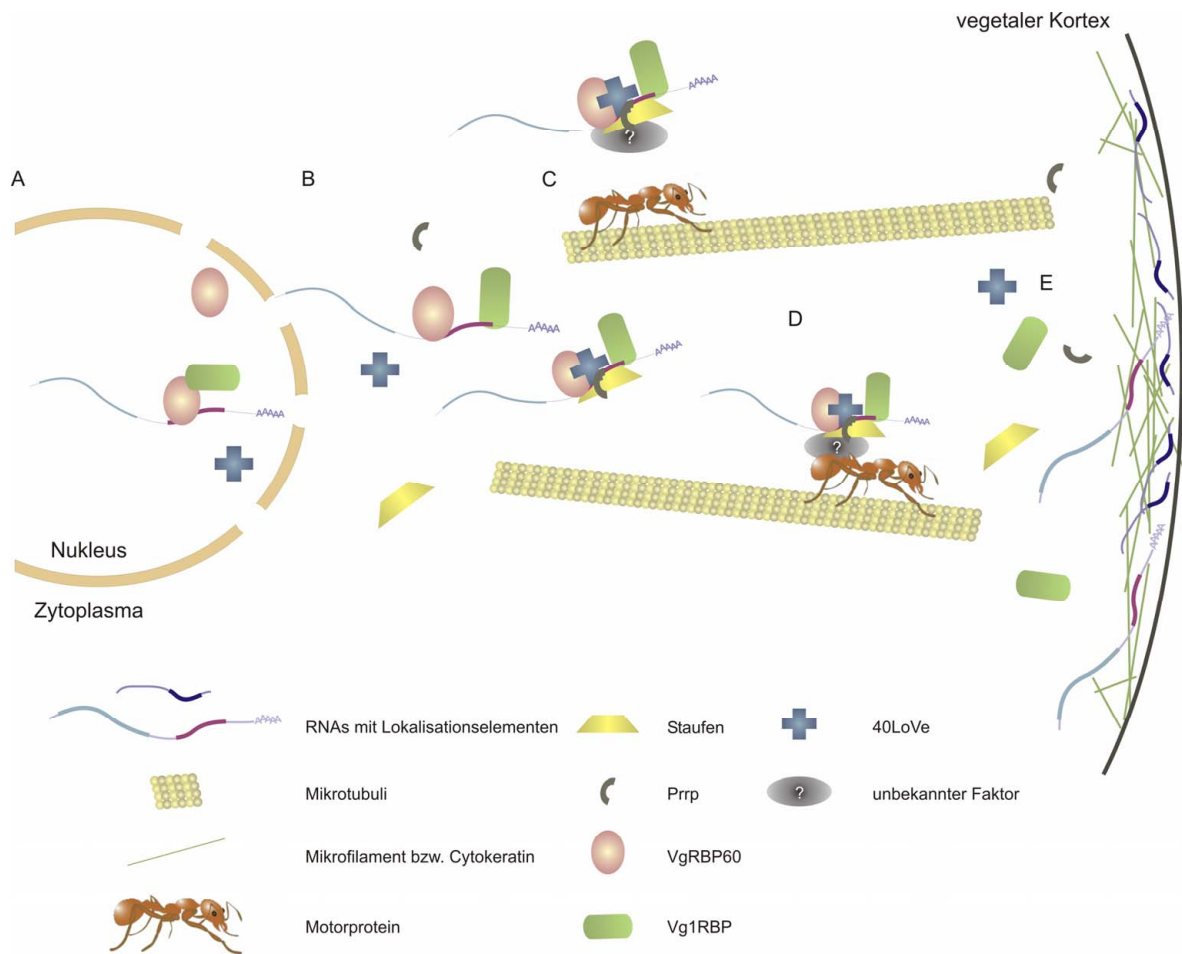
Doch nicht nur Proteinkomponenten des Zytoskeletts sind für die korrekte Lokalisierung von RNA-Molekülen von Bedeutung. Bestimmte lokalisierte RNAs selbst sind für die Integrität des Kortex-Skeletts und deshalb für die Verankerung anderer RNAs notwendig. So gibt es eine Familie nicht-kodierender RNAs mit kurzen repetitiven Sequenzmotiven (*Xenopus laevis* *short interspersed repeat transcripts*, *Xsirts*), welche den frühen Transportweg zum vegetativen Kortex nutzt (Kloc *et al.* 1993). Werden diese RNAs zerstört, kann *Vg1* RNA nicht mehr lokalisieren (Kloc und Etkin 1994). Auch die Depletion der spät lokalisierten *VegT* RNA hat eine Ablösung verschiedener früher (*Xwnt11*) und später Transkripte (*Vg1*, *Bic-C*) vom vegetativen Kortex zur Folge (Heasman *et al.* 2001). Eine genaue Untersuchung zeigte, dass sich die Struktur des kortikalen Zytokeratin-Netzwerkes nach der Zerstörung von *Xsirts* bzw. *VegT* verändert. Die Depletion von *Xsirts* hat eine Abflachung bzw. Kollabierung des dreidimensionalen Netzwerkes zur Folge, während der Verlust von *VegT* eine Fragmentierung der Filamente verursacht (Kloc *et al.* 2005).

#### **1.5.4. Model des RNA-Transportes entlang des späten Lokalisationsweges**

Die oben beschriebenen Faktoren scheinen alle Teil des Lokalisationskomplexes der *Vg1* RNA zu sein. In welchen Beziehungen sie aber zueinander stehen und welche Aufgaben sie erfüllen, ist noch nicht vollständig verstanden. Die bisher erworbenen Kenntnisse erlauben allerdings die Konstruktion eines Modells, das eine gute Basis für zukünftige experimentelle Arbeiten bietet (Abb. 1.6).

##### **1.5.4.1. Bildung des primären RNP-Komplexes im Kern**

*Vg1RBP* und *VgRBP60* binden bereits im Zellkern an die *Vg1* und *VegT* Lokalisationselemente. Außerdem binden sie RNA-unabhängig aneinander (Abb. 1.6A, (Kress *et al.* 2004). Ob dieser Komplex schon während oder erst nach Abschluß der Transkription geformt wird, ist noch unklar. Es ist aber zu vermuten, dass die RNA dadurch für die vegetative Lokalisierung markiert wird. *Vg1RBP* bindet nicht direkt an das Lokalisationselement, sondern die Assoziation wird vermutlich über *VgRBP60* oder einen anderen, bisher unbekanntem Faktor vermittelt (Lewis *et al.* 2008). Es ist weiterhin nicht bekannt, ob das ebenfalls kerngängige 40LoVe bereits zu diesem Zeitpunkt Teil des Komplexes ist.



**Abb. 1.6: Schematische Darstellung des Mikrotubuli-abhängigen RNA-Transportes in der *Xenopus* Oozyte.**

Der vegetative Pol ist rechts abgebildet. (A) Assemblierung des vorläufigen RNA-Protein-Komplexes im Kern. VgRBP60 bindet direkt an das Lokalisationselement, während Vg1RBP wahrscheinlich indirekt mit der RNA assoziiert. (B) Export des RNPs aus dem Kern und Remodellierung des Komplexes. Vg1RBP bindet nun auch direkt an die RNA. (C) Formation des Transportkomplexes. Weitere Proteine wie Staufen, Prp und 40LoVe lagern sich an. Der Komplex rekrutiert, evt. über bisher unbekannte Adaptoren, ein Motorprotein. (D) Transport des RNA-Protein-Komplexes zum vegetativen Kortex. (E) Dissoziation des Komplexes und Verankerung der RNA am kortikalen Zytoskelett. (Abbildung modifiziert nach Tekotte *et al.* 2002, Kress *et al.* 2004, Yoon and Mowry 2004, Czaplinski *et al.* 2005, Lewis *et al.* 2008).

#### 1.5.4.2. Remodellierung und Assemblierung des Transportkomplexes

Der RNP-Komplex, bestehend aus der RNA, Vg1RBP, VgRBP60 und vermutlich weiteren Faktoren, wird aus dem Kern ins Zytoplasma exportiert, wo anschließend eine Neuorganisation des Komplexes stattfindet (Abb. 1.6B). Vg1RBP bindet erstmals direkt an die *Vg1* RNA (Lewis *et al.* 2008) und der ehemals RNA-unabhängige Kontakt zu

VgRBP60 wird nun durch RNA vermittelt (Kress *et al.* 2004). Dennoch scheint VgRBP60 weiterhin für die Assoziation von Vg1RBP mit der RNA benötigt zu werden (Lewis *et al.* 2008). Zusätzlich stoßen nun auch die cytoplasmatischen Proteine wie Staufen und Prrp zum Komplex hinzu (Abb. 1.6C). Während die Interaktionen zwischen Prrp, Vg1RBP und VgRBP60 durch RNA vermittelt werden, binden Prrp und Staufen RNA-unabhängig aneinander (Kress *et al.* 2004). Ob dies auch für die anderen Faktoren zutrifft, ist bisher unklar. Auch 40LoVe ist nun Teil des Transportkomplexes und interagiert mit Vg1RBP und VgRBP60 (Czaplinski und Mattaj 2006). Interessanterweise verhindert die Depletion von 40LoVe aus dem Oozytenextrakt nicht die Bindung von Vg1RBP und VgRBP60 an die RNA. 40LoVe scheint also für die Interaktion der beiden Proteine mit *Vg1* RNA nicht benötigt zu werden (Czaplinski *et al.* 2005).

Die Anwesenheit multipler Bindungsmotive innerhalb eines Lokalisationselementes könnte zur Assoziation mehrerer identischer Proteine an ein RNA-Molekül führen. Ob die oben beschriebenen Proteine tatsächlich in mehreren Kopien an die RNA binden, ist bisher jedoch nicht geklärt.

#### **1.5.4.3. Mikrotubuli-abhängiger Transport des Komplexes zum vegetativen Kortex**

Für den späten Transportweg ist ein intaktes Mikrotubuli-Netzwerk essentiell (Yisraeli *et al.* 1990; Kloc und Etkin 1995), entlang dessen der Komplex mit Hilfe von Motorproteinen transportiert werden kann. Über 90% der Mikrotubuli in *Xenopus* Oozyten sind mit ihrem Plus-Ende zum Zellinneren orientiert (Pfeiffer und Gard 1999). Die Motorproteine müssen sich also höchstwahrscheinlich in Richtung des Minus-Endes bewegen, um die RNA-Moleküle entlang der Tubuli zum Kortex zu bringen. Daher kommen als Motorproteine sowohl Dyneine als auch spezialisierte Kinesine in Frage. Es kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass der geringe Anteil der Mikrotubuli für den Transport genutzt wird, deren Plus-Enden zum Kortex gerichtet sind. In diesem Fall wäre die Nutzung konventioneller Kinesine möglich.

Mittlerweile gibt es verschiedene Hinweise auf die Beteiligung von Kinesin beim RNA-Transport in *Xenopus* Oozyten. Allerdings wurde bisher in den dazu durchgeführten Studien kein Bezug auf die Mikrotubuli-Orientierung genommen (Betley *et al.* 2004; Yoon und Mowry 2004).

Während des Transportes sind die meisten RNAs wahrscheinlich translational reprimiert. So wird z. B. *Vg1* RNA erst ab Stadium IV translatiert, wenn die RNA-Lokalisierung bereits abgeschlossen ist (Dale *et al.* 1989; Tannahill und Melton 1989;



Colegrove-Otero *et al.* 2005). Als translationaler Repressor der *Vg1* RNA wurde Elav-related Protein B (ElrB) identifiziert (Colegrove-Otero *et al.* 2005). Außerdem ist zu vermuten, dass Vg1RBP diese Funktion ebenfalls ausführt, da sein Homolog ZBP1 die Translation von lokalisierender  $\beta$ -actin mRNA in Fibroblasten inhibiert (Huttelmaier *et al.* 2005).

#### 1.5.4.4. Verankerung der RNA am Kortex und Dissoziation des Komplexes

Wenn der Lokalisationskomplex den vegetativen Pol erreicht, müssen die RNA-Moleküle vom Komplex gelöst und am Kortex verankert werden. Dass für die Integrität des Kortex-Skelettes unter anderem lokalisierte RNAs wie *XIsirts* und *VegT* benötigt werden, wurde oben bereits diskutiert. Welche Proteinkomponenten dabei aber eine Rolle spielen, ist jedoch bislang unklar. Aufgrund seiner Interaktion mit Profilin wurde vermutet, dass Prrp für die Verankerung der RNAs an die Aktin-Filamente verantwortlich sein könnte (Zhao *et al.* 2001). Experimentelle Daten gibt es dazu allerdings bisher nicht.

Auch ist bislang nicht geklärt, ob die RNA-Moleküle einzeln, in homogenen oder in heterogenen Gruppen zum Oozytenkortex transportiert werden. Da verschiedene RNAs offensichtlich an die gleichen Proteine binden (Claussen *et al.* 2004; Horvay *et al.* 2006) stellt die Multimerisierung verschiedener RNAs im selben Komplex und eine anschließende gemeinsame Lokalisierung eine elegante und energiesparende Transportmöglichkeit dar. Darüber hinaus ist in anderen Systemen die Formation und der Transport großer RNA-Protein-Partikel bereits beobachtet worden (Shan *et al.* 2003; Kanai *et al.* 2004).

## 1.6. Zielsetzung

Vg1RBP scheint ein wichtiger Bestandteil des hypothetischen Transportkomplexes zur intrazellulären RNA-Lokalisierung in der *Xenopus laevis* Oozyte zu sein, da es sowohl an verschiedene lokalisierte RNAs bindet, als auch an andere bisher identifizierte Faktoren, die am RNA-Transport vermutlich beteiligt sind.

Mit dem Ziel, neue Komponenten der Transportmaschinerie zu isolieren, sollten mit Hilfe von Vg1RBP möglichst intakte Lokalisationskomplexe aus dem Lysat von *Xenopus* Oozyten aufgereinigt werden. Dazu sollten transgene Frösche generiert werden, die eine Tandem-Epitop-markierte Variante von Vg1RBP unter der Kontrolle eines Oozyten-spezifischen Promotors exprimieren. Die Aufreinigung sollte durch eine Tandem-Affinitätschromatographie erfolgen, die unter nahezu nativen Bedingungen durchgeführt werden kann. Isolierte Kandidatenproteine sollten massenspektrometrisch identifiziert und anschließend unter dem Aspekt der RNA-Lokalisierung funktionell charakterisiert werden.

In einem zweiten Projekt sollten die Funktionen neuer vegetativ lokalisierter und in dieser Arbeitsgruppe identifizierter RNAs durch Überexpressions- bzw. Misslokalisierungsstudien und durch die Herunterregulierung der Proteinexpression während der frühen Embryonalentwicklung in *Xenopus laevis* analysiert werden.

Außerdem sollte untersucht werden, inwieweit Keimplasma-spezifische Transkripte die Fähigkeit besitzen, sich in den primordialen Keimzellen anzureichern.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Organismen

*Xenopus laevis*: *Xenopus laevis* wurden von Nasco (Fort Atkinson, WI) erworben und gemäß der Tierschutzbedingungen gehalten. Die Bestimmung der Entwicklungsstadien erfolgte nach Nieuwkoop und Faber 1967.

*Escherichia coli*: XL1-Blue (recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F' proAB, lacIqZΔM15, Tn10(Tetr)]c)

#### 2.1.2. Mikroskope und Zubehör

Mikroskope: Lumar.V12 (Zeiss, Jena)  
SZX10 (Olympus, Hamburg)  
UV-Hg-Lampe: U-RFL-T (Olympus, Hamburg)  
Filter: GFP (Olympus)  
Kameras: Axiocam MRc (Zeiss, Jena)

#### 2.1.3. Software

Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, München)  
AxioVision 4.5 (Zeiss, Jena)  
CorelDRAW 11 (Corel Corp.)  
Clone Manager Suite 5 (Sci Ed Central, Cary, NC)  
Endnote 8.0 (Adept Scientific, Frankfurt)  
ImageQuant Version 5.2 (Amersham Biosciences, Freiburg)  
Microsoft Office 2003 (Microsoft, Unterschleißheim)  
MiRanda (Enright *et al.* 2003)  
ScanProsite (Expasy, [www.expasy.org/tools/scanprosite/](http://www.expasy.org/tools/scanprosite/))

#### 2.1.4. Verbrauchsmaterialien

Einwegpipettenspitzen und –reaktionsgefäße wurden von den Firmen Sarstedt (Nümbrecht) und Eppendorf (Hamburg) erworben. Ultrazentrifugationssäulen wurden von Millipore (Schwalbach) und Sartorius (Göttingen) erworben. Es wurden Röntgenfilme von GE Healthcare (Freiburg) und Pierce (Rockford, IL) verwendet.

### 2.1.5. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (München), Biomol (Hamburg) und Appllichem (Darmstadt) erworben.

### 2.1.6. Enzyme und Kits

AcTEV Protease (10 U/μl): Invitrogen, Karlsruhe

Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Weiterstadt

DNase I (1 U/μl): MBI Fermentas, St. Leon-Rot

ECL Kit Super Signal Dura West: Pierce, Rockford, IL

ECL+ Direct Nucleic Acid Labelling And Detection System, GE Healthcare, Freiburg

iQ SYBR Green Supermix: Bio-Rad, München

Liberase Blendzyme 3: Roche Diagnostics, Mannheim

PCR *Purification* Kit: Qiagen GmbH, Hilden

*Pfu* DNA Polymerase (2,5 U/μl): MBI Fermentas, St. Leon-Rot

pGEM-T Kit: Promega, Mannheim

Proteinase Inhibitor-Mix: Roche Diagnostics, Mannheim

Proteinase K: Merck, Darmstadt

Pyrophosphatase (0,1 U/μl): Fermentas, St. Leon-Rot

Restriktionsenzyme: NEB, Schwalbach; MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Reverse Transkriptase (50U/μl): Applied Biosystems, Weiterstadt

RNA *In Vitro* Transcription Kit: Stratagene, Heidelberg

RNase A: Sigma, München

RNase Out (40 U/μl): Invitrogen, Karlsruhe

RNase T1 Sigma, München

RNeasy Mini Kit: Qiagen GmbH, Hilden

Shrimp Alkalische Phosphatase: MBI Fermentas, St. Leon-Rot

SP6, T3 und T7 mMESSAGE mMACHINE Kits: Ambion Inc., Austin, USA

SP6, T3, T7 RNA Polymerasen (20U/μl): Fermentas, St. Leon-Rot

T4 DNA Ligase (1 U/μl): MBI Fermentas, St. Leon-Rot

T4 Polynukleotid Kinase (10 U/μl): MBI Fermentas, St. Leon-Rot

*Taq* DNA Polymerase (5 U/μl): Promega, Mannheim

TnT-Coupled Reticulocyte Lysate System: Promega, Mannheim

### 2.1.7. Molekulargewichtsstandards

DNA-Standards (1kb, High, Medium, Low Range): Fermentas, St. Leon-Rot

Precision Plus Prestained Protein Standard: Bio-Rad, München

### 2.1.8. Radioaktiv-markierte Aminosäuren

<sup>35</sup>S-Methionin (10 mCi/ml): Hartmann Analytic, Braunschweig

### 2.1.9. Antibiotika

Ampicillin: 50 mg/ml in dH<sub>2</sub>O, Verdünnung 1:1000 (Endkonzentration: 50 µg/ml),  
Biomol, Hamburg

### 2.1.10. Antikörper

Kaninchen-anti-Vg1RBP: J. Yisraeli

Maus-anti-Myc: 9E10, Sigma, München

Maus-anti-Flag: Sigma, München

Ziege-anti-Kaninchen-HRP: Dianova, Hamburg

Ziege-anti-Maus-HRP: Santa Cruz, Heidelberg

Schaf-anti-Digoxigenin-AP: Roche, Mannheim

### 2.1.11. Nährmedien

Luria-Bertani (LB)-Medium: 1% (w/v) Bacto-Trypton (DIFCO, Detroit, MI),

0.5% (w/v) Hefeextrakt (DIFCO, Detroit, MI),

1% (w/v) NaCl, pH 7.5

LB-Agar: 1.5% (w/v) Agar (DIFCO, Detroit, MI) in LB-  
Flüssigmedium

### 2.1.12. Reinstwasser und RNase-freies Wasser

Es wurde autoklaviertes Reinstwasser mit einem spezifischen Widerstand vom 18,2 mΩ x cm verwendet. Dieses wird im Folgenden als Wasser bezeichnet.

RNase-freies Wasser wurde durch die Zugabe von 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) zu Reinstwasser hergestellt. Nach mehrstündigem intensiven Rühren wurde das DEPC durch Autoklavieren zerstört. Dieses DEPC-Wasser wurde, wenn nicht anders angegeben, für alle RNA-Experimente verwendet.

### 2.1.13. Puffer und Stammlösungen

Die Rezepte beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf einfach konzentrierte Lösungen.

**Alkalische-Phosphatase-Puffer (APB):** 100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 0.1% Tween-20

**Cystein-Lösung:** 2% L-Cystein-HCl, pH 7,8

---

<b>DNA-Ladepuffer</b>	0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanol; 15 % (w/v) Ficoll (Type 400) in dH <sub>2</sub> O.
<b>DNase-I-Puffer:</b>	40 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM NaCl, 6 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,1 mM CaCl <sub>2</sub>
<b>Homogenisierungspuffer:</b>	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl, 1% SDS
<b>Hybridisierungspuffer (WMISH):</b>	50% (v/v) Formamid; 5×SSC; 1 mg/ml Torula RNA (Sigma); 100 µg/ml Heparin (Sigma); 1× Denhards; 0,1 % (v/v) Tween-20; 0,1 % (w/v) CHAPS (Sigma)
<b>IPP145-Puffer:</b>	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 145 mM NaCl, 0,05% NP-40, 5% Glycerol, 1 mM PMSF, Proteinase Inhibitoren (Roche)
<b>Injektionspuffer:</b>	1x MBS, 1% Ficoll
<b>Kollagenase-Puffer:</b>	5,0 mM Hepes (pH 7,5), 82,5 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,0 mM MgCl <sub>2</sub>
<b>MAB:</b>	100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; pH 7,5
<b>MBS-Puffer:</b>	10 mM Hepes (pH 7,4), 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2,4 mM NaHCO <sub>3</sub> , 0,82 mM MgSO <sub>4</sub> , 0,41 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,66 mM KNO <sub>3</sub>
<b>MEM:</b>	100 mM MOPS, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO <sub>4</sub>
<b>MEMFA:</b>	MEM mit 3,7% Formaldehyd
<b>NET2-Puffer:</b>	50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,05% NP-40, 1 mM PMSF, Proteinase-Inhibitoren

---

<b>Nilblau</b>	0.01% (w/v) Nilblau in 0.1×MBSH
<b>Protein-Transferpuffer:</b>	39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0,04% SDS, 20% Methanol, pH 8,0
<b>RNA-Harnstoff-Ladepuffer</b>	7 M Harnstoff, 1x TBE, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Xylencyanol
<b>S100-Puffer</b>	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 5 – 25% Glycerol
<b>SSC:</b>	150 mM NaCl, 15 mM Na-Citrat, pH 7.2-7.4
<b>SDS-Auftragspuffer (2x):</b>	125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 20% Glycerol, 4% SDS, 200mM DTT, 0,02% Bromphenolblau
<b>TAE (Tris/Acetat/EDTA):</b>	40 mM Tris-Acetat (pH 8,5), 2 mM EDTA
<b>TBE (Tris/Borat/EDTA):</b>	89 mM Tris-Borat, 2 mM EDTA
<b>TBS/Tween:</b>	20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,05% Tween
<b>TEV-Elutionspuffer:</b>	50 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% NP40, 5% Glycerol
<b>TEV-Reaktionspuffer</b>	50 mM Tris (pH 7,5), 50 mM NaCl, 0,1% NP40, 5% Glycerol
<b>Western Blot Blockierungspuffer:</b>	TBS/Tween mit 5% Magermilchpulver, 0,02% NaN <sub>3</sub>
<b>UV-Quervernetzungspuffer</b>	5 mg/ml Heparin, 1% Glycerol, 50 mM KCl, 10 mM DTT, 5,2 mM Hepes (pH7,9), 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,1 mM EDTA, 40 µg/ml tRNA in DEPC-H <sub>2</sub> O

### 2.1.14. Plasmide

pZome-N, pZome-C: Cellzome (Heidelberg)

pCryGFP3: R. Grainger (Offield *et al.* 2000),

I-SceI-pBS-SKII: J. Wittbrodt (Thermes *et al.* 2002)

pCS2+, pCS2+-MT: D. Turner (Rupp *et al.* 1994)

### 2.1.15. Primer

Die Primer wurden so entworfen, dass damit die kodierende Sequenz amplifiziert wurde. Eine Ausnahme bilden hier die TFIIIA-Primer, die innerhalb des Promotors binden, und Velo22A rev, der gemeinsam mit dem pBKCMV-for-Primer zur Amplifizierung eines Velo22-Fragmentes aus einer Oozyten-spezifischen cDNA-Bibliothek verwendet wurde (Claussen und Pieler 2004). Die Erkennungssequenzen für die verwendeten Restriktionsenzyme sind unterstrichen. Die Primer wurden von Sigma (München) erworben.

#### Klonierungsprimer:

Name	Enzym	Sequenz
TFIIIA for 660	Pst I	AAA <u>CTG CAG</u> GTA TTT TTA CAA GTT TGC AAT TTC AG
TFIIIA rev	Hind III	GCC <u>CAA GCT TTT</u> CCT CTG AAC TTG TAG AAG CC
Vg1RBP (N) for	Eco RI	CTT <u>GAA TTC</u> CTG AAC AAG CTG TAT ATT GG
Vg1RBP (N) rev	Eco RI	GGG <u>AAT TCT</u> TAT TTT CTT CTC GGT TGG GG
Vg1RBP (C) for	Nco I	GCC CGC <u>CCA TGG</u> ACC ATG AAC AAG CTG TAT ATT GG
Vg1RBP (C) rev	Nco I	CCC CAC <u>GCC ATG GAT</u> CCT GAT TTT CTT CTC GG
Velo 7 for	Eco RI	CCC <u>GGA ATT CAT</u> GGC CGC CTA CAA AAT TGT G
Velo 7 rev	Xba I	CGG <u>GTC TAG ATT</u> ACT TCT TGG CTT TGC CTT GG
Velo 8 for	Eco RI	CCC <u>GGA ATT CAT</u> GGC TGC TGT GAT TTC AA
Velo 8 rev	Xba I	CGG <u>GTC TAG ACT</u> ACT TAG GAG GGG TGA AGT T
Velo 14 for	Eco RI	CCC <u>GGA ATT CAT</u> GGT ACC GGA GGA AGG ATA CG
Velo 14 rev		TAC TTA GAA AAT GAA GTC TCC TGC TAT C
Velo 18 for	Eco RI	CCC <u>GGA ATT CAT</u> GAG TAA CAA TAT CGG CCC TCA C
Velo 18 rev	Xba I	CGG <u>GTC TAG ATC</u> AAT CCT CCC ATT CAT CC
Velo 22 for	Eco RI	CCC <u>GGA ATT CCA</u> TGT TTC TTC GGC CAG AGG CAG
Velo 22 rev	Xba I	CGG <u>GTC TAG AGG</u> CCT CAT TTC TTG TCC TTC
Velo 22 A rev		GAT ATT GAG TGC ACA GTG AGT ATA GTG CTG CC
Velo 39 for	Eco RI	CCC <u>GGA ATT CAA</u> TGG AAG CCG TAC TCT C
Velo 39 rev	Xba I	CGG <u>GTC TAG AGG</u> AGC CTG CCT CTA ATT TTC



---

Velo 40 for	Bam HI	GGG ATC CAT GGA ATC CGC TTG TTA C
Velo 40 rev	Xho I	GGC TCG AGC TAG GAC TCT GCC TTT TGC TG
Velo 40 K92I for		AAA ACA TAT GCA GTC ATA GTC ATT CCA CAC AGC CGT G
Velo 40 K92I rev		ACG GCT GTG TGG AAT GAC TAT GAC TGC ATA TGT TTT G
pBKCMV for		CGC GCC TGC AGG TCG ACA CTA

---

**Sequenzierungsprimer:**

Name	Sequenz
SP6	TTA GGT GAC ACT ATA GAA TAC
T3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG
T7	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C

**RT-PCR-Primer:**

Name	Sequenz
Vg1 for	CGA TGA CAT CCA CCC AAC AC (Kress <i>et al.</i> 2004)
Vg1 rev	GAG GGT CAC AGT CAG CAA GG (Kress <i>et al.</i> 2004)
VegT for	CAA GTA AAT GTG AGA AAC CG
VegT rev	CAA ATA CAC ACA CAT TTC CC
DE for	AAA GAG ACC CTG CTA AGT GCT GTC (Horvay <i>et al.</i> 2006)
DE rev	CTT GCA GTG ACG TCT CCC AGT GAG (Horvay <i>et al.</i> 2006)
XNIF for	CTG CTA GAC CGG TGG GGA GTG T
XNIF ref	AGG GTG GAG AAG CGA AGA GTC AA
Dazl for	AAT CCC ATG TCA CTG ATG AGC
Dazl rev	ACA AAG TGA ACG GGC TAT GT
H4 for	CGG GAT AAC ATT CAG GGT ATC ACT
H4 rev	ATC CAT GGC GGT AAC TGT CTT CCT
ODC for	GCC ATT GTG AAG ACT CTC TCC ATT C
ODC rev	TTC GGG TGA TTC CTT GCC AC
GAPDH for	CTC CGC CCC CTC AGC AGA TG
GAPDH rev	GCA GGC GGC AGG TCA GAT

**2.1.16. Morpholino-Oligonukleotide**

Die Morpholino-Oligonukleotide wurden von der Firma Gene Tools LLC (Philomath, OR) erworben (Partridge *et al.* 1996).

Morpholino	Sequenz
Kontroll MO	CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A
MO Velo 7	TAA GCA CAA TTT TGT AGG CGG CCA T
MO Velo 8	TTT GAA ATC ACA GCA GCC ATG TCA G
MO Velo 22	TTC TGC CTC TGG CCG AAG AAA CAT G
MO Velo 39	CAT TCT GAG AGT ACG GCT TCC ATT T
MO Velo 40	CAT GGC TGG CAA ACA GGG ATA CCG
MO Velo 76	GGT CTG TTT TCA TCC ATA TTT CCA G

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. DNA-Methoden

#### 2.2.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Präparation kleiner DNA-Mengen wurden 3 ml Bakterienkultur abzentrifugiert und die Plasmid-DNA unter Verwendung des „Plasmid Mini Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) isoliert. Für die Isolierung großer DNA-Mengen wurden 100 ml Bakterienkultur und das „Plasmid Midi Kit“ von Qiagen eingesetzt. Die DNA wurde in Wasser gelöst.

#### 2.2.1.2. Isolierung genomischer DNA aus Oozyten

Zur Gewinnung genomischer DNA wurden Oozyten der Stadien I und II verwendet. Um die DNA nicht durch Scherung zu beschädigen, wurden abgeschnittene Pipettenspitzen benutzt und die Lösungen, wenn nötig, nur durch leichtes Schütteln gemischt.

Stadium I und II Oozyten wurden mit 500 µl Homogenisierungspuffer und 100 µg Proteinase K versetzt und 1 h bei 55°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der vollständigen Lyse der Oozyten wurde die Lösung mit gleichen Volumina von Phenol, Phenol/Chloroform (1:1) und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 0,25 Vol 10M Ammoniumacetat-Lösung vermischt (Endkonzentration 2M) und die DNA durch Zugabe von 0,6 Vol Isopropanol präzipitiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in TE-Puffer resuspendiert. Die RNA wurde durch Inkubation mit den RNasen A und T1 (jeweils 10 µg/ml) entfernt. Nach erneuter Fällung durch Ammoniumacetat und Isopropanol wurde die DNA in 20 µl TE-Puffer gelöst (adaptiert nach Sive *et al.* 1998).

#### 2.2.1.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gel

DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des PCR-*Purification*-Kits der Firma Qiagen isoliert.

#### 2.2.1.4. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA wurde 1/100 mit Wasser verdünnt und die Absorption der Lösung bei 260 nm im Photometer gemessen. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht dabei 50 µg DNA (Ausubel *et al.* 2002, App 3D).

#### 2.2.1.5. Nichtdenaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden diese mit DNA-Ladepuffer versetzt und in die Taschen eines 1-2%igen Agarose-Geles in 1x

TBE-Puffer (mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V, 250 mA. Anschließend wurden die DNA-Banden mit einem UV-Transilluminator (Chemi Doc, Bio-Rad) sichtbar gemacht und analysiert (Ausubel *et al.* 2002 2.5A).

### 2.2.1.6. Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde mit Reagenzien der Firmen QBiogene, Promega und Fermentas durchgeführt. *Pfu*-Polymerase wurde eingesetzt, um mögliche Synthesefehler zu vermeiden, wenn die PCR-Produkte für Klonierungen eingesetzt wurden. Dabei wurde im Wesentlichen folgendes Protokoll verwendet (adaptiert nach Saiki *et al.* 1985; Ausubel *et al.* 2002, 15.1):

---

1x	PCR-Puffer
je 0.2 mM	dNTPs
je 2.5 µM	<i>sense</i> und <i>antisense</i> Primer
0,5 U	<i>Taq</i> - oder <i>Pfu</i> -Polymerase
50 ng	Matrizen-DNA

---

Das Reaktionsvolumen betrug 10 – 30 µl. Bei Verwendung von cDNA als Matrize wurden 1 – 3 µl eingesetzt. Folgende Inkubationsschritte wurden durchgeführt:

---

94°C	3 min 30 s	24 – 35 Zyklen	Aufschmelzen der DNA
94°C	30 s		Aufschmelzen der DNA
56 – 60°C	30 s		Anlagerung der Primer
72°C	1 min / kb		DNA-Synthese durch Polymerase
72°C	4 min		DNA-Synthese durch Polymerase
12°C	∞		

---

Zur Identifizierung von Bakterienkolonien, welche ein Plasmid mit einem bestimmten inserierten DNA-Fragment enthalten sollten, wurde anstelle der Matrizen-DNA eine Kolonie von der Kulturplatte direkt in die Reaktion gegeben. Wenn angebracht, wurden Primer verwendet, die sowohl im Vektor als auch im inserierten Fragment binden. Auf diese Weise konnte die Insertionsrichtung überprüft werden.

### 2.2.1.7. DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme

Es wurden Enzyme der Firmen Fermentas und New England Biolabs verwendet.

---

1x	Restriktionspuffer
5 U	Restriktionsenzym
1-10 µg	DNA

---

Das Reaktionsvolumen betrug 20 – 50 µl. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 1-9 h (Ausubel *et al.* 2002, 3.1). Wenn Vektoren für eine anschließende Ligierung gespalten wurden, wurde der Reaktion 10 U Shrimp Alkalische Phosphatase (Fermentas) zugesetzt, um die Phosphatreste an den neu entstandenen DNA-Enden zu entfernen und so einer Re-Ligierung vorzubeugen (Ausubel *et al.* 2002, 3.10).

### 2.2.1.8. Ligation und Transformation in kompetente Bakterien

Um einen aufgeschnittenen Plasmid mit einem ebenfalls geschnittenen DNA-Fragment zu verbinden, wurde folgende Ligationsreaktion bei Raumtemperatur für 1-10 h inkubiert (Ausubel *et al.* 2002, 3.14):

---

1x	T4 Ligationspuffer
1 µl	T4 Ligase
1 µl	Vektor-DNA
1 µl	Fragment-DNA

---

Für die Subklonierung in pGEM-T-Vektoren müssen ungeschnittene PCR-Produkte an ihren 3'-Enden jeweils ein überhängendes Adenin-Nukleotid aufweisen. Dieses wurde entweder während der PCR durch *Taq*-Polymerase angehängt, oder musste nachträglich durch folgende Reaktion angefügt werden (Ausubel *et al.* 2002, 15.4):

---

1x	PCR-Puffer
0,2 mM	dATP
0,5 U	<i>Taq</i> -Polymerase
7 µl	PCR-Produkt

---

Das Volumen betrug 10 µl. Die Reaktion wurde 30 min bei 72°C inkubiert.

Für die Ligation in pGEM-T wurde ein Kit der Firma Promega verwendet. Das Reaktionsvolumen betrug 5 µl, die Inkubation erfolgt bei Raumtemperatur für 1-10 h.

---

1x	Ligationspuffer
0,5 µl	T4 Ligase
0,5 µl	pGEM-T Vektor
1,5 µl	Fragment-DNA mit A-Überhang

---

Anschließend wurde 1 µl der Ligationsreaktion in chemisch kompetente Bakterien (XL-1 Blue) transformiert. Dafür wurde das Reaktionsgemisch mit den kalten Bakterien vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Es erfolgt ein Hitzeschock für 50 sec bei 42 °C im Wasserbad. Die Bakterien wurden nun mit LB-Medium versetzt und ca. 1 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert (nach Hanahan 1983; Ausubel *et al.* 2002, 1.8). Bei einer pGEM-T-Klonierung wurde eine Blau/Weiß-Selektion auf der Agar-Platte durchgeführt. Dafür wurde auf der Platte ein Gemisch aus IPTG (60 µl von 0,1 M, Roth) und X-Gal (60 µl von 250 mg/ml in DMF, Biomol) ausgestrichen.

#### 2.2.1.9. Mutagenese

Punktmutationen wurden über PCR eingeführt. Dazu wurden zwei zueinander komplementäre Primer entworfen, welche den zu mutierenden Bereich überspannten und jeweils die Mutation enthielten. Die PCR wurde wie in Kapitel 2.2.1.6. beschrieben mit folgenden Änderungen durchgeführt. Als Matrize wurden 10 ng Plasmid-DNA verwendet und es wurden je 125 ng Primer eingesetzt. Da der gesamte Plasmid amplifiziert wurde, ist die Elongationszeit entsprechend angepasst worden (1 min/ kb). Für Amplifizierung wurde *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet und es wurden 18 Zyklen durchgeführt. Im Anschluß an die PCR wurde durch Zugabe von 10 U *DpnI* (Fermentas) in den Reaktionsansatz der methylierte Ausgangsplasmid degradiert. Im Anschluß wurde 1 µl der Reaktion wurde in *E.coli* transformiert.

#### 2.2.1.10. DNA-Sequenzierung

DNA wurde nach dem Prinzip der Kettenabbruch-Methode sequenziert (Sanger *et al.* 1977). Dazu wurde die entsprechende Plasmid-DNA mit Sequenzierprimern oder spezifischen Primer mit Hilfe des *Big Dye Terminator v1.1 Kits* der Firma Applied Biosystems unter Verwendung Fluoreszenz-markierter Didesoxy-Nukleotide amplifiziert und anschließend im *Abi Prism ® 3130xl DNA Sequencer* analysiert.

## 2.2.2. RNA-Methoden

### 2.2.2.1. RNA-Isolierung aus Embryonen und Oozyten

Ca. 5 Embryonen oder bis zu 25 Oozyten wurden mit 500 µl Trizol (Invitrogen) versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Embryonen gevortext und mit 1 ml – Spritzen und Kanülen unterschiedlichen Durchmessers homogenisiert. Nach Zugabe von 100 µl Chloroform und einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die wässrige Phase durch Zentrifugation bei 13,000x g abgetrennt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Nukleinsäuren wurden nun durch Zugabe von 1/10 Vol 10 M Ammoniumacetat und 0,25 Vol Isopropanol ausgefällt. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in Wasser aufgenommen. Anschließend erfolgte eine DNase I – Behandlung, um die genomische DNA zu entfernen. Die RNA wurde durch erneute Isopropanol-Fällung präzipitiert, mit Ethanol gewaschen, luftgetrocknet, in Wasser aufgenommen und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt (adaptiert nach Chomczynski und Sacchi 1987).

### 2.2.2.2. *In-vitro*-Transkription von Cap-mRNA

Für die Herstellung von Cap-mRNA wurde das mMessage mMachine Kit der Firma Ambion nach Herstellerangaben verwendet. Als Transkriptionsmatrize wurde linearisierter Plasmid verwendet, der mit dem „PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) aufgereinigt und mit DEPC-behandeltem Wasser eluiert worden war.

### 2.2.2.3. *In-vitro*-Transkription Fluoreszenz- und Digoxigenin-markierter RNA

Für die Transkription Fluoreszenz- oder Digoxigenin-markierter RNA von Plasmid-DNA wurden Komponenten verschiedener Firmen nach Herstellerangaben verwendet (adaptiert nach Krieg und Melton 1984). Als Matrize wurde durch Restriktionsverdau linearisierte und aufgereinigte Plasmid-DNA verwendet. Das 25-µl-Reaktionsgemisch setzte sich wie folgt zusammen:

---

1x	SP6, T3 oder T7 Polymerase-Puffer (Fermentas)
je 0,25 mM	ATP, CTP und GTP (Fermentas)
0,18mM	UTP (Fermentas)
0,094 mM	Digoxigenin-UTP (Roche) oder ChromaTide® Alexa Fluor®546-UTP (Invitrogen)
30 mM	DDT
40U	RNase Out (Invitrogen)
0,004 U	Pyrophosphatase (Fermentas)
1 µg	linearisierte Plasmid DNA
0,8 U	SP6, T3 oder T7 RNA Polymerase (Fermentas)

---

Das Gemisch wurde für 2 h bei 37°C inkubiert (Ausubel *et al.* 2002, 3.8). Dann wurde die DNA-Matrize durch Zugabe von 1 U DNase I und 15minütiger Inkubation bei 37°C zerstört. Die RNA wurde mit dem RNeasy Aufreinigungskit (Qiagen) aufgereinigt.

#### 2.2.2.4. Konzentrationsbestimmung von RNA

Die RNA wurde 1/100 mit Wasser verdünnt und die Absorption der Lösung bei 260 nm im Photometer gemessen. 1 OD entspricht dabei 40 µg RNA (Ausubel *et al.* 2002, App 3D).

#### 2.2.2.5. Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird RNA als Matrize verwendet und in sogenannte komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Das Reaktionsvolumen betrug 10 µl.

---

1x	PCR Puffer ohne MgCl <sub>2</sub> (Qbiogene)
je 1 µl	dNTPs (je 10 mM, Qbiogene)
2 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM, Qbiogene)
0,5 µl	Random Hexamere (50 µM)
0,4 µl	Reverse Transkriptase (Applied Biosystems)
0,2 µl	RNase Inhibitor (Invitrogen)
1 – 2 µl	DNA-freie Gesamt-RNA (100 ng/µl)

---



Folgende Inkubationsschritte wurden durchgeführt:

---

22 °C	10 min	Anlagerung der Hexamere
42 °C	50 min	cDNA Synthese durch reverse Transkription
95 °C	5 min	Inaktivierung der Reversen Transkriptase

---

Die so hergestellte cDNA konnte als Matrize in der PCR verwendet werden (Ausubel *et al.* 2002, 15.5 und Herstellerangaben).

#### **2.2.2.6. Agarose-Gelelektrophorese**

Die Qualität isolierter und synthetisierter RNA wurde durch Elektrophorese in einem nicht-denaturierenden Agarosegel überprüft. Dazu wurde ein 1,5% Gel in 1x TBE-Puffer mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid hergestellt. Die RNA wurde mit DNA-Ladepuffer vermischt und mit 100 V, 250 mA durch das Gel laufen lassen. Die RNA-Banden wurden anschließend mit einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und analysiert. Als Qualitätsmerkmal für isolierte Gesamt-RNA gelten intakte 28S und 18S – RNA-Banden (Ausubel *et al.* 2002, 2.5A, 4.9).

#### **2.2.2.7. Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Fluoreszenz-markierte RNA wurde in einem 7%igen Harnstoff-PA-Gel aufgetrennt und im Fluoreszenz-*Imager* analysiert. Die Elektrophorese fand in vertikalen Elektrophoresekammern aus der hauseigenen Werkstatt statt. Das Harnstoffgel setzte sich wie folgt zusammen (Ausubel *et al.* 2002, 2.12):

---

7 M	Harnstoff
7%	Acrylamid / Bisacrylamid (19/1) (Roth)
1x	TBE

---

#### **2.2.2.8. Ko-Immunopräzipitation von RNA (*in vitro*)**

Zur *in-vitro*-Untersuchung von RNA-Protein-Interaktionen wurden *in vitro* translatierte Epitop-markierte Proteine mit *in vitro* transkribierter Alexa Fluor546-markierter RNA inkubiert und anschließend ko-immunopräzipitiert. Die gebundene RNA wurde anschließend auf einem denaturierenden Harnstoffgel analysiert. Ein Bindungsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

---

12,5 µl	TnT Reaktion
1,0 µl	Fluoreszenz-markierte RNA (ca. 100 ng)
4,0 µl	UV-Quervernetzungspuffer
2,5 µl	RNase-freies H <sub>2</sub> O

---

Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 300 µl NET2-Puffer und 15 µl anti-Myc- bzw. anti-Flag-gekoppelte GammaBind™-Sephrose zugegeben und der Ansatz bei 4°C für 1h auf dem Drehrad rotierend inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Sepharose-Pellet vier Mal mit 500 µl kaltem NET2-Puffer gewaschen. Die gebundenen Proteine und RNAs wurden durch Zugabe von 200 µl NET2 mit 1% SDS und 50 µg/ml tRNA dissoziiert. Nach einer Extraktion mit Phenol/Chloroform wurde die RNA wie oben aus der wässrigen Phase und die Proteine aus der Phenolphase ausgefällt. Die ungebundene RNA wurde auf die gleiche Weise aus dem Überstand isoliert. Die RNA wurde in Harnstoff-Ladepuffer gelöst, in einem denaturierenden Harnstoffgel aufgetrennt und mit dem Fluoreszenz-Imager Typhoon 9400 der Firma Amersham analysiert (Laser 532 nm, Emissionsfilter BP580) (adaptiert nach Claussen und Pieler 2004). Die Proteine wurden in SDS-Auftragspuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE und *Western Blot* analysiert.

#### **2.2.2.9. Ko-Immunopräzipitation von RNA (*in vivo*)**

Hierfür wurden Myc-Epitop-markierte Proteine in Stadium III-IV Oozyten exprimiert. Aus jeweils 50 Oozyten wurde S16 Lysat in IPP145-Puffer (10 µl/Oozyte) hergestellt. Es wurde 1 µl anti-Myc-Antikörper zugegeben und das Lysat bei 4°C rotiert. Nach 1h wurden 15 µl GammaBind™-Sephrose (GE Healthcare) zugesetzt und der Ansatz bei 4°C über Nacht rotiert. Danach wurde das Sepharose-Pellet vier Mal mit je 500 µl IPP145-Puffer gewaschen und die gebundenen Proteine und RNA-Moleküle in 200 µl IPP145, 1% SDS, 25 µg/ml Glykogen (Ambion) abgelöst. RNA und Proteine wurden durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion voneinander getrennt und mit 1/10 Vol 10M Ammoniumacetat, 2,5 Vol 100% Ethanol bzw. 5 Vol Aceton präzipitiert. Die RNA wurde in DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O resuspendiert und für RT-PCR eingesetzt. Das Proteinpellet wurde in SDS-Auftragspuffer gelöst und für die *Western Blot* – Analyse verwendet (adaptiert nach (Zhao *et al.* 2001).

#### **2.2.2.10. Quantitative Ko-Immunopräzipitation von RNA**

Um zu überprüfen, inwiefern lokalisierte RNAs in EF-1α-haltigen RNP-Partikeln angereichert sind, wurde Myc-markiertes EF-1α in Stadium III und IV Oozyten durch RNA-Mikroinjektion exprimiert und S16 Lysat in IPP145-Puffer (5 µl/Oozyte)

hergestellt. Die Immunopräzipitation wurde wie in 2.2.2.9 beschrieben durchgeführt, wobei in jedem Ansatz Lysat aus 100 Oozyten verwendet wurde. Als Negativkontrolle wurde eine Präzipitation desselben Lysates in Abwesenheit von anti-Myc-Antikörper durchgeführt. Außerdem wurden 10% des Lysates für die Extraktion der Gesamt-RNA eingesetzt. Präzipitierte RNA und Gesamt-RNA wurden in je 20 µl DEPC-Wasser resuspendiert und wie in 2.2.2.5 erläutert in cDNA umgeschrieben. Dabei wurden 1,5 µl präzipitierte RNA bzw. 0,3 µl Gesamt-RNA (2%) pro 10 µl Reaktionsansatz verwendet. Die Quantifizierung der individuellen RNAs erfolgte durch *Real-Time-PCR*, für die der *iQ SYBR Green Supermix* und das *iCycler*-System von Bio-Rad verwendet wurden. Die 25 µl Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

12,5 µl	iQ SYBR Green Supermix
je 100 nmol	<i>sense</i> und <i>antisense</i> Primer
2,5 µl	cDNA

Folgende Reaktionsschritte wurden durchgeführt:

95°C	3 min		Aufschmelzen der DNA
95°C	10 s	60 Zyklen	Aufschmelzen der DNA
56°C	15 s		Anlagerung der Primer
72°C	30 s		Elongation
95°C	30 s		
56°C	30 s		
54°C – 95°C	10 s	83 Zyklen; Temperatur-Inkrement: 0,5°C	Aufzeichnung der Schmelzkurve

Die Reaktionen wurden in Duplikaten durchgeführt und aus den jeweils ermittelten  $C_T$ -Werten der Durchschnitt berechnet. Diese wurden dann für die Analyse der Anreicherungsfaktoren unter Verwendung der  $2^{-\Delta CT}$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001) verwendet. Dafür wurde die relative Anreicherung der individuellen RNAs im anti-Myc-Präzipitat gegen die Gesamt-RNA (E1) bzw. gegen die RNA im Kontroll-Präzipitat (E2) und die Anreicherung im Kontroll-Präzipitat gegen die Gesamt-RNA (E3) folgendermaßen berechnet:

$$E1 = 2^{-(CT(\text{Myc-IP}) - CT(\text{Gesamt}))}$$

$$E2 = 2^{-(CT(\text{Myc-IP}) - CT(\text{Kontroll-IP}))}$$

$$E3 = 2^{-(CT(\text{Kontroll-IP}) - CT(\text{Gesamt}))}$$

Die Anreicherungsfaktoren wurden anschließend mit folgender Formel ermittelt und auf den Wert von *GAPDH* normalisiert (Arthur *et al.* Manuskript eingereicht):

$$F = E1 \times E2 / E3$$

### 2.2.2.11. *Whole Mount In Situ* Hybridisierung

Mit der *Whole Mount In Situ* Hybridisierung (WMISH) werden RNA-Moleküle an ihrem Transkriptionsort im intakten, fixierten Embryo spezifisch angefärbt. Dadurch kann sowohl eine zeitliche als auch eine räumliche Analyse der Genexpression oder in diesem Fall der RNA-Lokalisation durchgeführt werden (Harland 1991).

Alle Inkubationsschritte in 5-ml-Präparategläsern (Schuett BioTec, Göttingen) statt; bei Raumtemperatur und 4°C auf einer Laborwippe, bei 60°C im Wasserbad und bei 37°C im Inkubator.

#### Fixierung:

Schritt	Lösung	Anzahl	Dauer	Temperatur
1.	MEMFA	1x	1 h	RT
2.	100% Ethanol	2x	5 min	RT

Die Embryonen können nun bei -20°C in Ethanol gelagert werden.

#### Rehydrierung:

Schritt	Lösung	Anzahl	Dauer	Temperatur	
1.	100% Ethanol	1x	5 min	RT	
2.	75% Ethanol	in H <sub>2</sub> O	1x	5 min	RT
3.	50% Ethanol	in H <sub>2</sub> O	1x	5 min	RT
4.	25% Ethanol	in PTw	1x	5 min	RT
5.	PTw	4x	5 min	RT	

#### Permeabilisierung und Refixierung:

Schritt	Lösung	Anzahl	Dauer	Temperatur	
1.	10 µg/ml Proteinase K	in PTw	1x	22 min	RT
1.	0,1 M Triethanolamin		2x	5 min	RT
2.	0,1 M Triethanolamin	+ Azetanhydrid <sup>1</sup>	1x	5 min	RT
3.		+ Azetanhydrid <sup>1</sup>	1x	5 min	RT
4.	PTw		2x	5 min	RT
5.	PTw	4% FA	1x	20 min	RT
6.	PTw		5x	5 min	RT

<sup>1</sup> Es werden jeweils 12.5 µl Azetanhydrid zupipettiert.

### Vorhybridisierung und Hybridisierung:

Schritt	Lösung	Anzahl	Dauer	Temperatur
1.	250 µl Hybridisierungslösung	1x	1 min	RT
2.	500 µl Hybridisierungslösung	1x	10 min	60 °C
3.	500 µl Hybridisierungslösung	1x	6 h	60 °C
4.	500 ng <i>antisense</i> Dig-RNA-Sonde in 500 µl Hybridisierungslösung	1x	über Nacht	60 °C

### Waschen:

Schritt	Lösung	Anzahl	Dauer	Temperatur
1.	500 µl Hybridisierungslösung	1x	10 min	60 °C
2.	2x SSC	3x	20 min	60 °C
3.	2x SSC + RNasen <sup>1</sup>	2x	30 min	37 °C
4.	2x SSC	1x	10 min	RT
5.	0,2x SSC	1x	20 min	60 °C
6.	MAB	2x	15 min	RT

<sup>1</sup> RNasen: 20 µg/ml RNase A, 10 U/ml RNase T1 (Sigma)

### Antikörper-Inkubation:

Schritt	Lösung	Anzahl	Dauer	Temperatur
1.	MAB + 2% BMB <sup>1</sup>	1x	60 min	RT
2.	MAB + 2% BMB <sup>1</sup> + 20% HS <sup>2</sup>	1x	60 min	RT
3.	MAB + 2% BMB <sup>1</sup> + 20% HS <sup>2</sup> + AK <sup>3</sup>	1x	4 h	RT
4.	MAB	5x	5 min	RT
5.	MAB	1x	ü. Nacht	4 °C

<sup>1</sup> Boehringer Mannheim Blockierungsreagenz (Roche)

<sup>2</sup> Pferdeserum, hitzeinaktiviert (Invitrogen)

<sup>3</sup> anti-Digoxigenin-Antikörper, 1:5000

**Farbentwicklung:**

Schritt	Lösung	Anzahl	Dauer	Temperatur
1.	MAB	1x	60 min	RT
2.	APB	2x	5 min	RT
3.	APB + NBT/BCIP <sup>1</sup>	1x	variabel <sup>2</sup>	RT

<sup>1</sup> 1.75 µl/ml NBT (100 mg/ml in 70% Dimethylformamid) und 3.5 µl BCIP (50 mg/ml in 100% Dimethylformamid, beide Roche)

<sup>2</sup> 10 min bis mehrere Tage. Bei Oozyten ist die Färbung nach ca. 15 – 20 min optimal.

**Abstoppen der Färbereaktion:**

Schritt	Lösung	Anzahl	Dauer	Temperatur
1.	H <sub>2</sub> O	1x	1 min	RT
2.	100% Methanol	1x	1-10 min	RT
3.	75% Methanol in H <sub>2</sub> O	1x	1 min	RT
4.	50% Methanol in H <sub>2</sub> O	1x	1 min	RT
5.	25% Methanol in H <sub>2</sub> O	1x	1 min	RT
6.	H <sub>2</sub> O	1x	1 min	RT
7.	MEMFA	1x	ü. Nacht	RT

Die Embryonen wurden in MEMFA bei 4°C aufbewahrt.

**2.2.3. Protein-Methoden****2.2.3.1. Präparation von Oozytenextrakten**

Die Oozyten wurden abgezählt, in definierten Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Bei der Weiterverarbeitung wurden eisgekühlte Puffer verwendet und auf Eis gearbeitet. Für die Lyse wurde jeweils derjenige Puffer benutzt, welcher auch im anschließenden Experiment verwendet wurde.

Die Oozyten wurden mit Puffer versetzt und mit Hilfe einer 1 ml-Spritze und Kanülen mit verschiedenen Durchmessern lysiert. Anschließend wurden die Lysate bei 16,000x g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wird als S16 Lysat bezeichnet und enthält Zytoplasma- sowie Dotterproteine. Um letztere zu entfernen, wurde eine FREON-Extraktion durchgeführt. Dafür wurde der Überstand mit dem gleichen Volumen FREON versetzt, gemischt und bei 16,000x g für 20 min zentrifugiert. Der so gewonnene S16 Extrakt war weitestgehend frei von Dotterproteinen und wurde entweder sofort weiter verwendet oder bei -80°C gelagert (nach Evans und Kay 1991).

### 2.2.3.2. *In-vivo*-Expression von Proteinen in *Xenopus* Oozyten

Zur Proteinexpression wurde *in vitro* transkribierte mRNA in Stadium III – VI Oozyten injiziert und diese anschließend für 20 h bei 18°C in 1x MBS-Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Oozyten gezählt und in definierten Aliquots von 50 bis 100 Oozyten bei -80°C eingefroren.

### 2.2.3.3. *In-vitro*-Translation

Um Proteine *in vitro* zu synthetisieren wurde das „TnT-Kit“ der Firma Promega verwendet, welches eine gekoppelte Translation und Transkription in Retikulozytenlysat ermöglicht. Eine 12,5 µl – Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

---

6,25 µl	Kaninchen-Retikulozyten-Lysat
0,5 µl	25 x TnT-Puffer
0,25 µl	1 mM Aminosäure-Mischung - Methionin
1,0 µl	<sup>35</sup> S-Methionin (Hartmann Analytic)
0,25 µl	RNase Inhibitor (Invitrogen)
0,25 µl	SP6-Polymerase
0,5 µl	DNA (0,5 µg/µl)
	RNase-freies Wasser

---

Zur Synthese von unmarkierten Proteinen wurden gleiche Anteile der Aminosäure-Mischungen ohne Methionin und ohne Leucin eingesetzt. Der Ansatz wurde bei 30°C für 2 - 3 h inkubiert und anschließend sofort verwendet oder bei -20°C gelagert.

### 2.2.3.4. Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurde die Bradford-Methode verwendet (Bradford 1976). Sie beruht auf der Bindung von Coomassie-R250 an hydrophobe Aminosäuren und der daraus resultierenden Änderung der Absorptionseigenschaften des Farbstoffs. Das bedeutet, das Ergebnis wird durch die Aminosäure-Zusammensetzung der verwendeten Proteine beeinflusst.

Zunächst wurde eine Eichung mit BSA durchgeführt. Dafür wurden 0, 1, 2, 5, 10 und 15 µg BSA in 100 µl Puffer gelöst und mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt. Nach 15 minütiger Inkubation wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden gegen die Proteinmenge aufgetragen und eine Eichgerade generiert. Von der zu messenden Proteinlösung wurden 1 µl, 5 µl und 10 µl mit Puffer auf 100 µl aufgefüllt und wie zuvor mit Bradford-Reagenz inkubiert und gemessen. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe der Eichgeraden ermittelt.

### 2.2.3.5. Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Um das Volumen von Proteinlösungen zu verringern, wurde eine Ultrafiltration sowohl mit Vivaspin-Säulen der Firma Sartorius für kleine Volumina (bis 1 ml) als auch mit Amicon Ultra 4-Säulen der Firma Millipore für größere Volumina (bis 4 ml) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.2.3.6. Proteinfällung

Zur Präzipitation von Proteinen wurde die Lösung mit 5 Vol eiskaltem Aceton versetzt, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für mindestens 2 h inkubiert, abzentrifugiert ( $13,000\times g$ ) und das Proteinpellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Alternativ wurden bei großen Volumina 0,02 Vol 1%iges Natriumdeoxycholat zugesetzt, die Probe für 30 min auf Eis inkubiert und die Proteine durch anschließende Zugabe von 0.2 Vol 50%iger Trichloressigsäure ausgefällt. Das Pellet wurde mit Aceton und 70%igem Ethanol gewaschen. In beiden Fällen wurde das Pellet anschließend in 1x SDS-Ladepuffer aufgenommen und bei  $70^{\circ}\text{C}$  unter Schütteln gelöst.

### 2.2.3.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Es wurden ausschließlich diskontinuierliche Gelsysteme eingesetzt, d.h. bevor die Proteine das Trenngel erreichen, wandern sie durch ein niedrig-konzentriertes Sammelgel mit niedrigerem pH-Wert, in dem noch keine Auftrennung stattfindet. An der Grenze zum Trenngel „sammeln“ sich die Proteine und wandern gleichzeitig in das Trenngel ein. Auf diese Weise wird eine bedeutend bessere Auflösung gewährleistet als in kontinuierlichen Gelsystemen. Folgende Gel- und Pufferzusammensetzungen wurden verwendet (adaptiert nach Laemmli 1970):

**Trenngel:** 10-12 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamidlösung (30:0,8); 0,375 M Tris/HCl (pH 8,8); 0,1% (w/v) SDS,

**Sammelgel:** 3,4 % Acrylamid/Bisacrylamidlösung (30:0,8); 0,125 M Tris/HCl (pH 6,8); 0,1 % (w/v) SDS

**Elektrophorese-Laufpuffer:** 25 mM Tris/HCl (pH 8,8); 0,192 M Glycin; 0,1 % (w/v) SDS

Es wurden vertikale Elektrophoresekammern aus der hauseigenen Werkstatt verwendet.



Gele mit einem Acrylamid-Konzentrationsgradienten ermöglichen eine noch bessere Auftrennung von Proteingemischen mit besonders großen Unterschieden der Molekulargewichte. In dieser Arbeit wurden Gradientengele mit einem Acrylamid-Gehalt von 8-16% verwendet. Diese wurden mit Hilfe eines Gradientenmischers (hauseigene Werkstatt) hergestellt (Ausubel *et al.* 2002, 10.2A). Um die Gleichmäßigkeit des Gradienten optisch überprüfen zu können, wurde der 16%igen Acrylamidlösung Bromphenolblau zugesetzt, welches während der Elektrophorese zur Anode wanderte. Proteinlösungen, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt werden sollten, wurden mit 1 Vol 2x SDS-Auftragspuffer versetzt und bei 95°C für 5 min aufgeköcht. Die Elektrophorese erfolgte bei 35-70 mA pro Gel und 100 – 300 Volt.

### 2.2.3.8. Gelfärbung mit kolloidalem Coomassie-Blau

Nach der Elektrophorese wurde das Gel zunächst in 10% Essigsäure, 40% Ethanol für mindestens 1 h fixiert. Nach der Fixierung wurde das Gel zwei Mal für 10 min in dH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend über Nacht unter leichtem Schwenken in der Färbelösung inkubiert. Am nächsten Tag wurde das gefärbte Gel in eine neue Schale überführt und in dH<sub>2</sub>O gewaschen bis keine Hintergrundfärbung mehr sichtbar war. Die Färbelösung setzte sich wie folgt zusammen:

---

0.1 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue G250
2 % (w/v)	ortho-Phosphorsäure
10 % (w/v)	Ammoniumsulfat

---

Phosphorsäure und Ammoniumsulfat wurden zunächst in H<sub>2</sub>O gelöst und anschließend das Coomassie-Blau unter Rühren zugegeben. Aus dieser Stammlösung wurde nach frühestens 24 h die Arbeitslösung hergestellt. Dazu wurden 4 Teile resuspendierte Stammlösung mit einem Teil Methanol gemischt und direkt auf das Gel gegeben (Neuhoff *et al.* 1988).

### 2.2.3.9. Affinitätschromatographische Aufreinigung Vg1RBP-bindender Proteine

Jeweils 1000 Oozyten der Stadien III – IV wurden mit je 15 µl mRNA (500 ng/µl) injiziert. Die Oozyten wurden für 22 – 24 Stunden bei 18°C kultiviert und dann in Aliquots zu je 100 Oozyten in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Die Oozyten wurden in 5 µl IPP145-Puffer pro Oozyte mit Hilfe von sterilen Einwegkanülen (Durchmesser 0,45 mm) lysiert und bei 16,000x g zentrifugiert. Der zytosolische Überstand wurde mit FREON (Merck) extrahiert, um Dotterproteine zu

entfernen. Die Gesamt-Proteinmenge dieses S16 Extraktes betrug ca. 9 mg. Der Extrakt wurde in 40 ml IPP145 verdünnt, mit 300 µl IgG-Sepharose (GE Healthcare) versetzt und über Nacht bei 4°C rotiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen und das Sepharose-Pellet vier Mal mit IPP145 Puffer gewaschen. Anschließend folgten drei Waschschriffe mit TEV-Reaktionspuffer. Die Elution erfolgte in 6 ml TEV-Reaktionspuffer und mit 150 U AcTEV (Invitrogen) rotierend für 4 h bei 16°C. Danach wurde die NaCl-Konzentration von 50 mM auf 150 mM erhöht und die gebundenen Proteine durch Rotation bei 16°C für weitere 2 h eluiert.

Die eluierten Proteine wurden durch Ultrazentrifugation einkonzentriert und durch Zugabe von Natriumdeoxycholat und Trichloressigsäure präzipitiert. Anschließend wurde das Protein-Pellet in 1x SDS-Ladepuffer gelöst und im 8-16%igen SDS-PA-Gel aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit kolloidalem Coomassie über Nacht.

#### **2.2.3.10. Massenspektrometrische Proteinanalyse**

Die Identifizierung der Proteine wurde mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie von Dr. Olaf Jahn aus der Abteilung *Proteomics* des Max-Planck-Instituts für Experimentelle Medizin durchgeführt.

Die Coomassie-Banden wurden aus dem Gel mit Hilfe steriler Pipettenspitzen herausgepickt und in einer automatisierten Plattform für die Identifizierung gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine analysiert (Jahn *et al.* 2006; Reumann *et al.* 2007; Werner *et al.* 2007). Mit Hilfe eines Ultraflex MALDI-TOF-Massenspektrometers (Bruker Daltonics) wurden sowohl Peptidmassen-*Fingerprint* (PMF) als auch die Fragment-Ionenspektren generiert. Mit den Informationen über Peptidmasse und Peptidsequenz war die eindeutige Protein-Identifizierung möglich. Um die nichtredundante NCBI-Primärsequenz-Datenbank auf passende *Xenopus laevis* Sequenzen zu durchsuchen, wurde die Mascot Software 2.0 (Matrix Science) benutzt. Die dabei verwendeten Parameter sind in Werner *et al.* 2007 und Reumann *et al.* 2007 beschrieben. Alle Datensätze wurden nochmals ohne Taxonomie-Einschränkung mit der Datenbank verglichen, um eventuelle *Xenopus tropicalis*-Sequenzen zu finden. Ein Protein wurde als sicher identifiziert angesehen, wenn mindestens vier Peptidmassen aus dem PMF und mindestens ein sequenziertes Peptid mit einem Homologiewert oberhalb der Signifikanzschwelle von 26 mit der Proteinsequenz übereinstimmen (Reumann *et al.* 2007; Werner *et al.* 2007).

#### **2.2.3.11. Western Blot Transfer**

Es wurden horizontale Elektrotransfer-Apparaturen der Firma Biometra (Göttingen), Blotting-Papier (3 MM) und Nitrozellulose-Membran der Firma Whatman (Dassel) verwendet. Membran und Papier wurden vollständig in Protein-Transferpuffer

eingeweicht und dann Luftblasen-frei in folgender Reihenfolge auf die Anode des Transfer-Apparates gestapelt: 3 Blätter Papier, Membran, Gel, 3 Blätter Papier. Die Kathode wurde aufgesetzt und der Transfer bei 30 V, 250 mA für ca. 1 – 1,5 h durchgeführt (modifiziert nach. Towbin *et al.* 1979; Ausubel *et al.* 2002, 10.8).

#### **2.2.3.12. Proteindetektion mit Antikörpern**

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran für 1 h oder über Nacht in Blockierungspuffer (TBS/Tween mit 5% Milchpulver) inkubiert. Alle Antikörperinkubationen und Waschschrte erfolgten in TBS/Tween. Die Inkubationen mit dem Erst- und dem Zweitantikörper wurden für je 1h bei Raumtemperatur durchgeführt. Danach wurde die Membran jeweils drei Mal 10 min lang gewaschen.

Für die Detektion wurden das ECL+ Detektionskit von GE Healthcare und das Super Signal Dura West ECL Kit der Firma Pierce jeweils nach Herstellerangaben verwendet. Die Lösungen des Dura West Kits wurden 1/10 verdünnt eingesetzt.

Es wurden Filme der Firmen GE Healthcare und Pierce belichtet und diese in einem Röntgenfilm-Entwicklungsgerät (Optimax Typ TR, MS-Laborgeräte, Wiesloch) entwickelt.

#### **2.2.3.13. Ko-Immunopräzipitation von Proteinen aus Oozytenlysat**

Dazu wurde pro Ansatz zunächst S16 Extrakt aus 100 Stadium III-IV oder Stadium V-VI Oozyten in IPP145-Puffer (5-10 µl/Oozyte) hergestellt. Zu dem Extrakt wurde 1 – 1,5 µl anti-Myc-Antikörper gegeben und der Ansatz bei 4°C für 2 h auf einem Drehrad rotiert. Dann wurden 15 µl Protein-A-Sepharose (Amersham) zugeben und der Ansatz bei 4°C über Nacht rotiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen und das Sepharose-Pellet viermal mit je 500 µl kaltem IPP145-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 30 µl 2x SDS-Auftragspuffer resuspendiert, um die gebundenen Proteine abzulösen. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE und *Western Blot* analysiert (Ausubel *et al.* 2002, 20.5).

#### **2.2.3.14. Zonalzentrifugation**

Durch Ultrazentrifugation werden Partikel, wie z.B. Protein-Komplexe, nach ihrem Sedimentationskoeffizienten aufgetrennt. Da sich das Schwerfeld innerhalb des Röhrchens abhängig vom Rotationsradius ändert, wurde ein Glycerolgradient vorgelegt, der die Sedimentation mit steigendem Radius abbremst und die Vermischung der Partikel aufgrund von Konvektion verhindert (Lottspeich und Zorbas 1998).

Zur Herstellung des Glycerol-Gradienten wurde 1 ml S100-Puffer mit 5% Glycerol mit 1 ml S100 Puffer mit 60% Glycerol in einem 2,2 ml-Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman,

Krefeld) unterschichtet. Das Röhrchen wurde mit Parafilm verschlossen, vorsichtig waagrecht hingelegt und 1 h bei 4°C aufbewahrt. Danach wurde es vorsichtig wieder aufgestellt, geöffnet und der Glycerolpuffer wurde mit Oozytenextrakt in S100-Puffer (5% Glycerol) überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte in einer Ultrazentrifuge (Optima TL, Beckman) im Ausschwingrotor TLS 55 bei 55,000 rpm (max. 259,000x g) für 4 h. Nach erfolgter Zentrifugation wurden 11 Fraktionen zu je 200 µl durch vorsichtiges Abpipettieren gewonnen. Die Proteine in den Fraktionen wurden durch Zugabe von 1 ml kaltem Aceton und einstündiger Inkubation bei -20°C präzipitiert, anschließend abzentrifugiert, mit 75%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 1x SDS-Ladepuffer aufgenommen. Die fraktionierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE und *Western Blot* analysiert.

## **2.2.4. Tierexperimentelle Methoden**

### **2.2.4.1. Testis-Präparation**

Zur Gewinnung der Hoden wurde ein adultes Männchen zunächst für 20 min in 0,2%iger 3-Aminobenzoesäureethylester-Lösung betäubt und anschließend dekapitiert. Nach Öffnung des Bauchraumes wurden die beiden Hoden entnommen, von Blut und Gewebe gereinigt und sofort in eiskalten 1x MBS-Puffer überführt. Die Hoden konnten darin bei 4°C bis zu 5 Tagen aufbewahrt werden (Sive *et al.* 1998).

### **2.2.4.2. Eiablage und *in-vitro*-Befruchtung**

Um die Eiablage zu stimulieren, wurde den *Xenopus*-Weibchen ca. 12 h vor der gewünschten Ablagezeit 900 U HCG (Sigma) in die dorsalen Lympfsäcke injiziert. Bis zur Eiablage wurden die Weibchen bei 16°C aufbewahrt. Die Ablage erfolgte entweder spontan oder wurde durch sanftes Massieren des Bauches und des Rückens unterstützt. Die Eier wurden in Petrischalen abgelegt und sofort mit einer Suspension aus frischem Testis-Gewebe befruchtet. Dazu wurde ein Stück Testis vorher mit einem Skalpell in eiskaltem 1x MBS zerkleinert und mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze suspendiert. 50 µl dieser Suspension wurden zu dem Gelege gegeben, und mit 450 µl H<sub>2</sub>O verdünnt, um die Spermien zu mobilisieren. Anschließend wurden die Spermien und die Eier mit einer Pipettenspitze gründlich vermischt. Nach ca. 15 min wurde das Gelege mit 0,1x MBS überschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern. 20 bis 40 min nach der Befruchtung wurden die Embryonen durch eine Behandlung mit einer 2%igen Cystein-Lösung (pH7,9) von ihrer Gallerthülle befreit und danach gründlich in 0,1x MBS gewaschen. Albino-Embryonen wurden anschließend mit Nilblau angefärbt (nach Sive *et al.* 1998).

### 2.2.4.3. Gewinnung von *Xenopus* Ovarien

Vor der operativen Entnahme von Ovarialgewebe aus adulten *Xenopus laevis*-Weibchen wurden diese in 0,2%ige 3-Aminobenzoesäureethylester-Lösung (Roth) für 10 bis 15 min anästhesiert. Die Operation wurde semisteril auf Eis ausgeführt. Dazu wurde mit einer Operationsschere zunächst die Lederhaut und dann die Bauchmuskulatur mit einem kleinen Schnitt geöffnet, so dass die Ovarien sichtbar wurden. Nun konnten mit einer Pinzette die Ovarlappen entnommen werden. Anschließend wurden das Häutchen über dem Muskelgewebe und die obere Lederhaut mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl, Ethicon, Norderstedt) separat zugenäht. Der Frosch wurde nach der Operation in 0,6 %ige Kochsalzlösung gesetzt. Um die Oozyten zu vereinzeln, wurden diese für 1,5 h in einer Lösung von 0,1 mg/ml Kollagenase (Liberase Blendzyme 3, Roche) in Kollagenase-Puffer bei Raumtemperatur rotiert. Danach wurden die Oozyten mehrmals intensiv in 1x MBS gewaschen und mit Hilfe von Nygonsieben verschiedener Maschengröße nach Stadien getrennt. Die Oozyten wurden bei 18°C in 1x MBS bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt (adaptiert nach Smith *et al.* 1991).

### 2.2.4.4. Mikroinjektionen in Embryonen und Oozyten

Mit Hilfe einer Glaskapillare können Lösungen von DNA, RNA, modifizierten Oligonukleotiden oder Proteinen in *Xenopus*-Embryonen und –Oozyten injiziert werden (nach Sive *et al.* 1998). Dazu wurden die Kapillaren (GC100F-10, Harvard Apparatus, Edenbridge, UK) zunächst mit einem Nadelziehgerät (Narishige, Tokyo) ausgezogen. Die entsprechende Lösung wurde mit *Microloader*-Pipettenspitze (Eppendorf) in die Kapillare gefüllt und die Kapillarspitze mit einer Pinzette unter dem Binokular geöffnet. Die Mikroinjektion erfolgte mit Hilfe eines luftdruckregulierten Mikroinjektionsapparates (PV 820, World Precision Instruments, Berlin). Durch die Regulierung von Druck und Injektionszeit wurde die Tropfengröße eingestellt. Sie betrug 5 nl bei der Injektion von Embryonen und 2 – 30 nl bei der Oozyteninjektion. Die Injektion von Oozyten erfolgte in 1x MBS, Embryonen wurden in Injektionspuffer (1x MBS, 1% Ficoll) injiziert. Folgende Mengen RNA wurden injiziert:

Oozyten, Stadium II-III:	100 pg DNA / Oocyte	(Promotortest)
Oozyten, Stadium III-IV:	bis zu 10 ng RNA / Oocyte	(Überexpression)
Oozyten, Stadium V-VI:	bis zu 30 ng RNA / Oocyte	(Überexpression)
Embryonen, Stadium 1:	40 pg DNA / Embryo	(Transgenese)
Embryonen, Stadium 2:	500 pg RNA / Blastomer	(Überexpression)

#### 2.2.4.5. Kultivierung von Embryonen und Oozyten

Nach der Mikroinjektion verblieben die Embryonen noch für 2 – 3 h in Injektionspuffer und wurden anschließend in 0,1x MBS transferiert. Sie wurden bei 12,5 – 18°C kultiviert.

Die Kultivierung der Oozyten erfolgte ausschließlich bei 18°C in 1x MBS (nach Sive *et al.* 1998).

#### 2.2.4.6. Herstellung transgener Embryonen

Zur Generierung transgener *Xenopus*-Embryonen wurde die in diesem Labor für *Xenopus* etablierte Meganuklease-Technik verwendet. Dabei wird das gewünschte Plasmid in einem Restriktionsverdau von der Endonuklease *I-SceI* geschnitten und dann mit dem kompletten Restriktionsansatz in Embryonen im Einzellstadium injiziert (Pan *et al.* 2006). Der Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

---

1 µl	10x Restriktionspuffer (NEB)
1 µl	BSA (10 mg/ml)
1 µl	DNA (100 ng/µl)
1 µl	<i>I-SceI</i> (20 U/µl, NEB)
6 µl	H <sub>2</sub> O

---

Der Ansatz wurde bei 37°C für 40 min inkubiert und sofort im Anschluß injiziert. Es wurde besonderer Wert darauf gelegt, innerhalb von 40 bis 90 min nach der Befruchtung in Einzell-Embryonen zu injizieren. Die Injektion erfolgte zwischen dem animalen Pol des Einzell-Embryos und der Spermien-Eintrittsstelle, die meist durch eine Anreicherung von Pigment zu erkennen war. An dieser Stelle wurde die DNA möglichst nah zu den beiden Zellkernen gebracht, so dass eine frühzeitige Integration in das embryonale Genom wahrscheinlich war.

#### 2.2.4.7. Identifizierung transgener Embryonen

Die Embryonen wurden im Stadium 40 in 0,01% 3-Aminobenzoessäureethylester in 0,1x MBS narkotisiert und anschließend unter UV-Licht mittels GFP-Filter (514 nm bis offen) auf GFP-Fluoreszenz in den Linsen untersucht.

#### 2.2.4.8. Aufzucht transgener *Xenopus*-Embryonen

Die Embryonen wurden ausschließlich in 0,1x MBS gehalten und ab Stadium 41 mit Sera Micron Staubfutter (Sera, Heinsberg) gefüttert. Nach Abschluss der Metamorphose konnten die kleinen Frösche in stehendem Trinkwasser in

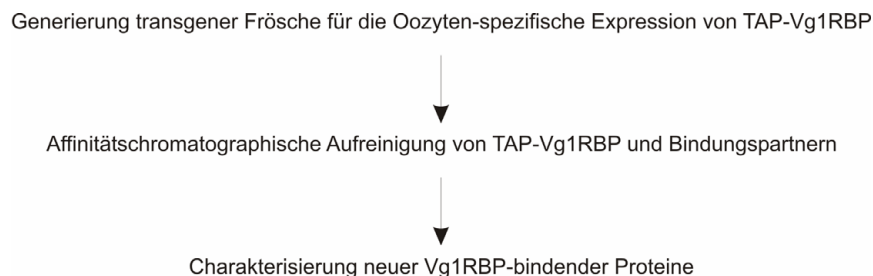
Plastikbehältern (hauseigene Werkstatt, IKEA) gehalten werden. Sie wurden zunächst mit Novo Grano Mix (JBL, Neuhofen) und später mit *Sterlet Sticks* (Tetra Pond, Melle) gefüttert. Einmal wöchentlich erfolgte eine Reinigung der Behälter und ein Austausch des Wassers.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Isolierung neuer Lokalisationsfaktoren

#### 3.1.1. Versuchsstrategie

Um neue Lokalisationsfaktoren zu identifizieren, sollten Epitop-markierte Vg1RBP-Varianten spezifisch in den Oozyten transgener Frösche exprimiert und anschließend mitsamt ihrer Interaktionspartner affinitätschromatographisch aufgereinigt werden. Das Ziel der Aufreinigung war die Isolierung intakter Lokalisationskomplexe und neuer RNA-Transportfaktoren, welche anschließend im Hinblick auf ihre Beteiligung am RNA-Transport charakterisiert werden sollten (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Versuchsstrategie zur Isolierung und Charakterisierung neuer RNA-Lokalisationsfaktoren.**

Diese Strategie birgt verschiedene Vorteile. Der wichtigste ist die frühe Expression der rekombinanten Proteine unter der Kontrolle eines entsprechenden Promotors. Wird TAP-Vg1RBP zur gleichen Zeit wie endogenes Vg1RBP synthetisiert, steht es bereits vor Beginn der RNA-Lokalisierung für den Einbau in die Transportkomplexe zur Verfügung. Vg1RBP lässt sich bereits in Stadium I Oozyten nachweisen und bindet bereits im Kern, also zu Beginn der Lokalisation, an die RNA. Es ist nicht bekannt, wie stabil die Lokalisationskomplexe sind und wie leicht ein Protein daraus verdrängt werden kann. Die frühe Präsenz von TAP-Vg1RBP ist also notwendig, um mit dem endogenen Protein gleich während der ersten Bindungsschritte kompetitieren zu können und in ausreichender Menge in den Komplex integriert zu werden.

Außerdem ist die Funktionalität der Proteine durch die Synthese in den Oozyten eher gewährleistet als beispielsweise nach der Expression in Bakterienzellen, da posttranslationale Modifikationen in den Oozyten korrekt durchgeführt werden können.



Mögliche Fehler- und Kontaminationsquellen, die bei der Aufreinigung der rekombinanten Proteine aus Bakterien entstehen, sind ebenfalls ausgeschlossen.

Für die Generierung transgener Frösche wurde das Meganuklease-Protokoll ausgewählt. Ursprünglich für die Verwendung in *Medaka*-Fischen entwickelt, wurde die Methode kürzlich auch für *Xenopus laevis* etabliert (Thermes *et al.* 2002; Pan *et al.* 2006). Die Meganuklease *I-SceI* ist eine Endonuklease, welche eine sehr lange Erkennungssequenz von 18 bp besitzt. Das zu integrierende DNA-Fragment wird in ein Plasmid eingefügt, in welchem es von zwei dieser Meganuklease-Schnittstellen flankiert wird. Das Plasmid wird mit diesem Enzym verdaut und der komplette Restriktionsansatz anschließend in Einzell-Embryonen injiziert. Die Nuklease fördert durch einen bisher nicht bekannten Mechanismus die Integration der DNA in das Genom des Embryos. Da rein statistisch aufgrund der langen Erkennungssequenz von *I-SceI* praktisch keine Schnittstellen im *Xenopus*-Genom vorhanden sein sollten, kann eine Fragmentierung der genomischen DNA ausgeschlossen werden. Die Methode ist technisch sehr einfach und gewährleistet eine hohe Überlebensrate der Embryonen. Eine Weitergabe der integrierten DNA an die F1-Generation konnte ebenfalls gezeigt werden (Pan *et al.* 2006). Dies ist im Zusammenhang mit dem hier durchgeführten Projekt besonders wichtig, da eine Integration und Expression in den Keimzellen für die gewählte Strategie unerlässlich ist.

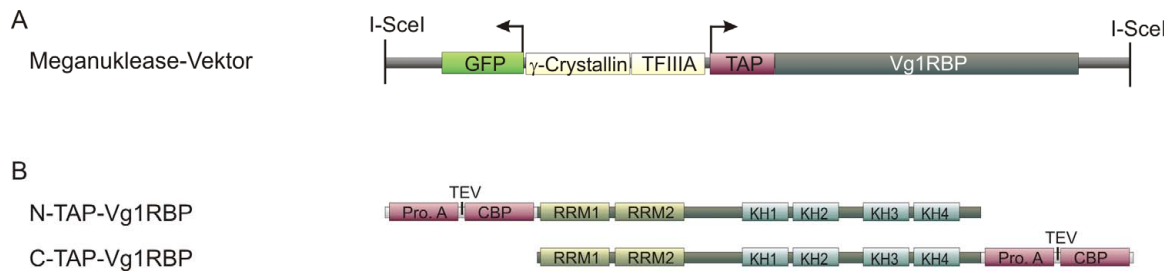
Um den Aufwand der Tierhaltung so gering wie möglich zu halten, ist es notwendig, transgene von nicht-transgenen Tieren möglichst früh zu unterscheiden und zu selektieren. Ideale Reporter sind fluoreszierende Proteine, da diese eine schnelle und nicht-invasive Analyse ermöglichen. Die Expression des Reporterproteins sollte unter der Kontrolle eines Promotors erfolgen, welcher nicht nur im frühen Embryo, sondern auch im erwachsenen Frosch in einem von außen gut sichtbaren Gewebe aktiv ist. Auf diese Weise können die positiven Embryonen schon sehr früh identifiziert, aber später auch die Frösche vor der Oozyten-Isolierung noch einmal überprüft werden. Diese Kriterien werden von dem Linsen-spezifischen  $\gamma$ -*Crystallin1*-Promotor erfüllt. Ein weiterer Vorteil ist die geringe benötigte Promotorlänge von nur 160 bp (Offield *et al.* 2000). Für diese Arbeit wurde allerdings ein Promotorfragment von 490 bp aus der  $\gamma$ -*Crystallin1*-GFP3-Expressionskassette des pCry1GFP3-Plasmids (Offield *et al.* 2000) verwendet.

Um eine Oozyten-spezifische Expression der Epitop-markierten Vg1RBP-Varianten zu gewährleisten, wurden diese unter die Kontrolle des *TFIIIA*-Promotors gestellt. Die Aktivität dieses Promotors ist im Frosch entwicklungsabhängig. Die stärkste Transkription des *TFIIIA*-Gens ist während der frühen Oogenese zu beobachten (Ginsberg *et al.* 1984). Innerhalb des *TFIIIA*-Promotors gibt es drei positiv-

regulierende Elemente E1, E2 und E3, die sich relativ zum Startkodon an den Positionen -269 bis -264 (E1), -235 bis -220 (E2) und -669 bis -636 (E3) befinden (Pfaff und Taylor 1992). Der Promotor wurde durch PCR direkt von genomischer DNA amplifiziert; die dafür verwendeten PCR-Primer wurden so gewählt, dass alle drei Elemente im Promotorfragment enthalten waren. Die Sequenz des amplifizierten Promotors wurde verifiziert, wobei festzustellen war, dass sie in einigen Basen von der von Pfaff und Taylor publizierten Sequenz abwich. Allerdings waren alle drei aktivierenden Elemente vollständig und korrekt vorhanden. Wahrscheinlich wurde in diesem Fall der Promotor einer allele Variante oder eines Pseudoallels amplifiziert.

Ein wichtiger Faktor bei der Affinitätsaufreinigung von Proteinen ist die Auswahl des Epitop-*Tags*, da dieser die Eigenschaften des Fusionsproteins und die Effizienz der Isolierung maßgeblich beeinflussen kann. Um große Proteinkomplexe mit vermutlich schwachen Bindungen zu isolieren, empfiehlt es sich, die Bedingungen möglichst nativ zu halten. Je milder die Aufreinigungsbedingungen, umso größer ist allerdings die Gefahr von Verunreinigungen. Eine Lösung für dieses Problem bietet die Strategie der Tandem-Affinitätschromatographie (TAP, Rigaut *et al.* 1999)). Hier werden zwei verschiedene Epitop-*Tags* hintereinander geschaltet, so daß zwei aufeinanderfolgende Aufreinigungsschritte unter möglichst nativen Bedingungen durchgeführt werden können. So wird eine schonende Aufreinigung bei hoher Spezifität gewährleistet. In dieser Arbeit wurde der TAP-*Tag* der Firma Cellzome (Heidelberg) verwendet. Er besteht aus einem distalen Protein-A-Anteil, welcher hochaffin an Immunglobuline bindet, und dem proximalen Calmodulin-bindenden Peptid (CBP). Beide Teile sind durch eine Schnittstelle der Tobacco-Etch-Virus-Protease (TEV) getrennt, was eine Elution durch Abspaltung des Protein-A-Anteils nach dem ersten Reinigungsschritt ermöglicht. Daraus ergibt sich folgende Aufreinigungsstrategie: 1. Bindung des Proteinkomplexes an IgG-Sepharose, 2. Elution durch TEV-Verdau, 3. Bindung an Calmodulin-Sepharose, 4. Elution durch Inkubation mit SDS. Es wurden sowohl N- als auch C-terminal TAP-markierte Vg1RBP-Varianten hergestellt.

Der Aufbau des Meganuklease-Plasmids mit den beiden Expressionskassetten kann der Abb. 3.2 entnommen werden.



**Abb. 3.2: Schematische Darstellung des Meganuklease-Plasmids und der TAP-Vg1RBP-Fusionsproteine.**

(A) Zwei Expressionskassetten werden von 18 bp langen Erkennungssequenzen der Endonuklease *I-SceI* flankiert. Der  $\gamma$ -*Crystallin1*-Promotor reguliert die Expression von GFP in der Augenlinse, während der Oozyten-spezifische *TFIIIA*-Promotor die Transkription des Epitop-markierten Vg1RBP kontrolliert. (B) Aufbau der TAP-Epitop-markierten Fusionsproteine. Es wurde sowohl ein Plasmid für N-terminal markiertes Vg1RBP, als auch ein Vektor für C-terminal markiertes Vg1RBP hergestellt. *I-SceI*: Meganuklease-Erkennungssequenz, GFP: grünfluoreszierendes Protein,  $\gamma$ -*Crystallin*:  $\gamma$ -*Crystallin1*-Promotor, *TFIIIA*: Transkriptionsfaktor-III-A-Promotor, TAP: kodierende Sequenz der Epitopmarkierung für die Tandem-Affinitätschromatographie, Vg1RBP: kodierende Sequenz des Vg1-RNA-bindenden Proteins, Pro. A: Protein A, CBP: Calmodulin-bindendes Peptid, TEV: *tobacco etch virus*-Protease, RRM 1/2: RNA-Erkennungsmotif, KH: hnRNP-K-Homologie-Domäne.

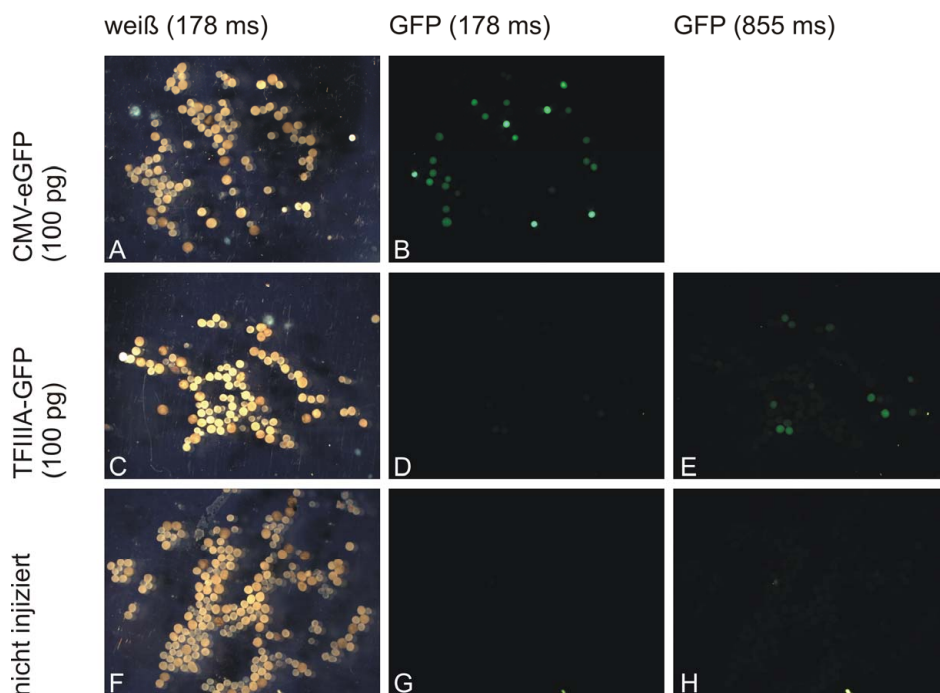
### 3.1.2. Promotoranalysen

Die Funktionalität der verwendeten Promotorfragmente wurde bereits beschrieben (Hall und Taylor 1989; Pfaff und Taylor 1992; Offield *et al.* 2000). Da diese aber von entscheidender Bedeutung für den experimentellen Ansatz ist, sollten die publizierten Ergebnisse nochmals bestätigt werden, um endgültige Gewissheit über die Promotoraktivitäten zu erlangen. Dazu wurden zwei verschiedene Techniken eingesetzt.

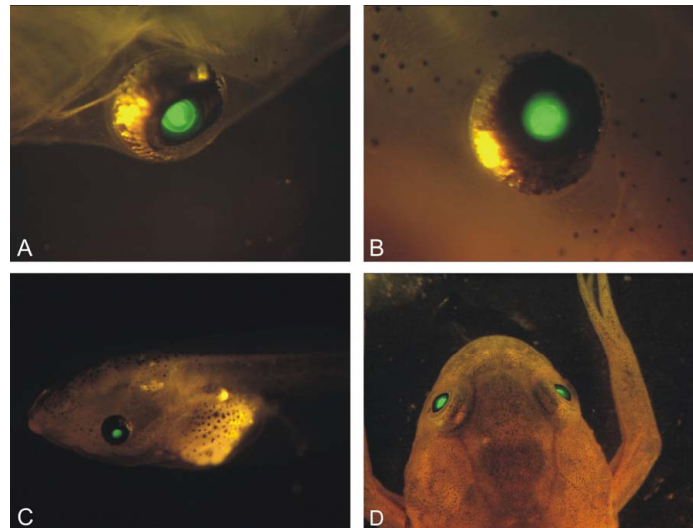
Um die Aktivität des *TFIIIA*-Promotor-Fragmentes in frühen Oozyten zu überprüfen, wurde dieses vor die kodierende Sequenz von GFP3 kloniert. 100 pg des *TFIIIA*-GFP3-Plasmids wurden anschließend in die Zellkerne von *Xenopus*-Oozyten der Stadien II und III injiziert. Nach 24 h wurde die Expression von GFP fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 3.3). Als Positivkontrolle diente ein Plasmid, in dem eGFP unter der Kontrolle des ubiquitär stark aktiven Cytomegalovirus (CMV)-Promotors steht. In den CMV-injizierten Oozyten zeigte sich eine starke GFP-Expression. Auch in den *TFIIIA*-injizierten Oozyten war die GFP-Fluoreszenz deutlich zu erkennen, jedoch schwächer als in der Positivkontrolle. Außerdem fluoreszierten

weniger Oozyten als in der Positivkontrolle. Da zwei verschiedene GFP-Varianten verwendet wurden, lässt sich die Transkriptionsaktivität der Promotoren nicht anhand der Fluoreszenz-Intensitäten messen. Der Vergleich mit den nicht-injizierten Kontrolloozyten belegt dennoch eindeutig die Aktivität des *TFIIIA*-Promotorfragmentes in frühen Oozyten.

Um die Aktivität des  $\gamma$ -*Crystallin1*-Promotors in den Linsen transgener Tiere zu überprüfen, wurde ein Fragment dieses Promotors vor die kodierende Sequenz von GFP geschaltet und in einen Vektor kloniert, in dem sie von zwei Meganuklease-Schnittstellen flankiert werden. Mit Hilfe der Meganuklease-Methode wurden transgene Embryonen hergestellt, welche auf die Expression von GFP in den Linsen hin untersucht wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass das 490-bp-Fragment des  $\gamma$ -*Crystallin1*-Promotors die Transkription von GFP ausreichend aktiviert (Abb. 3.4), um eine frühe Selektion transgener Tiere zu ermöglichen.



**Abb. 3.3: Das 670bp-Fragment des *TFIIIA*-Promotors ist in frühen *Xenopus*-Oozyten aktiv.** GFP-Expression nach Injektion von nicht-linearisierter Plasmid-DNA in Stadium II-III Oozyten. (A, B) CMV-eGFP, (C - E) *TFIIIA*-GFP und (F - H) nicht injizierte Kontroll-Oozyten. Die Oozyten wurden entweder unter Weißlicht (weiß) oder unter UV-Licht mit einem GFP-Filter (514 nm bis offen) analysiert. Die jeweiligen Belichtungszeiten sind in Klammern angegeben.



**Abb. 3.4: Expression des  $\gamma$ -Crystallin1-GFP-Reporters in den Linsen transgener *Xenopus laevis*.**

Transgene Tiere wurden mit der Meganuklease-Methode generiert und bei UV-Licht unter Verwendung eines GFP-Filters analysiert. (A - C) GFP-Expression in den Linsen transgener Embryonen und (D) eines transgenen Frosches.

### 3.1.3. Generierung transgener *Xenopus laevis* Frösche und Analyse der transgenen Tiere

Es wurden mittels der Meganuklease-Methode transgene *Xenopus-laevis*-Embryonen generiert und diese im Stadium 40 anhand der GFP-Fluoreszenz in der Augenlinse selektiert.

Die Anzahl der Tiere, die eine GFP-Expression zeigten, variierte dabei stark. In Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse von vier beispielhaften Injektionen von unterschiedlichen Tagen aufgelistet. Da  $\gamma$ -Crystallin1 ein starker Promotor ist, bestand die Möglichkeit, dass die beobachtete GFP-Expression von einer Transkription direkt vom nicht-integrierten Plasmid herrührte. Dies konnte daran erkannt werden, dass sich die GFP-Expression bei einigen Tieren im Laufe der Zeit durch eine durch Zellteilungen bedingte "Verdünnung" des Plasmids bzw. dessen Abbau verringerte.

Gesamtzahl	GFP-Expression in beiden Augen	GFP-Expression in einem Auge
92	6	9
100	32	17
70	4	14
120	14	23

**Tab. 3.1: Die Effizienz der Meganuklease-Methode.**

Erfasst wurden hier nur Embryonen, die bis zum Stadium 40 überlebten (Gesamtzahl).

Die Tiere wurden, unabhängig davon, ob sie GFP in beiden oder nur in einem Auge exprimierten, bis zur Geschlechtsreife aufgezogen. Eine Expression in einem Auge zeigte an, dass die Plasmid-Integration wahrscheinlich im Zweizellstadium stattfand. In diesem Fall wurden die Oozyten aus der jeweils positive Körperhälfte isoliert. Es wurde ein Geschlechterverhältnis von ungefähr 1/1 beobachtet (Tab. 3.2). Vor der operativen Isolierung der Oozyten wurde die GFP-Expression in den Linsen erneut überprüft, so dass sichergestellt war, dass nur GFP-positive Tiere analysiert wurden. Die Oozyten wurden durch Inkubation mit Kollagenase vereinzelt und anschließend auf die Integration der DNA und die Genexpression auf RNA- und Proteinebene untersucht.

Konstrukt	Gesamtzahl	weiblich	männlich
N-TAP-Vg1RBP	20	10	10
C-TAP-Vg1RBP	22	10	12

**Tab. 3.2: Gesamtzahl der adulten transgenen Frösche mit GFP-Expression.**

### 3.1.3.1. DNA-Analyse der transgenen Frösche

Für die DNA-Analyse wurden sehr frühe Oozyten der Stadien I – II verwendet, da sie im Verhältnis zur DNA ein besonders geringes Zellvolumen besitzen. Dies verringert den Anteil an RNA, welche die Aufreinigung der genomischen DNA stört. Mittels PCR wurde in der genomischen DNA die Präsenz des Transgens überprüft. Dafür wurden drei verschiedene Primerpaare verwendet, welche sowohl in den kodierenden Sequenzen von GFP und TAP-Vg1RBP als auch im *TFIIIA*-Promotor binden (Abb. 3.5A). Auf diese Weise wurde nicht nur die Integration, sondern auch eine eventuelle vorangegangene Fragmentierung und der mögliche Verlust von Teilen der transgenen DNA erkennbar. Abb. 3.5B zeigt, dass 11 der 19 analysierten Frösche in allen drei PCR-Analysen positiv waren (Frösche 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 14, 16, 18 und



**Abb. 3.5: Nachweis der transgenen DNA und RNA in den Oozyten GFP-exprimierender Frösche.**

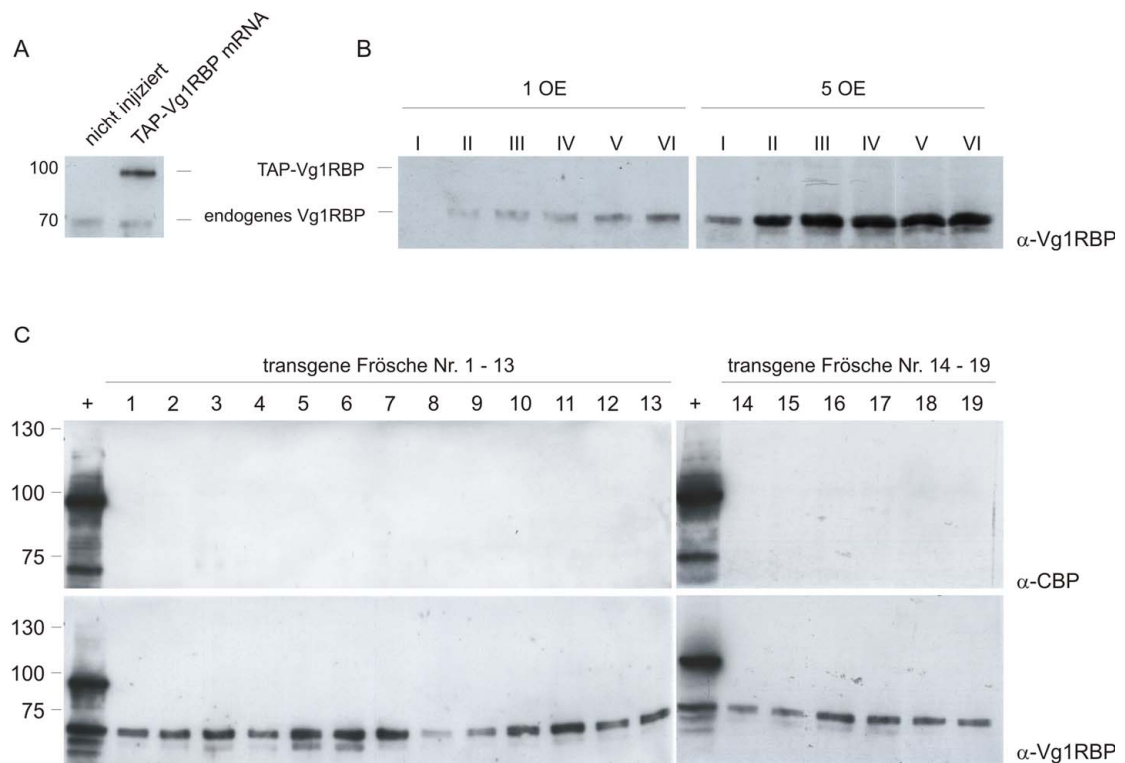
(A) Schematische Darstellung der Primer-Bindungsstellen im Meganuklease-Plasmid. Es wurden 3 Primerpaare verwendet. Primerpaar A bindet in der kodierenden Sequenz von GFP, Paar B/B' bindet im *TFIIIA*-Promotor und in der kodierenden Sequenz des Fusionsproteins, Paar C/C' bindet in den Sequenzen von Vg1RBP und des TAP-Tags. (B) Genomische DNA wurde aus den Oozyten transgener Frösche isoliert und mittels PCR auf die Integration der transgenen DNA untersucht. Die PCR mit Histon H4-Primern dient zur Beurteilung der Verwendung gleicher DNA-Mengen. Die Nummern entsprechen den laufenden Nummern der transgenen Frösche (vgl. Tabelle 3.3), wt – Wildtyp, H<sub>2</sub>O – Wasserkontrolle, pos. – Plasmid-DNA. Frosch 4 exprimiert zwar in einem Auge GFP, die Oozyten wurden aber fälschlicherweise aus der anderen Körperhälfte isoliert. (C) Analyse der RNA transgener Frösche durch RT-PCR. Gesamt-RNA wurde aus Stadium-III-Oozyten transgener Frösche isoliert, in cDNA umgeschrieben und durch PCR mit den oben angegebenen Primerpaaren analysiert. H4 – RT: PCR ohne vorherige reverse Transkription, um zu zeigen, dass die RNA-Präparation nicht mit genomischer DNA kontaminiert war. Histon H4 PCR dient zur Beurteilung der Verwendung gleicher RNA- bzw. cDNA-Mengen. Die Beschriftung ist identisch mit (B). Die PCR mit den Primern C/C' wurde mit 35 Zyklen durchgeführt, H4 mit 25 Zyklen und H4 – RT ebenfalls mit 35 Zyklen.

**3.1.3.3. Analyse der Proteinexpression**

Schließlich wurde die Genexpression auf der Proteinebene analysiert. Dafür wurden S16 Extrakte von Oozyten in einem SDS-PA-Gel aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und die Expression von TAP-Vg1RBP mit einem anti-Vg1RBP- und einem anti-CBP-Antikörper, welcher das Calmodulin-bindende Peptid im TAP-Tag erkennt, überprüft. Als Positivkontrolle diente Extrakt von Oozyten, in welchen TAP-Vg1RBP durch mRNA-Mikroinjektion überexprimiert wurde (Abb. 3.6A und C). Es wurde eine detaillierte Analyse durchgeführt, in der alle Stadien der Oozyten jedes Frosches einzeln und in verschiedenen Mengen untersucht wurden. Dies ist in Abb. 3.6B beispielhaft für ein Tier wiedergegeben. Abb. 3.6C zeigt eine Übersicht über alle untersuchten Frösche. Bei keinem der transgenen Frösche konnte eine Expression von TAP-Vg1RBP nachgewiesen werden. Die oben beschriebenen RT-PCR-Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Ursache für die fehlende Expression der TAP-markierten Vg1RBP-Variante auf der Transkriptionsebene zu suchen ist.

In Tabelle 3.3 sind die Ergebnisse aller Analysen zusammenfassend dargestellt.





**Abb. 3.6: Analyse der Expression von TAP-Vg1RBP in den Oozyten transgener Frösche.**

Die Oozyten adulter Frösche wurden isoliert und nach Stadien sortiert. S16 Oozytenextrakt aller Stadien wurde mittels SDS-PAGE und *Western Blot* untersucht. (A) TAP-Vg1RBP-Fusionsprotein wird nach mRNA-Injektion in Oozyten exprimiert und dient bei den Analysen als Positivkontrolle. Der Nachweis des endogenen und des rekombinanten Proteins erfolgte durch den anti-Vg1RBP-Antikörper. (B) Beispiel für die detaillierte Analyse der Proteinexpression, die für jedes der transgenen Tier durchgeführt wurde. S16 Extrakt von 1 bzw. 5 Oozytenäquivalenten (OE) wurde jeweils für die Oogenese-Stadien I - VI auf die Vg1RBP-Expression hin im *Western Blot* überprüft. (C) Übersicht über die Vg1RBP- und TAP-Vg1RBP-Expression aller analysierten Tiere. Hierfür wurde jeweils 1 Oozytenäquivalent aufgetragen. Vg1RBP wird durch den anti-Vg1RBP-Antikörper, der TAP-Tag durch einen anti-CBP-Antikörper nachgewiesen. Auf der linken Seite sind die Proteingrößen in kDa angegeben. Die Zahlen über den *Blots* entsprechen den laufenden Nummern der analysierten Frösche. + kennzeichnet die Positivkontrolle.

Frosch Nr.	Konstrukt	DNA-Integration		RNA- Expression	Protein-Expression	
		<i>γ-crys</i> -GFP	<i>TFIIIA</i> - TAP- Vg1RBP	TAP-Vg1RBP	<i>γ-crys</i> - GFP	TAP-Vg1RBP
1	N-TAP- Vg1RBP	+	(+)	-	+	-
2		-	-	-	+	-
3		+	+	(+)	+	-
4		-	-	-	-	-
5		+	+	-	+	-
6		+	+	-	+	-
7		+	-	-	+	-
8	Vg1RBP- C-TAP	+	(+)	-	+	-
9		+	+	(+)	+	-
10		+	+	-	+	-
11		+	+	+	+	-
12		-	-	-	+	-
13		+	-	+	+	-
14	N-TAP- Vg1RBP	+	+	-	+	-
15		-	-	-	+	-
16		+	+	-	+	-
17	Vg1RBP- C-TAP	+	-	-	+	-
18		+	+	-	+	-
19		+	+	-	+	-

**Tab. 3.3: Zusammenfassung der Analyse aller untersuchten transgenen Tiere.**

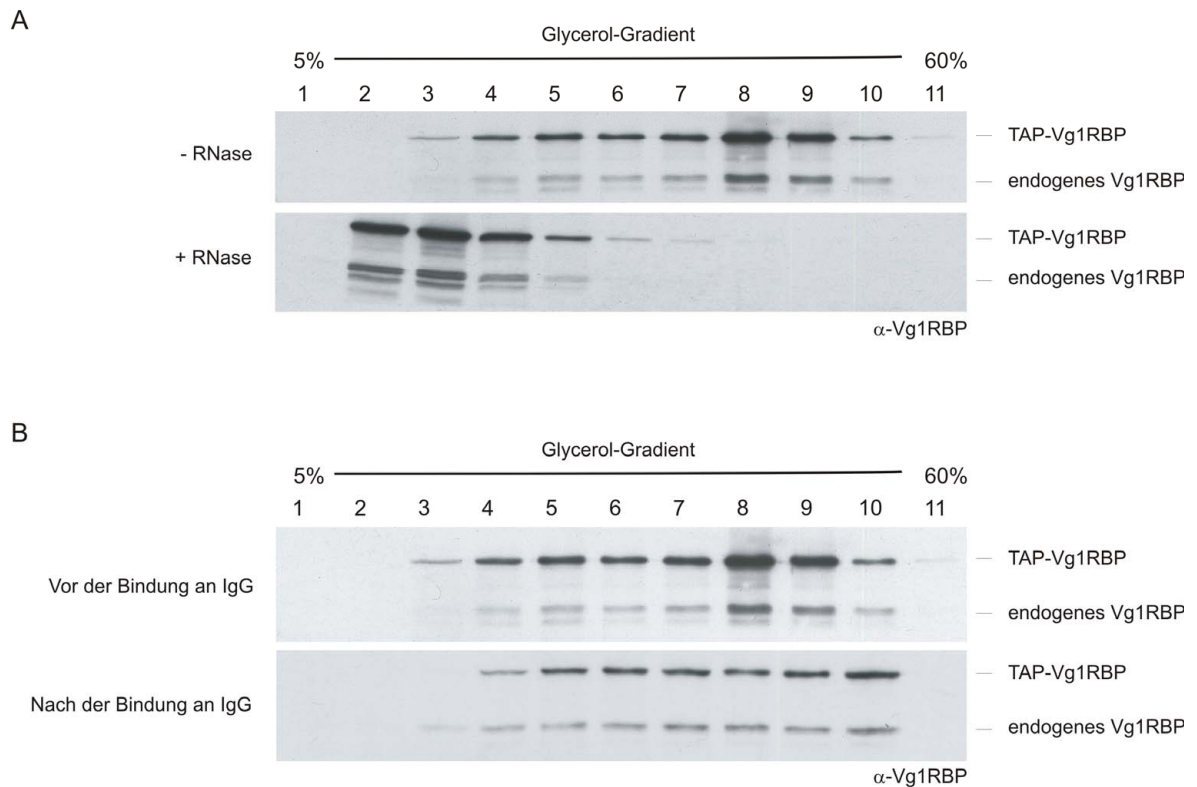
Angegeben sind die laufenden Froschnummern, welche auch in Abb. 3.4 und 3.5 für die Beschriftung der DNA-, RNA- und Proteinanalysen verwendet werden. + = starke Bande bzw. starke GFP-Fluoreszenz, (+) = sehr schwache Bande, - = keine Bande bzw. keine GFP-Fluoreszenz. Wie oben schon beschrieben, exprimierte Frosch 4 im Auge auf der analysierten Körperseite kein GFP.

### 3.1.4. Expression der rekombinanten Proteine durch Mikroinjektion von mRNA

Die Aufreinigung neuer Lokalisationsfaktoren gemeinsam mit Epitop-markiertem Vg1RBP aus den Oozyten transgener Frösche war nicht möglich, da das Fusionsprotein von den transgenen Tieren nicht exprimiert wurde. Daher wurde ein alternativer Ansatz verfolgt, in dem TAP-Vg1RBP nach Mikroinjektion von *in vitro* transkribierter mRNA in den Oozyten synthetisiert wird. Wie in Abbildung 3.5A

ersichtlich wird, konnte die Expression von TAP-Vg1RBP einfach mit Hilfe des anti-Vg1RBP-Antikörpers überprüft werden. Eine besondere Herausforderung besteht allerdings in der Überprüfung der Funktionalität der rekombinanten Proteine. Da die Aufgabe von Vg1RBP während der RNA-Lokalisation in der *Xenopus*-Oozyte bislang völlig unklar ist, gibt es keine funktionellen Tests, um diese verlässlich zu überprüfen. Allerdings ist bekannt, dass Vg1RBP bei Ultrazentrifugation von Oozytenextrakt mit ER-Markern und Ribosomen kosedimentiert (Deshler *et al.* 1997). Dies deutet darauf hin, dass das Protein Teil großer Komplexe ist. Bei vorheriger Inkubation des Extraktes mit RNase verringert sich die Sedimentationsgeschwindigkeit von Vg1RBP erheblich. Die Komplexe enthalten also einen RNA-Anteil und zerfallen, wenn die RNA degradiert wird.

Um endogenes mit Epitop-markiertem Protein zu vergleichen, wurde dieses Experiment mit dem Extrakt von TAP-Vg1RBP-exprimierenden Oozyten durchgeführt und zeigte, dass sich die TAP-markierte Variante bei Ultrazentrifugation im Glycerolgradienten (zur Verringerung der Sedimentationsgeschwindigkeit) fast genau wie endogenes Vg1RBP verhält (Abb. 3.7A). Nach der Fraktionierung ist der größte Anteil beider Proteine in der Fraktion 8 zu finden. Wird dem Extrakt jedoch RNase zugegeben, befinden sich die Proteine hauptsächlich in den Fraktionen 2 bis 4. TAP-Vg1RBP scheint also ebenfalls in große RNA-Protein-Komplexe integriert zu werden, und demzufolge funktionell zu sein. Es ist allerdings ersichtlich, dass nur ein Teil von Vg1RBP in die schweren Fraktionen sedimentiert, der Rest scheint in kleineren Komplexen gebunden. Um auszuschließen, dass Komplex-gebundenes TAP-Vg1RBP für die Affinitätsaufreinigung überhaupt nicht zugänglich ist, wurde der erste Schritt des Tandem-Protokolls (die Bindung an IgG-Sepharose) im kleinen Maßstab durchgeführt, und der nicht gebundene Überstand im Glycerolgradienten zentrifugiert. Der Vergleich des Startmaterials mit dem Überstand nach der IgG-Bindung zeigt, dass nicht nur TAP-Vg1RBP aus den leichten Fraktionen, sondern auch aus den höheren Fraktionen depletiert wurde (Abb. 3.7B). TAP-markiertes Vg1RBP ist also auch in großen Komplexen genügend zugänglich und kann mit Hilfe von IgG-Sepharose isoliert werden. Damit sind die Voraussetzungen für die Durchführung der alternativen Strategie also gegeben.

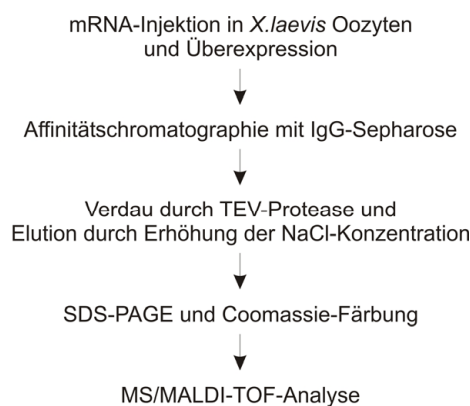


**Abb. 3.7: TAP-Vg1RBP ist in Komplexen derselben Größenordnung gebunden wie endogenes Vg1RBP und kann daraus mit IgG-Sepharose gebunden werden.**

TAP-Vg1RBP wurde durch mRNA-Mikroinjektion und in Oozyten überexprimiert. S16 Oozytenextrakt wurde wie unten beschrieben behandelt und anschließend durch Ultrazentrifugation in einem Glycerolgradienten aufgetrennt und fraktioniert. Die Verteilung von TAP-markiertem und endogenem Vg1RBP in den einzelnen Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE und *Western Blot* analysiert. Die Nummern über Spuren geben die einzelnen Fraktionen an, wobei 1 der Fraktion geringster Dichte und 11 der Fraktion mit der höchsten Dichte entspricht. Rechts sind die Positionen von TAP-Vg1RBP und Vg1RBP angegeben (A) Verteilung von TAP-Vg1RBP und Vg1RBP nach Inkubation in Ab- bzw. Anwesenheit von RNase A. (B) S16 Oozytenextrakt wurde über Nacht mit IgG-Sepharose inkubiert und der ungebundene Überstand anschließend durch Ultrazentrifugation in einem Glycerolgradienten aufgetrennt und fraktioniert. Die Proteinverteilung in den einzelnen Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE und *Western Blot* analysiert.

### 3.1.5. Aufreinigung der Riboproteinkomplexe mittels Tandem-Affinitätschromatographie

Um eine für die Affinitätschromatographie ausreichende Menge an Ausgangsmaterial herzustellen, wurde jedes Fusionsprotein in 1000 Oozyten der Stadien III – IV exprimiert. Zusätzlich wurde das *in vitro* transkribierte Lokalisationselement von Velo 7 ko-injiziert, um die Bildung neuer Lokalisationskomplexen zu induzieren. Überdies wurde in UV-Quervernetzungsexperimenten gezeigt, dass Velo 7 stark an Vg1RBP bindet (P. Arthur, S. Koch, unveröffentlichte Daten). Alle Aufreinigungsschritte wurden unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt, um die Integrität der RNP-Komplexe zu gewährleisten. Der Ablauf des Reinigungsprotokolls ist in Abb. 3.8 schematisch dargestellt.



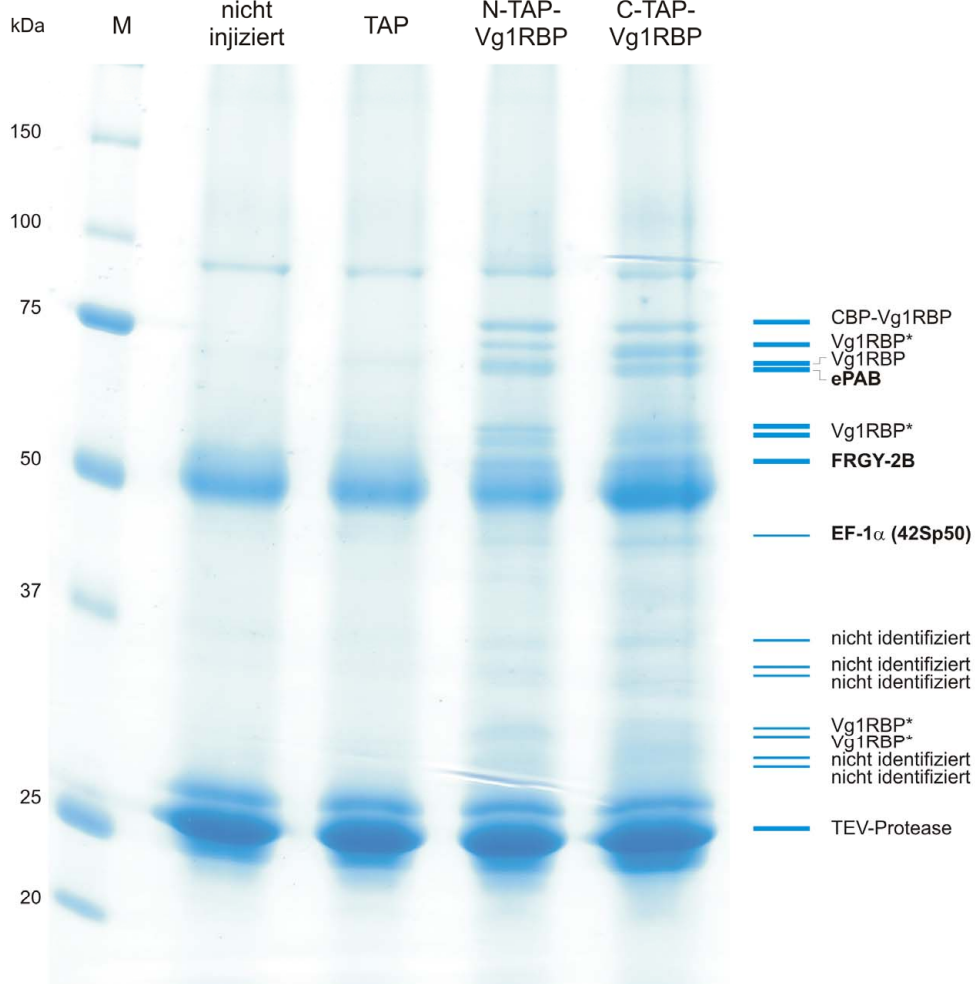
**Abb. 3.8: Schematische Darstellung der Affinitätsaufreinigung Vg1RBP-bindender Proteine im großen Maßstab.**

Das genaue Aufreinigungsprotokoll kann dem Kapitel 2.2.3.9 entnommen werden.

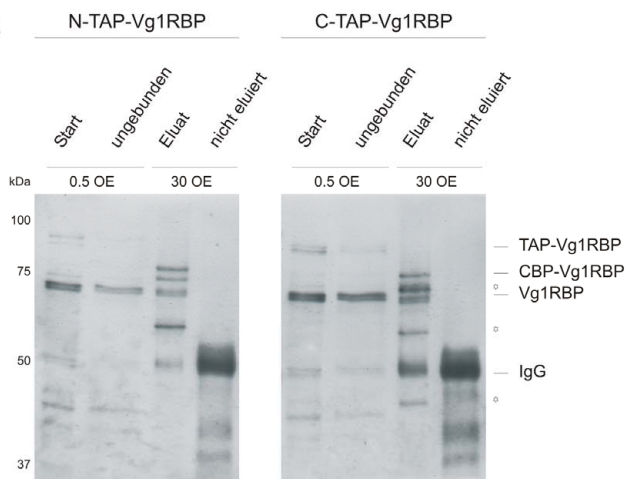
Aus den Oozyten wurde S16 Extrakt mit einem Gesamtprotein-Gehalt von ca. 9 mg gewonnen und mit IgG-Sepharose inkubiert. Die Sepharose wurde gewaschen und in einen für die TEV-Protease optimierten Puffer überführt. Dann wurde das Fusionsprotein vom gebundenen Protein-A-Anteil durch TEV abgeschnitten und die NaCl-Konzentration erhöht, um die Proteinkomplexe zu eluieren. Im ursprünglichen Tandem-Protokoll wäre nun ein zweiter Aufreinigungsschritt durchzuführen. Auf diesen wurde hier aus folgenden Gründen verzichtet: In Vorexperimenten war festgestellt worden, dass schon bei der Bindung des Proteins an und der Elution von der IgG-Sepharose ein bedeutender Anteil an Protein verloren geht. Außerdem erfolgte die Bindung an Calmodulin-Sepharose äußerst ineffizient und die Qualität der Calmodulin-Matrix kann stark schwanken (persönliche Mitteilung von R. P. Jansen). Deshalb wurde

das Eluat des ersten Reinigungsschrittes direkt analysiert und auf den zweiten Schritt verzichtet. Die eluierte Lösung in einem SDS-PA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels kolloidalem Coomassie angefärbt (Abb. 3.9).

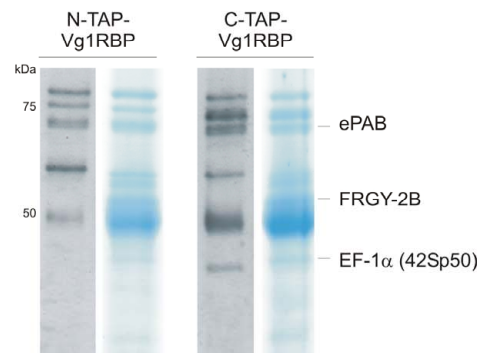
A



B



C



**Abb. 3.9: TAP-Vg1RBP-bindende Proteine können spezifisch durch Affinitätschromatographie mit IgG-Sepharose isoliert werden.**

TAP-Vg1RBP bzw. TAP-Tag wurde durch mRNA-Mikroinjektion und anschließender Inkubation in Oozyten der Stadien III-IV exprimiert. S16 Oozytenextrakt wurde über Nacht mit IgG-Sepharose inkubiert und die gebundenen Proteinkomplexe durch Verdau mit TEV-Protease eluiert. Die Proteine wurden einkonzentriert, ausgefällt und analysiert. (A) Auftrennung der Eluate in einem 8-16%igen SDS-PA-Gel. Proteine wurden durch Färbung mit kolloidalem Coomassie detektiert. Links sind die jeweiligen Proteingrößen in kDa angegeben. Rechts sind die Proteinbanden schematisch dargestellt, die für die massenspektrometrische Analyse gepickt wurden. Die jeweils identifizierten Proteine sind angegeben. Mit einem Stern sind Abbau-Produkte von CBP-Vg1RBP bzw. endogenem Vg1RBP gekennzeichnet. Die Namen der drei Kandidatenproteine sind fett hervorgehoben. (B) Es wurden äquivalente Mengen Startmaterial und ungebundener Extrakt (0,5 Oozytenäquivalente, OE) bzw. Eluat und ungebundenes Material (~ 30 Oozytenäquivalente, OE) in einem SDS-PA-Gel aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Die verschiedenen Formen von Vg1RBP wurden mit einem anti-Vg1RBP-Antikörper nachgewiesen. TAP-, CBP- und endogenes Vg1RBP sind rechts gekennzeichnet. Mit einem Stern sind Vg1RBP-Abbau-Produkte markiert. (C) Gegenüberstellung der Eluat-Banden aus (A) und (B). Links sind jeweils die Proteingrößen in kDa angegeben, rechts die Positionen der spezifisch ko-präzipitierten Proteine gekennzeichnet.

Dabei zeigte sich, dass in den beiden Kontrollproben (nicht injizierte und TAP-Tag exprimierende Oozyten) nur wenige Proteine unspezifisch gebunden waren. Es wurde also bereits durch die Bindung an IgG-Sepharose ein erhebliches Maß an Reinheit erzielt. Die beiden TAP-Vg1RBP-Proben zeigen dagegen ein fast identisches Bandenmuster (Abb. 3.9). Die Position des Epitop-Tags scheint demnach keinen Einfluß auf die Interaktionen mit Bindungspartnern zu haben. Als eine weitere Kontrolle wurde ein Aliquot der IgG-Eluate im *Western Blot* auf die Anwesenheit von Vg1RBP untersucht. Dabei wurde deutlich, dass die meisten Banden des Coomassie-Gels von Vg1RBP herrühren (Abb. 3.9A). So finden sich im Eluat sowohl CBP-Vg1RBP als auch endogenes Vg1RBP. Dies war zu erwarten, da Vg1RBP bekanntermaßen Homodimere bildet (Git und Standart 2002), und TAP-Vg1RBP demzufolge mit endogenem Vg1RBP interagiert. Die für endogenes Vg1RBP typische Doppelbande läßt sich wahrscheinlich auf eine Isoform von Vg1RBP zurückführen (Griffin *et al.* 2003). Es wurden aber auch Banden geringerer Größen von dem anti-Vg1RBP-Antikörper detektiert und als Vg1RBP in der massenspektrometrischen Analyse identifiziert, was auf Degradation während der Aufreinigung schließen läßt. Dies war während der durchgeführten Vorexperimente nicht zu beobachten gewesen und rührt deshalb wahrscheinlich von Volumen-reduzierenden Schritten her, die durch den großen Maßstab notwendig

wurden. Eine Gegenüberstellung von *Western Blot* und Coomassie-Gel zeigt, dass sich die Western-Blot-Banden eindeutig denen des Gels zuordnen lassen (Abb. 3.9B).

Alle sichtbaren Banden wurden gepickt und massenspektrometrisch von der Arbeitsgruppe *Proteomics* des MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen, analysiert. Abgesehen von Vg1RBP konnten drei Proteine eindeutig identifiziert werden (Tab. 3.4): embryonales Poly(A)-bindendes Protein (ePAB), Y-Box-bindendes Protein 2B (FRGY-2B) und 42Sp50, eine Form des Elongationsfaktors 1 alpha (EF-1 $\alpha$ ). An dieser Stelle muß erwähnt werden, dass die Identifizierung von ePAB zunächst durch den Umstand erschwert wurde, dass es im Gel mit derselben Geschwindigkeit wie Vg1RBP migriert. In der entsprechenden Bande wurde ePAB dementsprechend von Vg1RBP maskiert. Aus diesem Grund wurden in der ersten MS-Analyse nur Vg1RBP-Peptide sequenziert, obwohl die Probe auch Peptide enthielt, die ePAB zugeordnet werden konnten. Eine detailliertere Untersuchung ergab, dass ePAB tatsächlich in der Probe vorhanden war. Die Position der entsprechenden Proteinbanden im Coomassie-Gel ist in Abb. 3.9 durch blaue Balken gekennzeichnet. Außerdem sind die Ergebnisse der Analyse in Tabelle 3.4 zusammengefaßt.

Um zu überprüfen, ob die identifizierten Proteine ausschließlich durch die Bindung an TAP-Vg1RBP isoliert wurden, wurden dem Gel an den entsprechenden Positionen in der TAP-Kontrollspur Proben entnommen und massenspektrometrisch analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Proteine in der Kontrollspur nicht vorhanden waren und damit spezifisch an TAP-Vg1RBP binden.

Protein	MS/MS-Score	Zugangsnummer der Proteindatenbank	sequenzierte Peptide	erstmalig beschrieben
Vg1RBP	233	AAC41285.1, GI:3136158	FTITIIDAPGHR ITISPLQDLTYNPER	(Schwartz <i>et al.</i> 1992)
ePAB	27	Q98SP8.2, GI:94711253	IVSTKPLYVALAQR	(Voeltz <i>et al.</i> 2001)
FRGY-2b	86	P45441.1, GI:1175534	RPPPPFFYR EDVFEVHQTAK	(Tafari und Wolffe 1990)
EF-1 $\alpha$ (42Sp50)	192	P17506.2, GI: 416929	FFDYPPLGR FTITIIDAPGHR	(Dje <i>et al.</i> 1990)

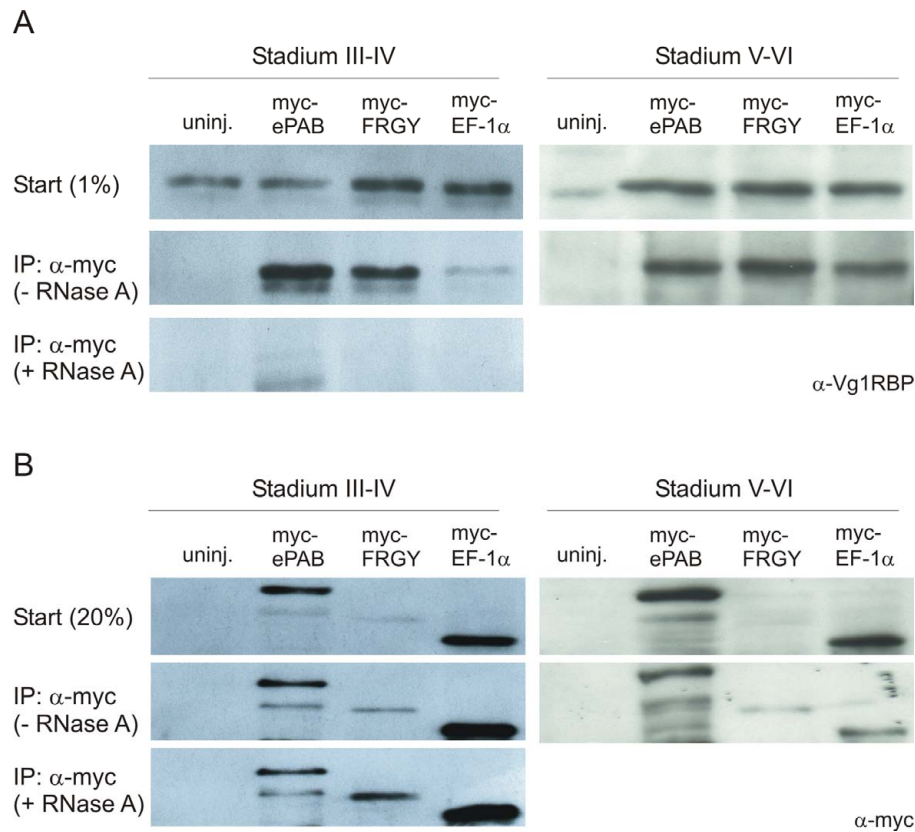
**Tab. 3.4: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse.**



### 3.1.6. Funktionelle Analyse der identifizierten Interaktionspartner

#### 3.1.6.1. ePAB, FRGY-2B und EF-1 $\alpha$ assoziierten in Abhängigkeit von RNA mit Vg1RBP

In der massenspektrometrischen Analyse waren drei potentielle Bindungspartner für Vg1RBP identifiziert worden. Für diese wurde die Bindung an Vg1RBP nochmals in einem unabhängigen Experiment überprüft und geklärt, ob es sich hier um direkte Protein-Protein-Interaktionen handelt, oder ob diese über die Bindung an dieselben RNA-Moleküle vermittelt wird. Zur Beantwortung dieser Fragen wurden Ko-Immunopräzipitationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden Myc-Epitop-markierte Konstrukte für ePAB, FRGY-2B und EF-1 $\alpha$  *in vitro* transkribiert und die RNA in Stadium III-IV und Stadium V-VI Oozyten injiziert. Die exprimierten Fusionsproteine wurden von anti-Myc-Antikörpern gebunden und mit Protein-A-Sepharose präzipitiert. Proteine, welche an das Myc-Fusionsprotein binden, können auf diese Weise ko-präzipitiert und anschließend im *Western Blot* nachgewiesen werden. Die Präzipitate wurden sowohl auf die Anwesenheit von Vg1RBP (Abb. 3.10A), als auch der Myc-Fusionsproteine selbst (Abb. 3.10B) überprüft. Zunächst ist festzustellen, dass die Myc-Proteine unterschiedlich stark exprimiert werden, aber in den Präzipitaten eindeutig nachzuweisen sind. Wie ersichtlich wird, kann Vg1RBP mit allen drei Proteinen ko-immunopräzipitiert werden, allerdings nur in Anwesenheit intakter RNA im Oozytenextrakt (- RNase). Wird die RNA degradiert (+ RNase), geht auch die Assoziation zwischen den Proteinen verloren. Dies läßt auf eine indirekte Interaktion zwischen Vg1RBP und den drei Kandidatenproteinen, an der RNA essentiell beteiligt ist, schließen. Auffallend ist, dass Myc-FRGY-2B, obwohl es nur sehr schwach exprimiert wird (Abb. 3.10B), Vg1RBP trotzdem effizient ko-immunopräzipitieren kann (Abb. 3.10A). Außerdem scheint die Assoziation zwischen EF-1 $\alpha$  und Vg1RBP in Stadium VI Oozyten stärker zu sein als in Stadium III-IV Oozyten, da in letzteren die Vg1RBP Bande nach der Immunopräzipitation von EF-1 $\alpha$  nur sehr schwach, bei Verwendung der älteren Oozyten aber stärker ist. Für ePAB und FRGY-2B kann dieser Stadien-abhängige Unterschied nicht beobachtet werden (Abb. 3.10A).



**Abb. 3.10: ePAB, FRGY-2B und EF-1 $\alpha$  binden indirekt und RNA-abhängig an Vg1RBP.**

Myc-Epitop-markierte Proteine wurden nach mRNA-Injektion in Oozyten der Stadien III-IV und V-VI exprimiert. Es wurde S16 Extrakt hergestellt und für 2 h mit anti-Myc-Antikörper in An- bzw. Abwesenheit von RNase A inkubiert. Die Protein-Antikörper-Komplexe wurden mit Protein-A-Sepharose präzipitiert und im *Western Blot* analysiert. (A) Vg1RBP im Startmaterial (1 Oozyten-Äquivalent, OE) und in den Ko-Immunopräzipitaten (100 OE). In Anwesenheit intakter RNA kann Vg1RBP mit allen drei Proteinen ko-präzipitiert werden. (B) Kontrolle der Expression und Immunopräzipitation (IP) der Myc-Fusionsproteine. Die Proteine werden unterschiedlich stark exprimiert (Start, 1 OE), aber sowohl in An- als auch in Abwesenheit von RNase effizient immunopräzipitiert (IP, 5 OE).

Die Assoziation der drei Kandidatenproteine an Vg1RBP konnte also bestätigt werden. Doch findet diese Interaktion auch im Kontext der RNA-Lokalisierung statt? Zur Beantwortung dieser Frage soll zunächst untersucht werden, ob die drei hier identifizierten Vg1RBP-Interaktionspartner auch mit anderen bekannten Transportfaktoren interagieren.

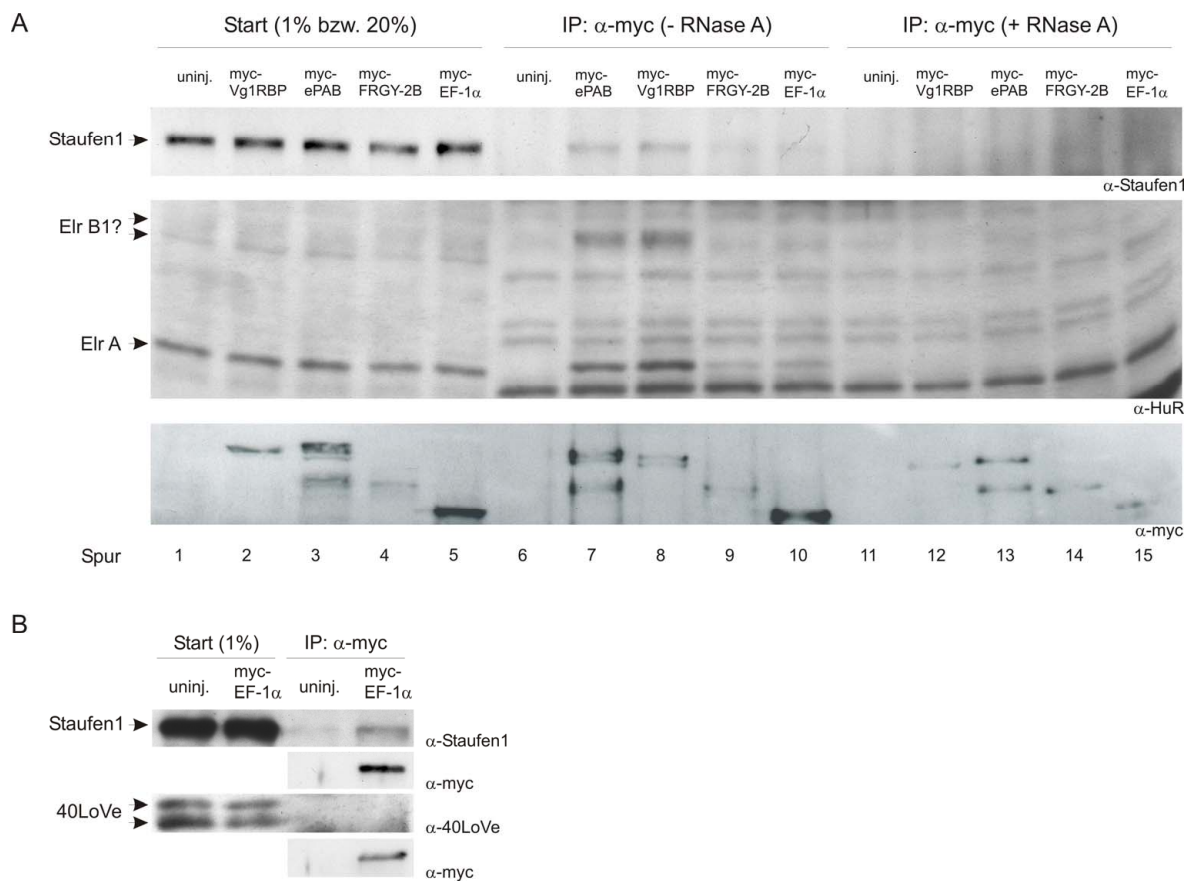
### 3.1.6.2. ePAB, FRGY-2B und EF-1 $\alpha$ interagieren auch mit anderen *trans*-agierenden Lokalisationsfaktoren

Für die Analyse der Interaktionen zwischen den drei Kandidatenproteinen und bekannten Transportfaktoren wurde das oben beschriebene Experiment wiederholt und mit spezifischen Antikörpern getestet, welche dieser Faktoren in den Präzipitaten vorhanden waren. Um gleichzeitig Informationen die RNA-Abhängigkeit möglicher Bindungen zu erhalten, wurde die Immunopräzipitation sowohl unter RNase-freien Bedingungen als auch in Anwesenheit von RNase durchgeführt. Die Expression der Epitop-markierten Proteine und die Effizienz der Immunopräzipitation wurden im *Western Blot* mit Hilfe eines anti-Myc-Antikörpers kontrolliert.

In Abb. 3.11A ist zunächst zu erkennen, dass Myc-markiertes EF-1 $\alpha$  gut, Vg1RBP und ePAB dagegen nur schwach, und FRGY-2B sehr schwach exprimiert wurden (Spur 2 – 5). Alle Myc-Proteine können immunopräzipitiert werden (Spur 7 – 10, 12 – 15).

Sowohl Vg1RBP als auch ePAB assoziieren mit Staufen, einem *trans*-agierenden Lokalisationsfaktor (Allison *et al.* 2004; Yoon und Mowry 2004), und ElrA, einem Mitglied der Elav-Familie, welche erst kürzlich mit der RNA-Lokalisation in Verbindung gebracht wurde (Spur 7, 8, Arthur *et al.*, Manuskript eingereicht). Inwieweit auch ElrB1 mit Vg1RBP und ePAB assoziiert, kann nicht eindeutig festgestellt werden, da zwar ein Protein mit der ungefähren Größe von ElrB1 in den Präzipitaten von Vg1RBP und ePAB detektiert werden kann, dieses aber im Startmaterial nicht zu erkennen ist. Eine schwache Bande im Startmaterial, die ebenfalls ElrB1 entsprechen könnte, wird dagegen nicht in den Immunopräzipitaten detektiert. Nach Zugabe von RNase sind Staufen und ElrA nicht mehr in den Präzipitaten nachweisbar (Abb. 3.11A, Spur 12, 13), d.h. die Interaktionen sind abhängig von intakten RNA-Molekülen.

Für FRGY-2B und EF-1 $\alpha$  sind die Assoziationen zu den untersuchten Proteinen nicht so eindeutig zu detektieren. Staufen ist in den Immunopräzipitaten kaum zu sehen (Spur 9, 10), und auch die potentielle ElrB1-Bande ist fast nicht zu erkennen. Allerdings kann ElrA eindeutig nachgewiesen werden, wenn auch schwächer als in den Präzipitaten von Vg1RBP und ePAB. Die Zugabe von RNase hat auch hier den Verlust der Assoziation zu ElrA zur Folge (Spur 14, 15). In Abb. 3.11B ist eindeutig zu erkennen, dass EF-1 $\alpha$  tatsächlich mit Staufen interagiert. Interessanterweise kann aber 40LoVe, ein weiterer *trans*-agierender Lokalisationsfaktor, nicht mit EF-1 $\alpha$  immunopräzipitiert werden (Abb. 3.11B, Czaplinski *et al.* 2005). Da der Nachweis von 40LoVe in Immunopräzipitaten aufgrund starker unspezifischer Bindungen des verfügbaren Antikörpers schwierig ist, wurden die Interaktionen zwischen Vg1RBP, ePAB und FRGY-2B hier nicht untersucht.



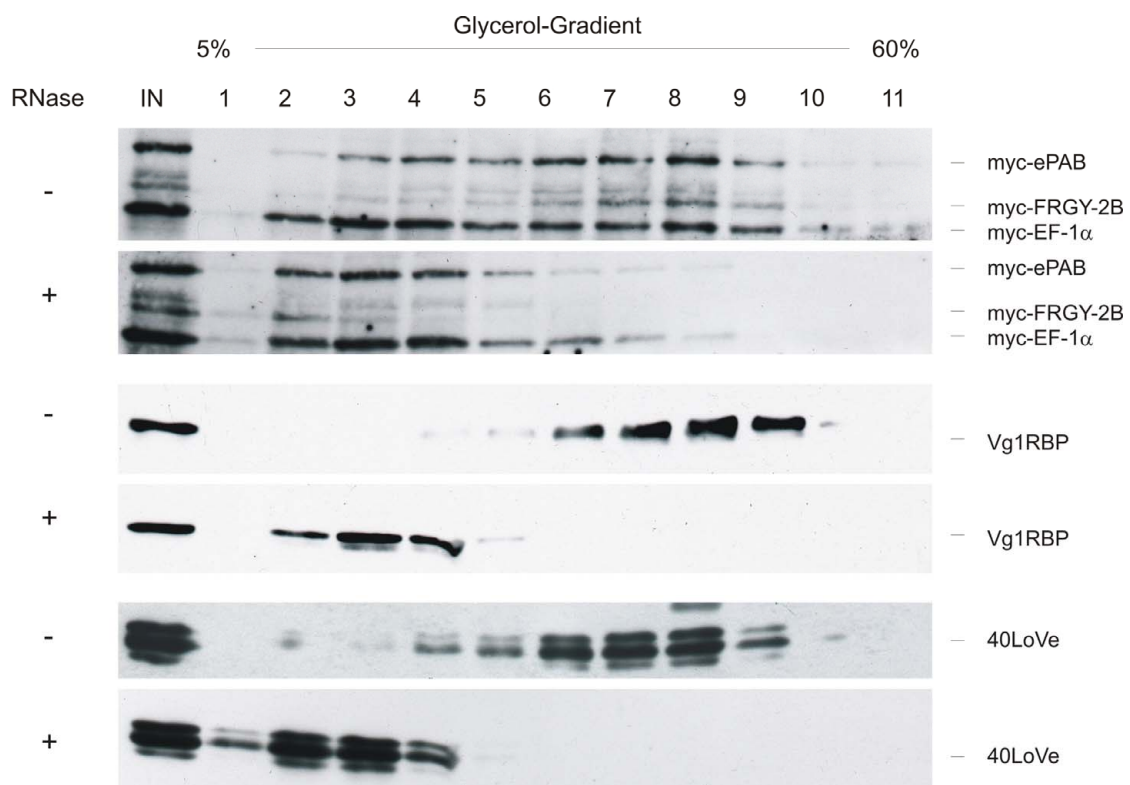
**Abb. 3.11: ePAB, FRGY-2B und EF-1 $\alpha$  binden auch an andere Proteinkomponenten des mRNA-lokalisierenden Komplexes.**

Myc-Epitop-markierte Versionen von Vg1RBP, ePAB, FRGY-2b und EF-1 $\alpha$  wurden nach mRNA-Mikroinjektion in Oozyten der Stadien III und IV exprimiert. Es wurde S16 Extrakt angefertigt und für 2 h mit anti-Myc-Antikörper in An- bzw. Abwesenheit von RNase A inkubiert. Die Protein-Antikörper-Komplexe wurden mit Protein-A-Sepharose präzipitiert und im Westen Blot analysiert. (A) Nachweis von Staufen1, Elr A und B1 und der Myc-Fusionsproteine in den Immunopellets. Dabei wurde 1 OE S16 Extrakt (Start) und 100 OE Immunopräzipitat (IP) für die Analyse mit  $\alpha$ -Staufen1 und  $\alpha$ -HuR zur Detektion der Elav-Proteine bzw. 5 OE Immunopräzipitat für die Analyse mit  $\alpha$ -myc aufgetragen. (B) Wiederholung der Immunopräzipitation von myc-EF-1 $\alpha$  zur Überprüfung von Staufen1 und 40LoVe unter RNase-freien Bedingungen.

Weitere Hinweise über eine mögliche Assoziation können, wie unter 3.1.4 bereits erörtert, über die Sedimentationsgeschwindigkeit in einem Schwerfeld erhalten werden. Für diese Untersuchung wurden die drei zu analysierenden Proteine als Myc-markierte Fusionsproteine in Stadium III-IV Oozyten exprimiert. Das Oozytenextrakt wurde mit bzw. ohne RNase inkubiert und anschließend in der Ultrazentrifuge in einem Glycerolgradienten zentrifugiert und fraktioniert. Die Fraktionen wurden halbiert und

jeweils in zwei SDS-PA-Gelen aufgetrennt. Mittels *Western Blot* konnte nun die Ko-Sedimentation mit verschiedenen Lokalisationsfaktoren überprüft werden. Aus Abb. 3.12 wird ersichtlich, dass sich die drei Kandidatenproteine fast über den gesamten Gradienten verteilen. Dabei ist ein nicht unerheblicher Anteil in den Fraktionen 6 bis 9 zu finden, in welchen sich auch Vg1RBP und 40LoVe als RNA-Transportkomplex-Marker befinden. Wird die RNA degradiert, zerfallen die Ribonucleoprotein-Partikel und die Proteine erreichen die schweren Fraktionen nicht mehr. Sie scheinen also nur in Anwesenheit von RNA in große RNA-Protein-Komplexe eingebunden zu sein.

Zusammenfassend weisen die Experimente zur Untersuchung der Protein-Protein-Interaktionen darauf hin, dass die in dieser Arbeit identifizierten Vg1RBP-Bindungspartner ePAB, FRGY-2B und EF-1 $\alpha$  *in vivo* mit bereits bekannten Lokalisationsfaktoren interagieren und demzufolge tatsächlich an der Lokalisierung von RNA-Molekülen beteiligt sein könnten.



**Abb. 3.12: ePAB, FRGY-2B und EF-1a ko-sedimentieren im Schwerefeld mit den Lokalisationsfaktoren Vg1RBP und 40LoVe.**

Myc-markierte Fusionsproteine wurden in Stadium III-IV Oozyten exprimiert. S16 Extrakte der Oozyten wurden mit oder ohne RNase A inkubiert, im Glycerol-Gradienten durch Ultrazentrifugation aufgetrennt, fraktioniert und mittels SDS-PAGE und *Western Blot* mit anti-Myc-, anti-Vg1RBP und anti-40LoVe-Antikörpern analysiert. IN – unfractionierter S16 Extrakt. Die Nummerierung gibt die Fraktionen an, wobei 1 der geringsten und 11 der höchsten

Glycerol-Konzentration und Sedimentationsgeschwindigkeit entspricht. Rechts sind die jeweiligen Proteine angegeben. Die An- bzw. Abwesenheit von RNase ist links neben dem jeweiligen *Western Blot* durch + oder - angegeben.

### **3.1.6.3. ePAB, FRGY-2B und EF-1 $\alpha$ binden ebenso wie Vg1RBP an lokalisierte und nicht lokalisierte Transkripte**

Interaktionen zwischen verschiedenen biologischen Makromolekülen können auf vielfältige Weise nachgewiesen werden. An dieser Stelle bieten sich aufgrund der einfachen Durchführung Ko-Immunopräzipitationsstudien an. In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurden die zu untersuchenden Proteine mit einem Myc-Epitop versehen und mit RNA *in vitro* bzw. *in vivo* inkubiert. Die Präzipitation erfolgte dann durch eine anti-Myc-Antikörper-vermittelte Immobilisierung an Protein-G- bzw. Protein-A-Sepharose. Die ko-präzipitierte RNA wurde dann entweder über ihre Fluoreszenz-Markierung oder mittels RT-PCR nachgewiesen.

Zunächst wurde die Bindung bestimmter RNAs an die Kandidatenproteine *in vitro* überprüft. Hierzu wurden die verwendeten Proteine in Retikulozytenlysate *in vitro* translatiert und die RNA-Moleküle *in vitro* transkribiert und dabei Fluoreszenz-markiert. Nach einer gemeinsamen Inkubation wurden die Proteine mit einem anti-Myc-Antikörper immunopräzipitiert, RNA und Protein mit Phenol/CHCl<sub>3</sub> extrahiert, in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und analysiert (Abb. 3.13A). Diese Art von Experimenten wurde bislang mit radioaktiv markierter RNA durchgeführt. In diesem Fall wurde statt radioaktiv markierter Nukleotide Alexa-UTP verwendet, welches anschließend mit Hilfe eines Fluoreszenz-Imagers detektiert wurde.

Um potentielle Degradation der RNA während der Bindung und der Aufreinigung zu überprüfen, wurde die RNA aus dem ungebundenen Überstand auf die gleiche Weise isoliert und ebenfalls im Harnstoffgel analysiert (Abb. 3.13F). Zur Überprüfung der Translations- und Immunopräzipitationseffizienz wurden die Proteine aus der Phenolphase durch Zugabe von Aceton ausgefällt, im SDS-PA-Gel aufgetrennt und mittels *Western Blot* analysiert. Um ausschließen zu können, dass die Alexa-RNAs unspezifisch an den Antikörper oder die Sepharose binden, wurde als Negativkontrolle Retikulozytenlysate ohne Zugabe von Plasmid-DNA mitgeführt, in welchem keine Proteinsynthese stattfand. Aus Abb. 3.13B wird ersichtlich, dass alle Myc-markierten Proteine in ähnlichen Mengen translatiert und präzipitiert wurden. Die Identität der Doppelbande in der EF-1 $\alpha$ -Probe lässt sich nicht eindeutig klären, kann aber durch Proteindegradation im Retikulozytenlysate bedingt sein. In Abb. 3.13C sind die verwendeten, aufgetrennten RNAs zu erkennen. Für dieses Experiment wurden nicht die Vollängen-mRNAs, sondern lediglich das jeweilige Lokalisationselement eingesetzt. Neben bereits in der Literatur beschriebenen *Vg1*-, *Velo1*-, *XNIF*-, *XDead end*-

Lokalisationselementen (Mowry und Melton 1992; Claussen *et al.* 2004; Claussen und Pieler 2004; Horvay *et al.* 2006) wurden auch nicht publizierte Elemente verwendet (*Velo7*, *Velo40*, *Velo76*, S. Koch, unveröffentlichte Daten). *LacZ*-RNA diente als unspezifische RNA-Negativkontrolle. Da alle drei Kandidatenproteine RNA-Bindeproteine sind, wäre eine direkte Interaktion mit den Lokalisationselementen zu erwarten. Doch auch wenn die Proteine nicht direkt an die RNA-Moleküle binden, kann eine indirekte Assoziation innerhalb des Lokalisationskomplexes nicht ausgeschlossen werden.

Aus Abb. 3.13E wird deutlich, dass nur für Vg1RBP und ePAB eindeutige RNA-Bindungen nachgewiesen werden können. FRGY-2B bindet überraschenderweise überhaupt nicht an die RNAs und in den EF-1 $\alpha$ -Präzipitaten sind nur sehr schwache RNA-Banden zu erkennen.

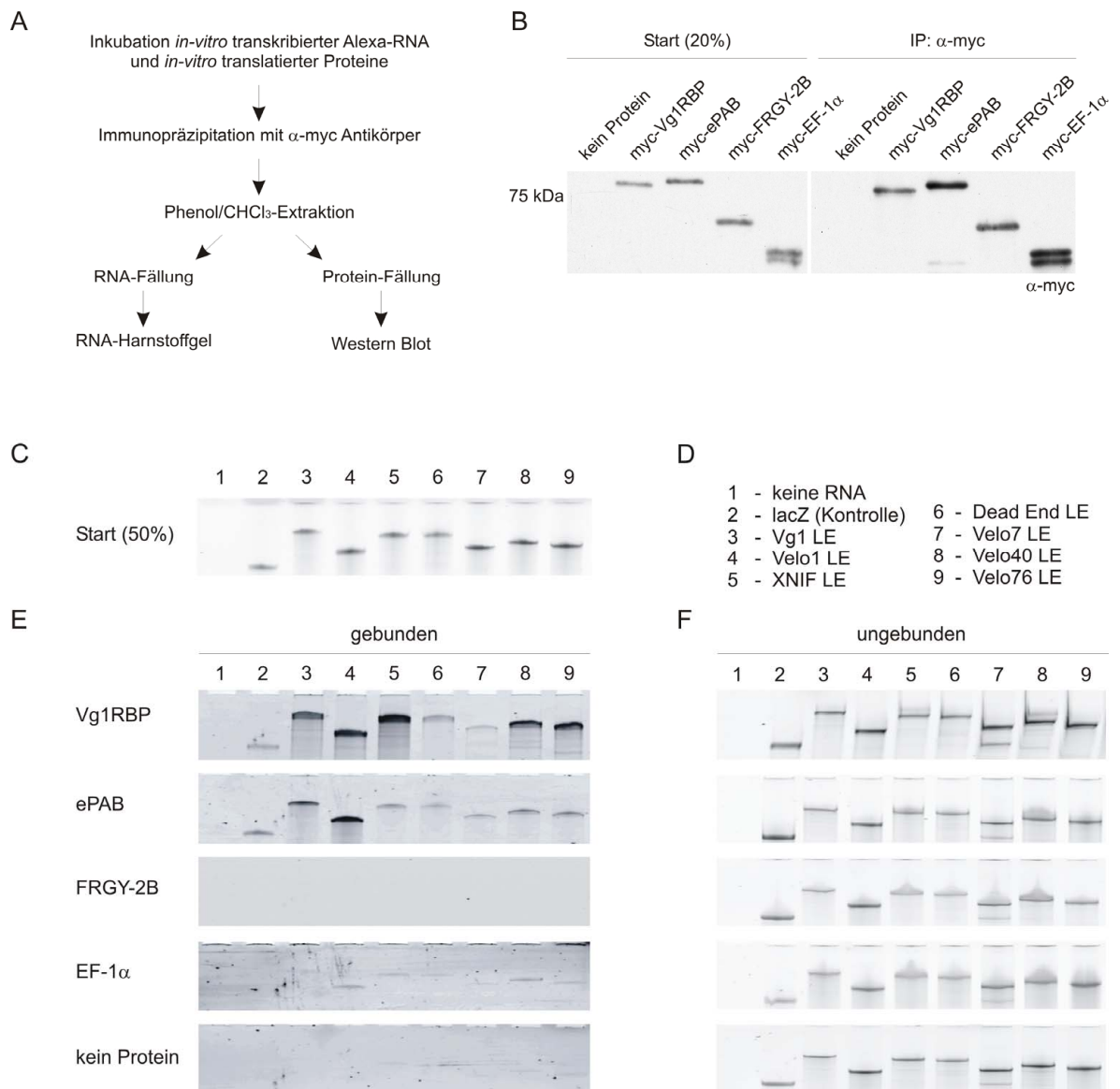
Vg1RBP und ePAB binden beide schwach an die Negativkontrolle *lacZ*. Für Vg1RBP war dieser Sachverhalt auch schon in früheren Studien beschrieben worden (Claussen und Pieler 2004; Horvay *et al.* 2006). Die Bindung von Vg1RBP an die *XDead end* und *Velo7* RNA ist ähnlich schwach bzw. sogar schwächer als an *lacZ*. Jedoch sind für *Vg1*, *Velo1*, *XNIF*, *Velo40* und *Velo76* Bindungen über den *lacZ*-Hintergrund hinaus erkennbar. Die starke Bindung für *XNIF* spiegelt das Ergebnis einer früheren Untersuchung wider, wogegen für die *Vg1* und *Velo1* RNAs eher schwache Bindungen beobachtet worden waren (Claussen *et al.* 2004; Claussen und Pieler 2004).

ePAB bindet an alle eingesetzten RNAs, allerdings werden nur *Vg1* und *Velo1* stärker als die Negativkontrolle *lacZ* gebunden. Hierzu muss erwähnt werden, dass die verwendeten RNA-Moleküle nicht polyadenyliert waren, ePAB also an interne Adeninreiche Bereiche oder an bisher nicht bekannte Bindungsstellen bindet.

FRGY-2B bindet in der Oozyte unspezifisch an mRNA-Moleküle, maskiert und reprimiert sie dadurch translational (Bouvet und Wolffe 1994). In diesem Experiment war allerdings überhaupt keine RNA-Interaktion nachzuweisen, obwohl das Protein zufriedenstellend synthetisiert und immunpräzipitiert worden war (Abb. 3.13B, E). Dies mag darin begründet sein, dass FRGY-2B nur im phosphorylierten Zustand RNA bindet (Kick *et al.* 1987; Braddock *et al.* 1994), im Retikulozytenlysat aber keine spezifische Phosphorylierung stattfand.

Für EF-1 $\alpha$  lassen sich nur sehr schwache Bindungen an die *Velo1* und die *Velo40* RNA nachweisen. Diese sind von ihrer Stärke her mit der Bindung von Vg1RBP an die *lacZ*-Kontroll-RNA zu vergleichen. EF-1 $\alpha$  selbst bindet nicht an *lacZ* (Abb. 3.13E).





**Abb. 3.13: *In-vitro*-Interaktionen zwischen lokalisierten mRNAs und Kandidaten-Proteinen.**

(A) Schema des Versuchsablaufs. (B) *Western Blot* zur Überprüfung der *In-vitro*-Transkriptions- und Translationsreaktion sowie der Immunopräzipitation (IP). Die Proteine wurden im Großansatz hergestellt und für das Experiment aliquotiert. Für die IP-Kontrolle wurden die Proteine der "keine RNA"-IPs aufgetragen. (C, E, F) *In vitro* transkribierte, Alexa-Fluor-546-markierte RNA wurde im Harnstoffgel analysiert. (C, D) Startmaterial der verwendeten Lokalisationselemente. (E) Gebundene RNAs wurden vom jeweiligen Immunopellet durch Zugabe von 1% SDS eluiert, extrahiert, präzipitiert, im denaturierenden Harnstoff-Gel aufgetrennt und im Fluoreszenz-Scanner analysiert. (F) Ungebundene RNAs wurden aus dem Überstand durch Extraktion und Fällung isoliert und wie die gebundenen RNAs analysiert.



Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit diesem Experiment für Vg1RBP und ePAB direkte RNA-Protein-Interaktionen mit lokalisierten RNAs gezeigt werden konnten, für FRGY-2B dagegen nicht und bei EF-1 $\alpha$  ist nicht klar, ob die schwachen Signale wirklich spezifische Interaktionen widerspiegeln.

*In-vitro*-Experimente geben hilfreiche Informationen, allerdings spiegeln sie die tatsächlichen Gegebenheiten in der Zelle nicht vollständig wider. Ob die Kandidatenproteine in der Oozyte spezifisch an lokalisierte RNAs binden, kann nur durch ein *in-vivo*-Experiment festgestellt werden. Zu diesem Zweck wurden die Myc-markierten Proteine durch mRNA-Mikroinjektion in Stadium III-IV Oozyten exprimiert, immunopräzipitiert und die RNA aus den Immunopellets wie oben beschrieben extrahiert. Anschließend wurden gebundene RNAs mittels RT-PCR nachgewiesen. Sowohl die Proteinexpression und als auch die Effizienz der Immunopräzipitation wurden mittels *Western Blot* überprüft. Als Beispiele für lokalisierte RNAs wurden *Vg1*, *VegT*, *XDead end (DE)*, *Velo1*, *XNIF* und *Dazl* verwendet, als nicht lokalisierte Negativkontrollen dienten Ornithin-Decarboxylase (*ODC*), Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*), sowie Histon *H4*. Um die unspezifische Bindung von RNA-Molekülen an Antikörper oder Sepharose ausschließen zu können, wurde parallel ein Ansatz mit Lysat von nicht injizierten Oozyten mitgeführt (Abb. 3.14B, C).

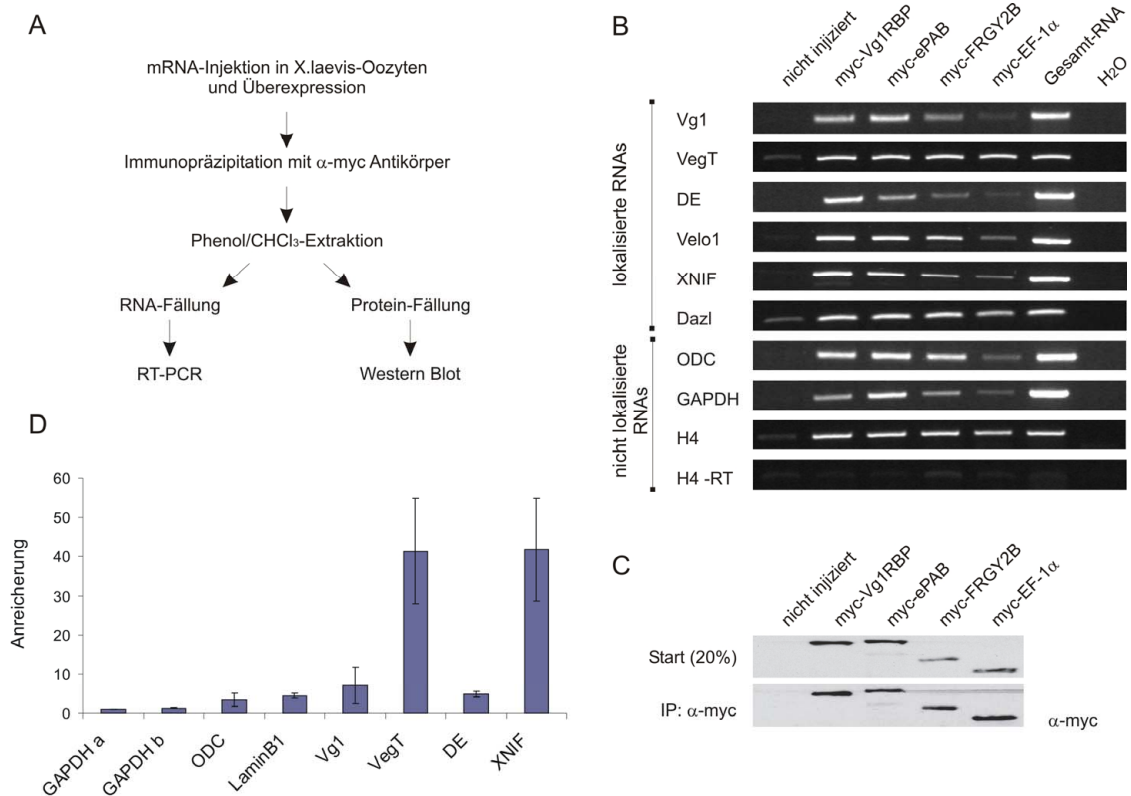
Zunächst fällt auf, dass Vg1RBP nicht exklusiv an lokalisierende mRNAs bindet, sondern ebenso an alle untersuchten nicht-lokalisierenden Transkripte (Abb. 3.14B). Dies war auch schon im *in-vitro*-Experiment beobachtet worden. Jedoch kommt die dort als Negativkontrolle verwendete *lacZ*-RNA natürlicherweise nicht in *Xenopus* Oozyten vor. Aufgrund dieser sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachteten unspezifischen Bindungen kann Vg1RBP hier nicht als Positivkontrolle betrachtet werden. Auch die anderen untersuchten Proteine binden sowohl an lokalisierende als auch an nicht-lokalisierende mRNAs. Es ist jedoch mit diesem Experiment sehr schwierig, quantitative Aussagen zu treffen, da zum einen die Expression der verschiedenen Myc-Fusionsproteine variiert, zum anderen die Bandenintensität keine genaue Einschätzung der gebundenen RNA-Menge erlaubt. Es kann also nur der Schluß gezogen werden, dass für die untersuchten Proteine offensichtlich keine Bindungsspezifität im Hinblick auf lokalisierte RNA-Moleküle vorliegt, sondern alle untersuchten RNAs ko-immunopräzipitiert werden können.

Um eine Anreicherung der RNA-Moleküle im Immunopräzipitat genau zu quantifizieren, ist es notwendig, eine *Real-Time*-PCR durchzuführen. ePAB und FRGY-2B sind bereits bekannt dafür, mRNAs zu binden. FRGY-2B scheint dabei als genereller translationaler Repressor zu fungieren, während ePAB Adenin-reiche

Regionen bindet und die Translation aktiviert (Bouvet und Wolffe 1994; Voeltz *et al.* 2001; Wilkie *et al.* 2005).

Interessanter ist dagegen EF-1 $\alpha$ , da für dieses Protein bisher zwar für seine Interaktionen mit tRNA und rRNA bekannt ist, nicht aber für die Bindung an mRNA-Moleküle. Aus diesem Grund wurde die Quantifizierung gebundener RNAs zunächst für EF-1 $\alpha$  durchgeführt. Myc-EF-1 $\alpha$  wurde dafür in Stadium III – IV Oozyten exprimiert, S16 Lysat angefertigt und eine Immunopräzipitation mit dem anti-Myc-Antikörper durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde dasselbe Lysat nur mit Protein-G-Sepharose, aber ohne Antikörper inkubiert. Die Proteinexpression und die Präzipitationseffizienz wurden im *Western Blot* überprüft (nicht gezeigt). Die gebundene RNA wurde extrahiert und in cDNA umgeschrieben, welche dann in der quantitativen PCR eingesetzt wurde.

In Abb. 3.14D ist zu erkennen, dass EF-1 $\alpha$  tatsächlich bevorzugt an bestimmte lokalisierende RNAs bindet. *VegT* und *XNIF* sind im Vergleich zu GAPDH 40-fach im Immunopräzipitat angereichert, nicht aber an die nichtlokalisierenden RNAs *GAPDH*, *ODC* und *Lamin B1*. Interessanterweise werden auch die beiden RNAs *Vg1* und *XDead end* nicht angereichert, obwohl auch diese in der *Xenopus* Oozyte vegetativ lokalisieren. Da *VegT* und *XNIF* über unterschiedliche Transportwege lokalisiert werden (Zhang und King 1996; Claussen *et al.* 2004), kann keine Korrelation zwischen dem Lokalisierungsmechanismus und der Bindung an EF-1 $\alpha$  hergestellt werden.



**Abb. 3.14: RNA-Protein-Interaktionen in der Oozyte.**

(A) Schematischer Versuchsablauf. Myc-markierte Proteine wurden in Stadium III-IV Oozyten exprimiert und mit anti-Myc-Antikörper immunopräzipitiert. Gebundene RNAs wurden durch Zugabe von 1% SDS vom Immunopellet eluiert und aufgereinigt. (B) RT-PCR-Analyse der gebundenen RNAs. Extrakt von nicht injizierten Oozyten dient als Negativkontrolle für die IP. Als Positivkontrolle für die RT-PCR wurde Gesamt-RNA eingesetzt, als Negativkontrolle wurde H<sub>2</sub>O verwendet. Mit Hilfe der Histon H4 PCR ohne RT-Schritt (H4 – RT) wurde die Anwesenheit von genomischer DNA in den Proben überprüft. (C) *Western Blot* zur Analyse der Proteinexpression (Start) und der Immunopräzipitation (IP). Die Proteine wurden mit dem anti-Myc-Antikörper detektiert. (D) Myc-EF-1 $\alpha$  wurde in Oozyten exprimiert und mit anti-Myc bzw. Sepharose ohne Antikörper immunopräzipitiert. Die *Real-Time*-PCR und die Quantifizierung wurden wie in Kapitel 2.2.2.10. beschrieben durchgeführt. Die Anreicherungsfaktoren wurden auf den Faktor von GAPDH normalisiert, der gleich 1 gesetzt wurde. Als Kontrolle für die Reproduzierbarkeit der PCR wurde die Reaktion für GAPDH zwei Mal durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten, für die die Oozyten verschiedener Frösche injiziert wurden.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass mit EF-1 $\alpha$  ein neuer Vg1RBP-Interaktionspartner identifiziert wurde, der mit verschiedenen anderen RNA-Transportfaktoren assoziiert, einige lokalisierte RNAs bevorzugt anreichert und deshalb möglicherweise eine Rolle im Transport oder der Verankerung lokalisierender RNAs in der *Xenopus* Oozyte spielt.

### 3.2. Funktionsanalyse vegetal lokalisierter RNAs

Dieser Teil der Arbeit widmet sich der Analyse der Funktion vegetativ lokalisierter RNAs. Die intrazelluläre Verteilung von Transkripten ist ein wichtiger posttranskriptionaler Mechanismus zur Bewerkstelligung asymmetrischer Proteinexpression, den sich verschiedenste Organismen und Zelltypen zunutze machen. Eine besondere Rolle spielt der RNA-Transport in der frühen Embryonalentwicklung, u.a. bei *Drosophila melanogaster* und *Xenopus laevis*. Die kontrollierte Verteilung von RNA-Molekülen in der Oozyte ist eine wichtige Voraussetzung für die Ausbildung essentieller Proteingradienten im frühen Embryo.

In einer früheren Arbeit sind in einem *Microarray*-Experiment eine Vielzahl bisher unbekannter, in *Xenopus laevis* Oozyten vegetativ lokalisierender RNA-Moleküle identifiziert worden (Horvay 2005). Die bisher annotierten Gene ließen sich in keine einheitliche funktionelle Gruppe einordnen. Auch ihre Rolle in der frühen Embryogenese liegt bisher im Dunklen. Um Licht auf die Funktionen einiger dieser Gene während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* zu werfen, sollten zunächst durch Herunterregulierung der Proteinexpression und durch Über- bzw. Miss-Expressionsexperimente über daraus resultierende phänotypische Veränderungen potentiell interessante Kandidaten für eine detailliertere funktionelle Analyse identifiziert werden.

Für diese Experimente wurden Gene ausgewählt, deren mRNA-Sequenz in voller Länge bekannt war, so dass eine Amplifikation aus Oozyten-cDNA bzw. der Erwerb des Klon aus einer kommerziellen Gensammlung möglich war. Die ausgesuchten Gene, ihr nächstes Homolog und die jeweilige Bezugsquelle sind in Tabelle 3.5 aufgelistet. Da für Velo 22 keine Übereinstimmung mit Sequenzen aus der Datenbank gefunden werden konnte, wurde mit Hilfe der von K. Horvay identifizierten Sequenz ein passender Primer entworfen, mit dem aus einer Oozyten-spezifischen cDNA-Bank (Claussen und Pieler 2004) ein neues DNA-Fragment durch PCR amplifiziert werden konnte. Auf diese Weise wurde die bisher bekannte Sequenz in 5'-Richtung verlängert und schließlich ein entsprechendes Gen in der Datenbank identifiziert.

Velo Nr.	Annotation	Homologie	Bezugsquelle
7	BC077484 Phosphoglycerat-Mutase	99% über 784 bp	RZPD (IRAKp961H09151Q)
8	BC110943 Acyl-CoA-Synthetase	96% über 602 bp	RZPD (IRAKp961H09151Q)
14	BC094158 DRAK, S/T-Kinase 17a	99% über 811 bp	amplifiziert von J. Löber
18	BC070812 N-WASP	92% über 664 bp	RZPD (IRAKp961M09161Q)
22	BC070758 Rab11-interagierendes Protein 5	99% über 542 bp <sup>1</sup>	RZPD (IRAKp961G18158Q)
39	BC042304 Elov1	97% über 802 bp	RZPD (IRAKp961I0194Q)
40	BC075557 (X.trop.) Polo-Kinase 3	66% über 743	amplifiziert von Dr. S. Koch
76	BC076780 Spire2-ähnliches Protein	95% über 631 bp	amplifiziert von Dr. S. Koch

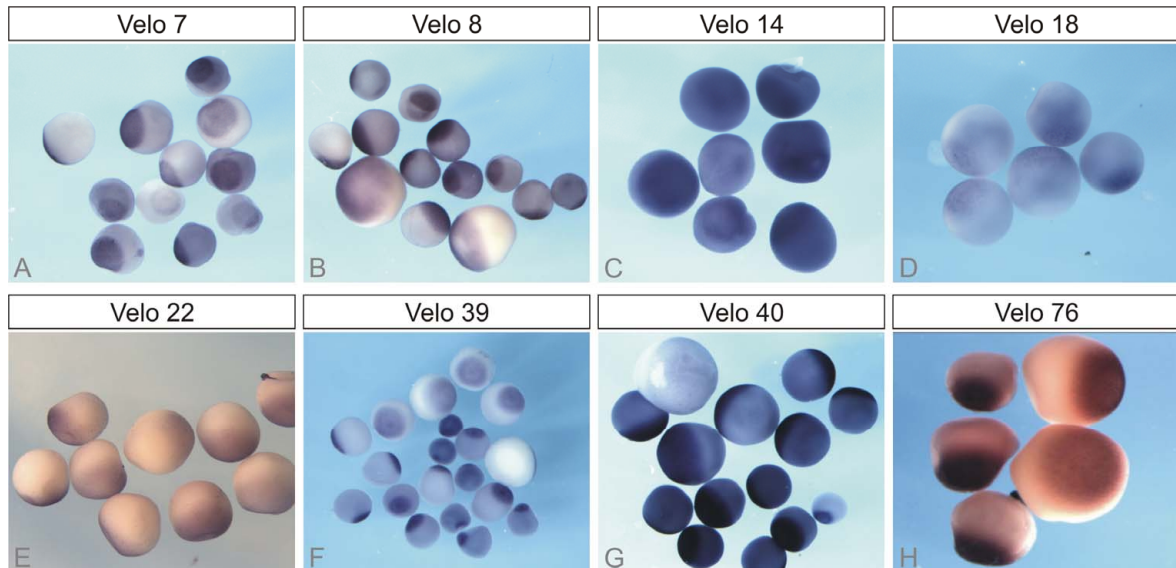
**Tab. 3.5: Zusammenfassung der von K. Horvay neu identifizierten, vegetal lokalisierten Klone, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.**

Unter Annotation sind die Namen und die GenBank-Zugangsnummern der Gene aufgelistet, zu denen die größte Ähnlichkeit mit den im Mikroarray-Experiment identifizierten Klonen gefunden werden konnte. In der Spalte „Homologie“ ist die Anzahl der jeweils identischen Basenpaare in Prozent angegeben. Die Vollängen-cDNA dieser Gene oder ihrer *Xenopus laevis*-Homologe wurde kommerziell erworben oder aus *Xenopus laevis* Oozyten-Gesamt-cDNA amplifiziert und kloniert.

<sup>1</sup> Die Homologie für Velo22 bezieht sich auf das neu amplifizierte Fragment, das mit Hilfe der verfügbaren Sequenzinformationen gewonnen wurde.

Zunächst wurde in einer *Whole Mount In Situ* Hybridisierung nochmals die vegetale Lokalisierung der RNAs überprüft. Zur Herstellung der hierfür verwendeten Sonden wurden die kodierenden Sequenzen der Klone von den neu amplifizierten bzw. kommerziell erworbenen cDNAs in *antisense* Richtung transkribiert. Die Hybridisierung wurden in Oozyten der Stadien II – IV durchgeführt. Obwohl die Signalintensität zwischen den einzelnen Klonen stark variiert, konnte die vegetale RNA-Lokalisation für alle überprüften RNAs bestätigt werden. (Abb. 3.15). Die charakteristische scharfe Signalgrenze ist besonders gut bei *Velo7*, *8*, *39* und *40* zu erkennen. Bei *Velo22* und

*Velo76* ist diese Grenze verschwommen. Bei *Velo14* und *18* ist die Lokalisierung nur undeutlich zu erkennen, da die *Velo14* Oozyten überfärbt wurden, und das Signal für *Velo18* dagegen nur sehr schwach ist. *Velo39* und *40* werden über den intermediären Weg, die anderen RNAs über den späten Transportweg lokalisiert.



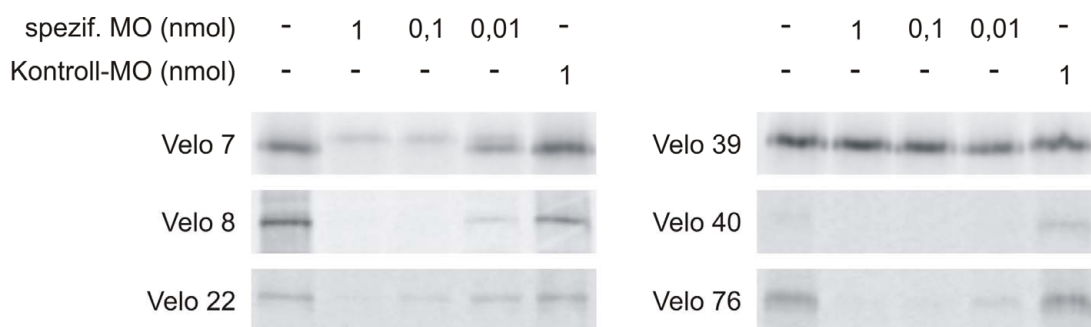
**Abb. 3.15: Vegetale mRNA-Lokalisierung der zu untersuchenden Gene.**

Die Lokalisierung der zu analysierenden RNAs in Stadium III - IV Oozyten wurde mittels *Whole Mount In Situ* Hybridisierung nachgewiesen. Als Sonden wurde *in vitro* synthetisierte, Digoxigenin-markierte RNA verwendet, die durch *antisense*-Transkription der jeweiligen kodierenden Sequenzen hergestellt wurden. (H) wurde von S. Koch übernommen (unveröffentlichte Daten).

### 3.2.1. Untersuchung der Proteinfunktion durch Herunterregulierung der Expression

Die spezifische Herunterregulierung der Proteinexpression kann wichtige Auskünfte über die Rolle dieser Proteine innerhalb bestimmter biologischer Prozesse geben. Es wurden verschiedenste Strategien entwickelt, um die Translation spezifischer RNAs zu inhibieren. Im *Xenopus* Embryo gelingt dies effektiv bisher nur durch die Injektion von *antisense*-Morpholino-Oligonukleotiden. Diese artifiziellen Oligonukleotide lagern sich an die mRNA an und verhindern so korrektes Spleißen bzw. die Translationsinitiierung (Partridge *et al.* 1996). Durch die Injektion von spezifischen Morpholino-Oligonukleotiden in die vegetativen Blastomerenpole früher Embryonen sollte versucht werden, die Expression der vegetal lokalisierten mRNAs zu inhibieren und den Effekt des Funktionsverlustes zu analysieren.

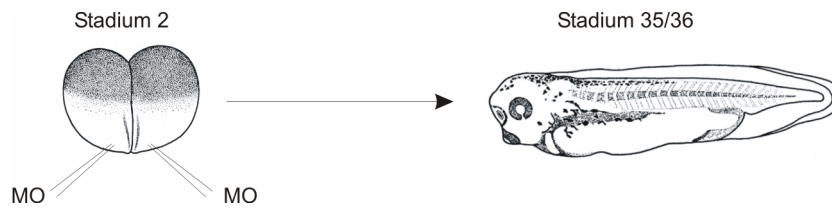
In einem Vorexperiment wurde zunächst *in vitro* die Wirksamkeit der Morpholinos überprüft. Dazu wurden die Proteine im Retikulozytenlysat in Gegenwart verschiedener Mengen des jeweils spezifischen Morpholino-Oligonukleotids bzw. eines Kontroll-Morpholinos translatiert. Aus Abb. 3.16 wird ersichtlich, dass die Morpholinos gegen die Klone *Velo8*, *22* und *76* die Translation effizient und konzentrationsabhängig inhibieren, während bei *Velo7* nicht eindeutig erkennbar ist, inwieweit die Proteinsynthese durch den Morpholino blockiert wird. In Anwesenheit von 1 bzw. 0,1 nmol des Morpholinos ist eine Änderung des Migrationsverhaltens der Protein-Banden zu beobachten, so dass unklar ist, ob es sich hier tatsächlich um *Velo7* Protein handelt. Der Morpholino gegen *Velo39* scheint die Translation *in vitro* nicht zu inhibieren. Auch bei *Velo40* ist nicht eindeutig erkennbar, inwieweit der Morpholino die Translation blockiert, da *Velo40* auch in Abwesenheit des Morpholinos nur sehr schwach synthetisiert wurde.



**Abb. 3.16: *In vitro* Test zur Überprüfung der Funktionalität der Morpholino-Oligonukleotide.**

In einer *in vitro* Translationsreaktion wurden die entsprechenden Velo-Proteine in Anwesenheit des spezifischen Morpholino-Oligonukleotids (MO) oder eines unspezifischen Kontroll-Morpholinos synthetisiert und mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin radioaktiv markiert. Die Proteine wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch detektiert.

Die Morpholino-Oligonukleotide gegen Velo mRNAs bzw. ein Kontroll-Morpholino gegen humane  $\beta$ -globin mRNA wurden anschließend in verschiedenen Konzentrationen in die vegetalen Pole beider Blastomere von Zweizell-Embryonen injiziert (Tab. 3.6). Die Embryonen wurden, wenn möglich, bis zum Schwanzknospenstadium (Stadium 35/36) kultiviert, fixiert und ihre Phänotypen ausgewertet (Abb. 3.17). Die Ergebnisse sind in Abb. 3.18 und in Tabelle 3.6 zusammenfassend dargestellt.



**Abb. 3.17: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes zu Herunterregulierung der Proteinexpression.**

Spezifische bzw. unspezifische (Negativkontrolle) Morpholino-Oligonukleotide wurden in die vegetativen Hälften der Blastomeren von Zweizell-Embryonen injiziert und diese bis zum dargestellten Schwanzknospen-Stadium kultiviert. Die Auswertung wurde aufgrund des Phänotyps der behandelten Embryonen durchgeführt.

Es zeigte sich, dass die Injektion der Morpholinos gegen *Velo7* und *Velo40* keinen Effekt auf die Entwicklung der Embryonen hatte. Es waren keine Unterschiede zu den Kontrollmorpholino-injizierten Embryonen zu erkennen (Abb. 3.18A, D, H, K). Allerdings ist nicht klar, ob die Morpholinos tatsächlich die Proteinsynthese inhibieren. Im *in vitro* Test bewirkte die Zugabe des Morpholinos 7 zur Reaktionsmischung zwar eine leichte Abnahme der Signalintensität, zusätzlich ist jedoch auch eine Veränderung im Migrationsverhalten des *Velo7* Proteins zu erkennen, die nicht erklärt werden kann (Abb. 3.16). Auch für *Velo40* konnte im *in-vitro*-Test die Funktionalität des Morpholinos nicht eindeutig bestätigt werden, da das Protein bereits ohne Morpholino nur in sehr geringer Menge synthetisiert wurde (Abb. 3.16). In Anwesenheit des Kontroll-Morpholinos ist jedoch ein Proteinprodukt zu erkennen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass der spezifische *Velo40* Morpholino wahrscheinlich doch wirksam ist.

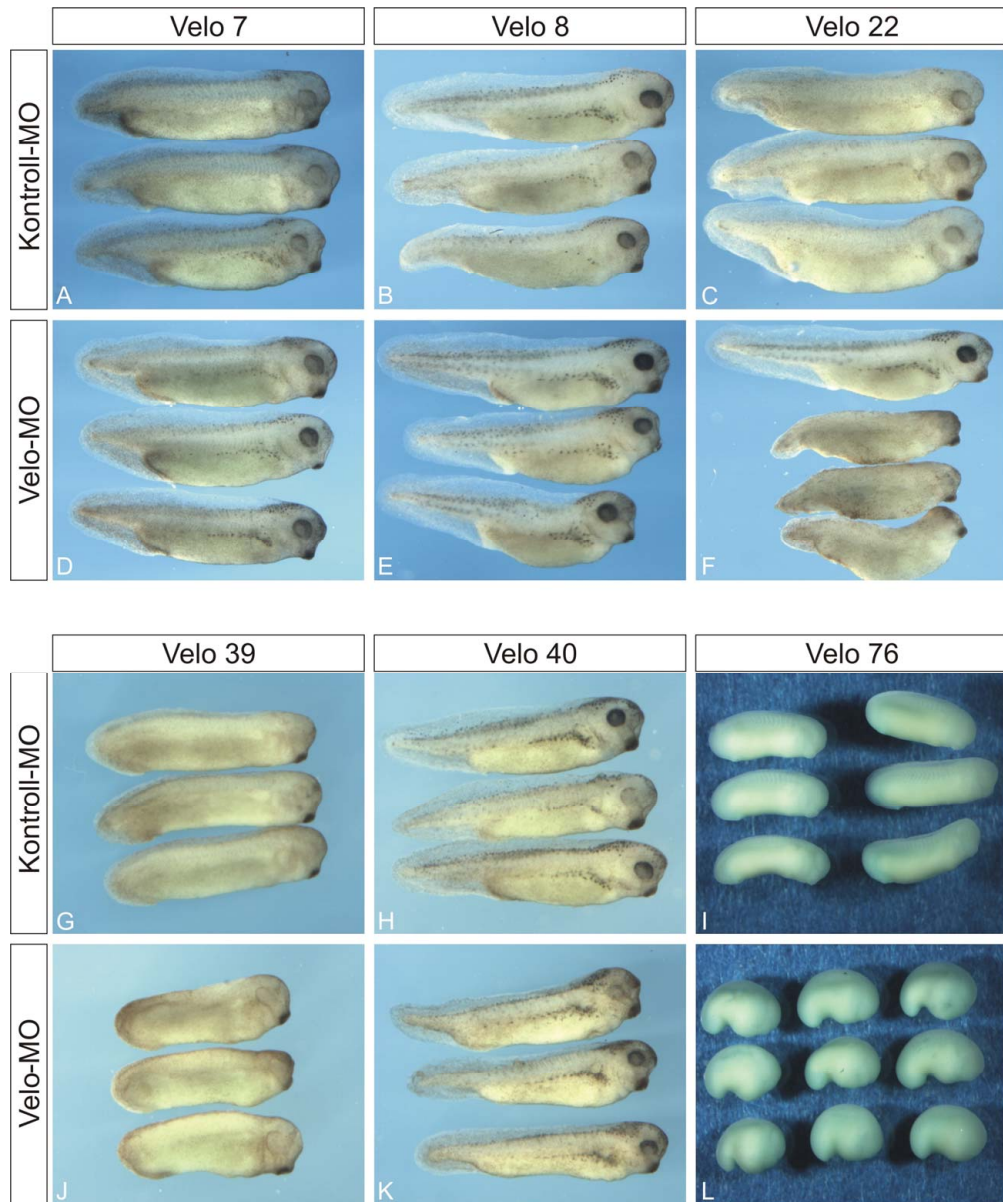
Der Morpholino gegen *Velo8* wirkte während der Gastrulation toxisch und führte zum Tod eines Großteils der injizierten Embryonen. Die überlebenden Embryonen zeigten aber im Stadium 35 einen normalen Phänotyp (Abb. 3.18B, E). Da der Morpholino die Translation *in vitro* effizient inhibierte, kann die Toxizität auf einen Verlust des Proteins *Velo8* zurückzuführen sein. Dies muss durch ein Rettungsexperiment, d.h. durch die Ko-Injektion einer Morpholino-insensitiven *Velo8* mRNA überprüft werden.

Auch der Morpholino gegen *Velo76* zeigte einen stark toxischen Effekt. Der Großteil der injizierten Embryonen starb vor dem Abschluß der Neurulation. Die Embryonen, die bis nach der Neurulation überlebten, entwickelten sich bedeutend langsamer als die Kontroll-Embryonen und zeigten eine deformierte, verkürzte Erscheinung (Abb. 3.18I, L). Da auch dieser Morpholino *in vitro* sehr wirksam war, kann davon ausgegangen werden, dass die Veränderungen im Zusammenhang mit



dem Verlust des Proteins stehen. Auch hier wird ein Rettungsexperiment Aufschluss geben.

Auch nach der Injektion der Morpholinos gegen *Velo22* und *Velo39* ist eine deutliche Verkürzung der anterior-posterioren Achse zu beobachten (Abb. 3.18C, F, G, J). Der Morpholino 22 wirkte zunächst sehr toxisch, d.h. ungefähr die Hälfte der injizierten Embryonen starb noch vor oder während der Gastrulation. Bei einem Teil der überlebenden Embryonen führte die Herunterregulierung von *Velo22* zum Verlust der Pigmentierung und zu einer Verkleinerung der Kopf-Strukturen, insbesondere der Augen. Die Zementdrüse ist dagegen noch gut ausgebildet (Abb. 3.18C, F). Auch dieser Morpholino inhibierte die Proteinsynthese *in vitro* konzentrationsabhängig, wenn auch nicht so effektiv wie der Morpholino gegen *Velo8*. Möglicherweise hätte eine Translationsinhibition einen noch dramatischeren Phänotyp zur Folge. Der Effekt ist nach Injektion des Morpholinos gegen *Velo39* weniger deutlich und kann auch auf eine lediglich verlangsamte Entwicklung der Embryonen zurückzuführen sein. Hier sind die Kopf-Strukturen vollständig entwickelt (Abb. 3.18G, J).



**Abb. 3.18: Funktionsanalyse vegetal lokalisierter mRNAs durch Herunterregulierung der Proteintranslation.**

5 pmol *antisense* Morpholino (MO) wurden in Zweizell-Embryonen jeweils in die vegetale Hälfte beider Blastomere injiziert. Die Embryonen wurden, falls möglich, bis zum Erreichen des Schwanzknospen-Stadiums (St. 30-35) inkubiert und auf ihren Phänotyp hin untersucht. Für jeden spezifischen Morpholino wurde die gleiche Menge unspezifischen Kontroll-Morpholinos auf die gleiche Weise in Embryonen desselben Geleges injiziert (A, B, C, G, H, I). (D) Velo 7 MO, (E) Velo 8 MO, (F) Velo 22 MO, (J) Velo 39 MO, (K) Velo 40 MO, (L) Velo 76 MO.

Velo Nr.	MO-Menge	Phänotyp	veränderte Embryonen / Gesamtanzahl
7	5 pmol/Zelle	normal	122/123
8	5 pmol/Zelle	† vor der Gastrulation normal	64/99 23/23
22	5 pmol/Zelle	† vor der Gastrulation verkürzte Körperachse	84/160 18/41
39	5 pmol/Zelle	verkürzte Körperachse	21/49
40	5 pmol/Zelle	normal	43/45
76	2,5 pmol/Zelle	verkürzte Körperachse	16/16

**Tab. 3.6: Ergebnisse der Morpholino-Mikroinjektionsexperimente.**

Die angegebene Morpholino-Menge wurde jeweils in beide Blastomeren der Zweizellern injiziert. Die Phänotypen wurden in folgenden Stadien analysiert: Velo 7: St. 34, Velo 8: St. 35, Velo 22: St. 35, Velo 39: St. 30, Velo 40: St. 35, Velo 76: St. 25. † = tot.

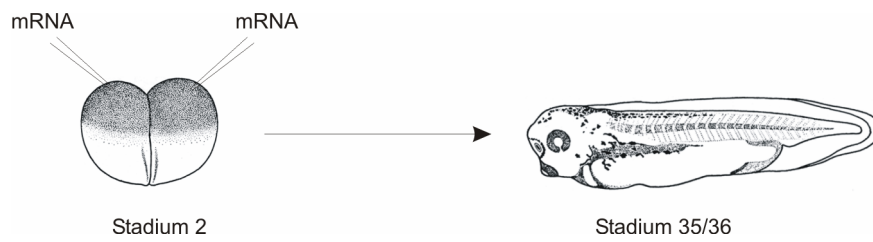
### 3.2.2. Analyse der Genfunktion durch Delokalisation bzw. Überexpression

Die vegetative Lokalisation der mRNA-Moleküle lässt vermuten, dass die räumliche Verteilung ihrer Proteinprodukte für die korrekte Ausübung ihrer Funktion essentiell ist. Eine Störung dieser Asymmetrie, z.B. durch Mikroinjektion von mRNA in die animale Hemisphäre des frühen Embryos, sollte in diesem Fall die Proteinfunktion stark beeinträchtigen, und sich im besten Fall im Phänotyp des Embryos manifestieren.

Um dies zu überprüfen, wurden die kodierenden Sequenzen der zu untersuchenden Gene *in vitro* transkribiert und anschließend jeweils 500 pg der mRNAs in beide Blastomere in Embryonen des Zweizellstadiums animal injiziert. Um eventuelle Effekte durch die Manipulation selbst ausschließen zu können, wurde dieselbe Menge für  $\beta$ -Galaktosidase kodierende mRNA in Kontrollembryonen injiziert. Die Embryonen wurden, wenn möglich, bis zum Erreichen des Stadiums 35/36 kultiviert und fixiert (Abb. 3.19).

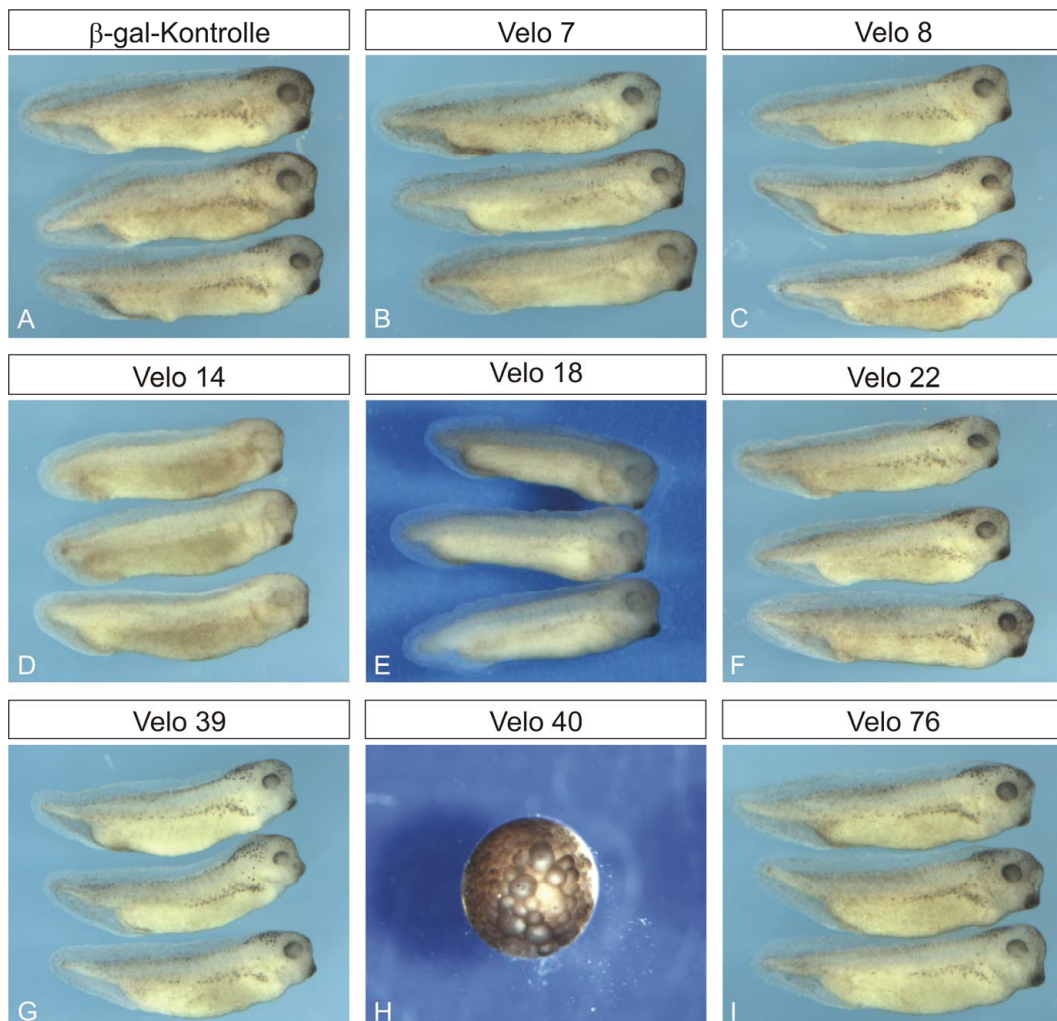
Abb. 3.20 zeigt, dass die Missexpression der Klone *Velo7, 8, 14, 18, 22, 39* und *76* keine Änderung des Phänotyps im Vergleich zu den Kontrollembryonen zur Folge hat.

Die Über- und Missexpression von *Velo40* bewirkte dagegen in allen Embryonen ein abnormales Auftreten vergrößerter Zellen während der Blastula- und frühen Gastrula-Stadien, was schließlich den Tod der Embryonen während der Gastrulation zur Folge hatte (Abb. 3.20H).



**Abb. 3.19: Schematische Darstellung der Über-/Missexpression vegetal lokalisierter mRNAs.**

*In vitro* transkribierte mRNA wurde in beide Blastomere eines Embryos im Zweizell-Stadium animal injiziert und damit die asymmetrische Verteilung der RNA aufgehoben. Die Embryonen wurden bis zum Schwanzknospen-Stadium kultiviert und die morphologischen Veränderungen anschließend ausgewertet.



**Abb. 3.20: Funktionsanalyse vegetal lokalisierter mRNAs durch Miss- bzw. Überexpression.**

500 pg mRNA pro Blastomer wurde in Zweizell-Embryonen in die animale Hälfte beider Blastomere injiziert. Die Embryonen wurden, falls möglich, bis zum Erreichen des Schwanzknospen-Stadiums (St. 33-34) kultiviert, fixiert und auf ihren Phänotyp hin untersucht. Als Negativkontrolle wurde  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -gal)-mRNA auf die gleiche Weise injiziert (A).

**3.2.3. Zusammenfassung der funktionellen Übersichtsanalyse**

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass mehrere interessante Hinweise auf mögliche Funktionen der untersuchten Klone gewonnen wurden (Tab. 3.7). Zwar hatte die Überexpression der meisten Klone im animalen Pol keine morphologischen Veränderungen zur Folge, aber die Herunterregulation der Proteinexpression einiger *Velo* Klone zeigte Auswirkungen auf die embryonale Entwicklung der behandelten Embryonen. Die Miss- und Überexpression von *Velo40* lieferte einen besonders interessanten Phänotyp, der wahrscheinlich auf einem Zellteilungsdefekt beruht. Deshalb soll im Weiteren auf diesen Klon genauer eingegangen werden.

Velo	<i>in vitro</i> MO Test	MO Injektion	Miss/Überexpression	maternale Expression
7	nicht eindeutig	kein Effekt	kein Effekt	ja <sup>1</sup>
8	effektive Inhibition	toxisch	kein Effekt	n.a.
14	n.a.	n.a.	kein Effekt	n.a.
18	n.a.	n.a.	kein Effekt	n.a.
22	effektive Inhibition	verkürzte Körperachse, Verlust der Kopfstrukturen	kein Effekt	n.a.
39	keine Inhibition	verkürzte Körperachse	kein Effekt	n.a.
40	nicht eindeutig	kein Effekt	Zellteilungsdefekt	ja <sup>2</sup>
76	effektive Inhibition	toxisch, verkürzte Körperachse	kein Effekt	n.a.

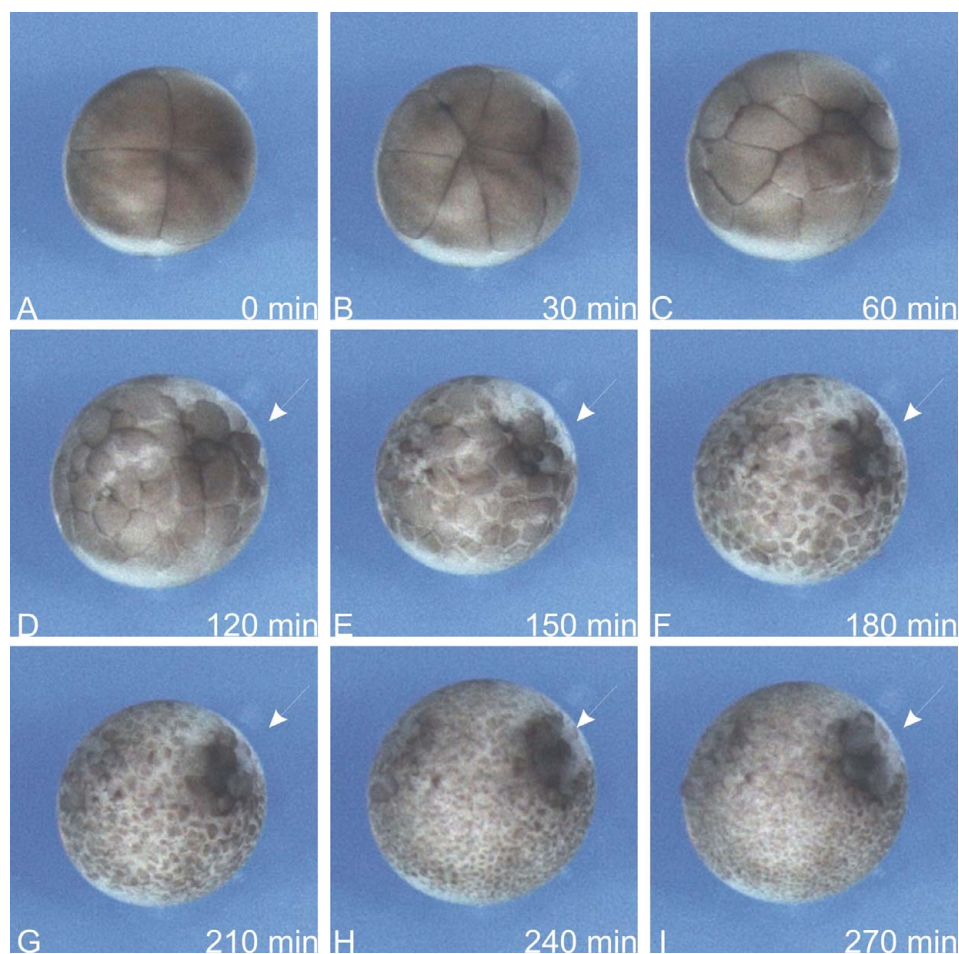
**Tab. 3.7: Zusammenfassende Darstellung des funktionellen Screens.**

Aufgelistet sind die Ergebnisse der funktionellen Experimente (Abb. 3.16, Abb. 3.18 und Abb. 3.20). n.a. – nicht analysiert, <sup>1</sup> M. Claussen, unveröffentlichte Daten, <sup>2</sup> Duncan *et al.* 2001.



### 3.2.4. Weiterführende Untersuchungen des Klons Velo 40

Da die Manipulation der Expression von Velo 40 in den oben beschriebenen Experimenten die auffälligsten Veränderungen während der Embryogenese bewirkte, wurde dieser Klon für weiterführende Experimente ausgewählt. Zunächst sollte festgestellt werden, ob die vergrößerten Zellen, die bei Überexpression zu beobachten sind, tatsächlich von einer Inhibierung des Zellzyklus herrühren. Dazu wurde Embryonen, die mit *Velo40* mRNA injiziert wurden, über mehrere Stunden beobachtet. In Abb. 3.21 ist zu erkennen, dass einige Zellen ab Stadium 6 ihre Zellteilung einstellen. *Velo40* ist also tatsächlich ein Zellzyklus-Inhibitor.



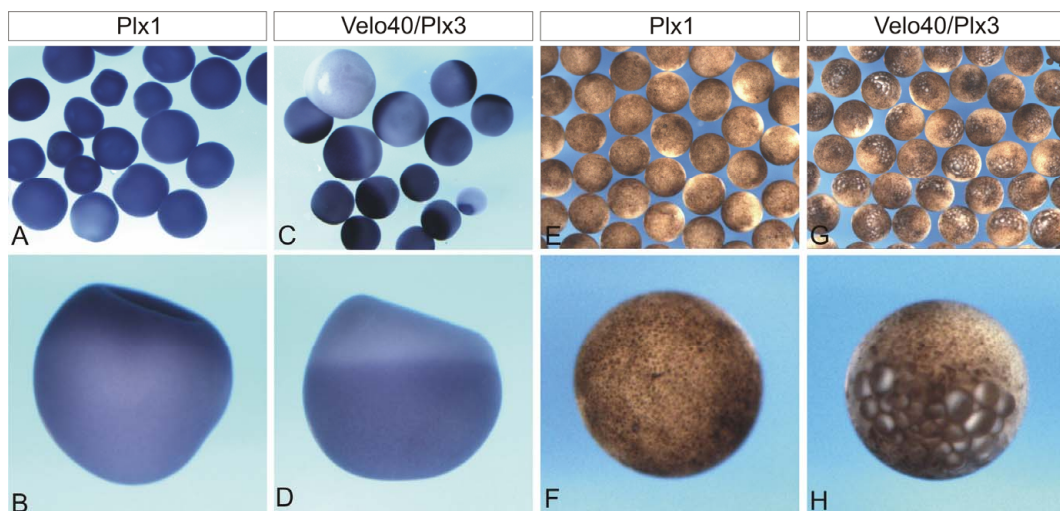
**Abb. 3.21: Miss-/Überexpression von *Velo40* bewirkt eine Inhibition der Zellteilung im Blastula-Embryo.**

500 pg *Velo40* mRNA/Blastomer wurden animal in beide Zellen eines Zweizellembryos injiziert. Der Embryo wurde bis zum späten Blastula-Stadium kultiviert und währenddessen im aller 30 min fotografiert. Der Pfeil weist auf die Zellen mit Teilungsdefekt.

*Velo40* kodiert für *Xenopus laevis* Polo-Kinase 3 (Plx3). Den Mitgliedern der Polo-Kinase-Familie wird eine bedeutende Rolle in der Regulation des Zellzyklus (Nigg 1998; Duncan *et al.* 2001) zugeschrieben.

Die Familie der Polo-Kinasen besteht in *Xenopus* aus mindestens 4 Mitgliedern, die sich in ihrer Domänen-Struktur und wahrscheinlich auch in ihrer Funktion stark ähneln. Die Polo-Kinasen 1 bis 3 werden in *Xenopus laevis* maternal transkribiert (Duncan *et al.* 2001). Es sollte daher geklärt werden, ob die vegetale Lokalisierung der maternalen mRNA eine allgemeine Eigenschaft der Polo-Kinase-Familie ist, oder ob sich speziell Plx3 dadurch auszeichnet. Die cDNA wurde von Plx1 kloniert und in eine markierte *antisense* RNA-Sonde umgeschrieben. Die damit durchgeführte *Whole Mount In Situ* Hybridisierung zeigt, dass *Plx1*-mRNA im Gegensatz zu *Plx3* nicht lokalisiert vorliegt, sondern gleichmäßig in der gesamten Oozyte verteilt ist (Abb. 3.22). Die Lokalisation von *Plx2* ließ sich nicht überprüfen, da die Amplifikation ihrer cDNA nicht gelang.

Desweiteren wurde untersucht, ob die Überexpression von Plx1 und Plx3 ähnliche oder verschiedene Effekte verursacht. In Abb. 3.22E – H wird deutlich, dass Plx1 keine Zellteilungsdefekte wie Plx3 hervorruft. Jedoch waren bei den Embryonen, in denen Plx1 überexprimiert wurde, starke Gastrulationsdefekte zu beobachten (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.22: *Velo40/Plx3* unterscheidet sich in der RNA-Lokalisation und funktionell von *Plx1*.**

(A – D) *Whole Mount In Situ* Hybridisierung von *Plx1* und *Plx3* in Stadium III – IV Oozyten. Für die Transkription der antisense-Sonden wurden jeweils die kodierenden Sequenzen als Matrize verwendet. (A, B) *antisense-Plx1*-hybridisierte Oozyten, (C, D) *antisense-Velo40/Plx3*-hybridisierte Oozyten. Die Oozyten in (B) und (D) sind mit dem animalen Pol nach oben ausgerichtet. (E – H) Überexpression von *Plx1* und *Velo40/Plx3* in Stadium 9 Embryonen. Die

---

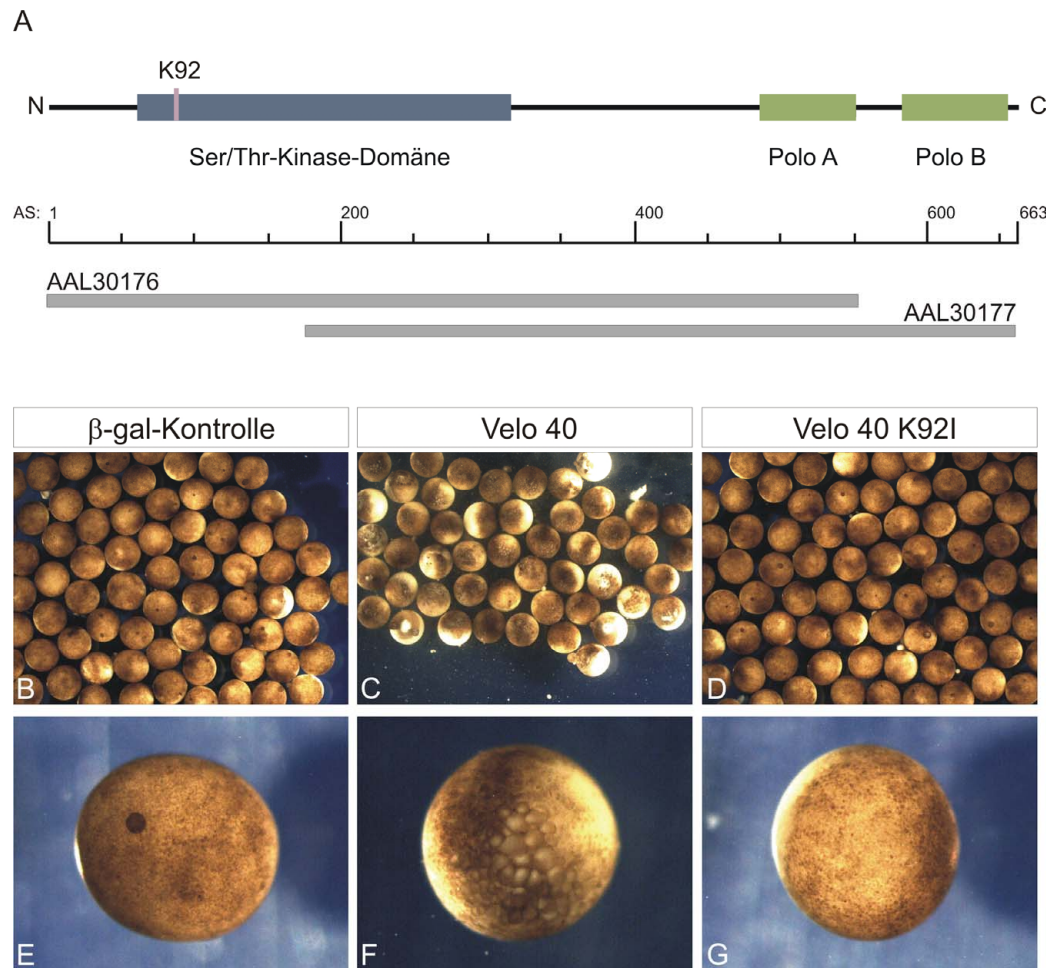
Embryonen wurden im Zweizell-Stadium animal in beide Blastomere mit 500 pg *Plx1* (E, F) bzw. *Velo 40/Plx3* (G, H) RNA injiziert.

Polo-Kinasen zeichnen sich durch eine N-terminale Ser/Thr-Kinase-Domäne und C-terminale Polo-Box-Domänen aus (Abb. 3.23A, (Nigg 1998) Es ist weiter bekannt, dass ein spezieller Lysin-Rest (K92) für die Kinase-Aktivität benötigt wird (Lee *et al.* 1995).

Um zu klären, ob die Kinase-Aktivität für das Auftreten des beobachteten Phänotyps verantwortlich ist, wurde in die kodierende Sequenz von *Velo40/Plx3* eine Mutation eingeführt, welche innerhalb der ATP-bindenden Tasche an Position 92 zu einem Austausch von Lysin mit Isoleucin führt (K92I, Lee *et al.* 1995), und diese mutierte Version von *Plx3* animal in *Xenopus laevis* Embryonen exprimiert. Aus Abb. 3.23B - G wird ersichtlich, dass die K92I-Mutante im Gegensatz zum Wildtyp in keinem der injizierten Embryonen den Zellteilungsdefekt verursacht, und die Kinase-Aktivität essentiell ist, um den Zellzyklus in den Blastula-Embryonen zu inhibieren.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass *Velo40/Plx3* innerhalb der Polo-Kinase-Familie in Abhängigkeit von seiner spezifischen Kinase-Aktivität eine besondere Funktion im Bereich der Zellzyklus-Kontrolle ausübt.





**Abb. 3.23: Der Effekt nach Missexpression von *Velo40* wird über dessen Kinase-Aktivität vermittelt.**

(A) Schematische Darstellung des Proteinproduktes von *Velo40/Plx3*. Das Protein enthält eine Serin/Threonin-Kinase-Domäne (dunkelblau) und zwei Polo-Boxen (grün). In der Kinase-Domäne ist Lysin 92 gekennzeichnet (lila). Die Positionen der Domänen wurden mit Hilfe der *ScanProsite* Software ermittelt. Die jeweiligen Aminosäure (AS)-Positionen sind im Maßstab darunter angegeben. Die Regionen der bisher veröffentlichten, unvollständigen *Plx3*-Sequenzen sind als graue Balken gekennzeichnet (Duncan *et al.* 2001). Die vollständige *Plx3*-cDNA wurde von S.Koch amplifiziert und kloniert (unveröffentlichte Daten). (B-F) Mutation von Lysin 92 zu Isoleucin führt zu einem Verlust der Kinase-Aktivität. Durch Injektion von 500pg mRNA/Blastomer in Embryonen des Zweizellstadiums wurde eine Miss-/Überexpression verursacht. Dargestellt sind Blastula-Embryonen nach Injektion von (B, E)  $\beta$ -Galaktosidase mRNA, (C, F) Wildtyp-*Velo 40* und (D, G) *Velo 40 K92I*.

### **3.3. Anreicherung lokalisierter mRNAs in den primordialen Keimzellen**

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass im Zebrafisch die 3' untranslatierte Region bestimmter mRNAs die Keimzell-spezifische Lokalisation dieser RNAs vermitteln kann. Wird eine solche 3'UTR an die kodierende Region von GFP fusioniert, erreicht man eine Fluoreszenz-Markierung der primordialen Keimzellen (Koprunner *et al.* 2001; Tanaka *et al.* 2001). Dieses Phänomen konnte mittlerweile auch in *Xenopus laevis* Embryonen beobachtet werden (Kataoka *et al.* 2006; Koebernick *et al.* Manuskript eingereicht).

Die *XDeadSouth* RNA wird in Oozyten über den frühen Transportweg vegetal lokalisiert und ist im Embryo im Keimplasma zu finden. *XDead end* RNA wird spät lokalisiert und ist sowohl im Keimplasma als auch in den primordialen Keimzellen zu finden. Injiziert man eine RNA, die die 3'UTR von *XDEADSouth* oder *XDead end* enthält, in frühe Embryonen, dann wird diese RNA in den primordialen Keimzellen angereichert, aber in den somatischen Zellen des Endoderms degradiert. Interessanterweise überlappt sowohl in der *XDEADSouth* RNA als auch in der *XDead End* RNA das minimal benötigte Fragment, das in Keimzellen angereichert und in somatischen Zellen abgebaut wird, mit dem Lokalisationselement für die vegetative Lokalisierung innerhalb der Oozyte (Kataoka *et al.* 2006; Koebernick *et al.* Manuskript eingereicht).

#### **3.3.1. Lokalisationselemente Keimplasma-spezifischer mRNA vermitteln die Anreicherung der RNAs in primordialen Keimzellen**

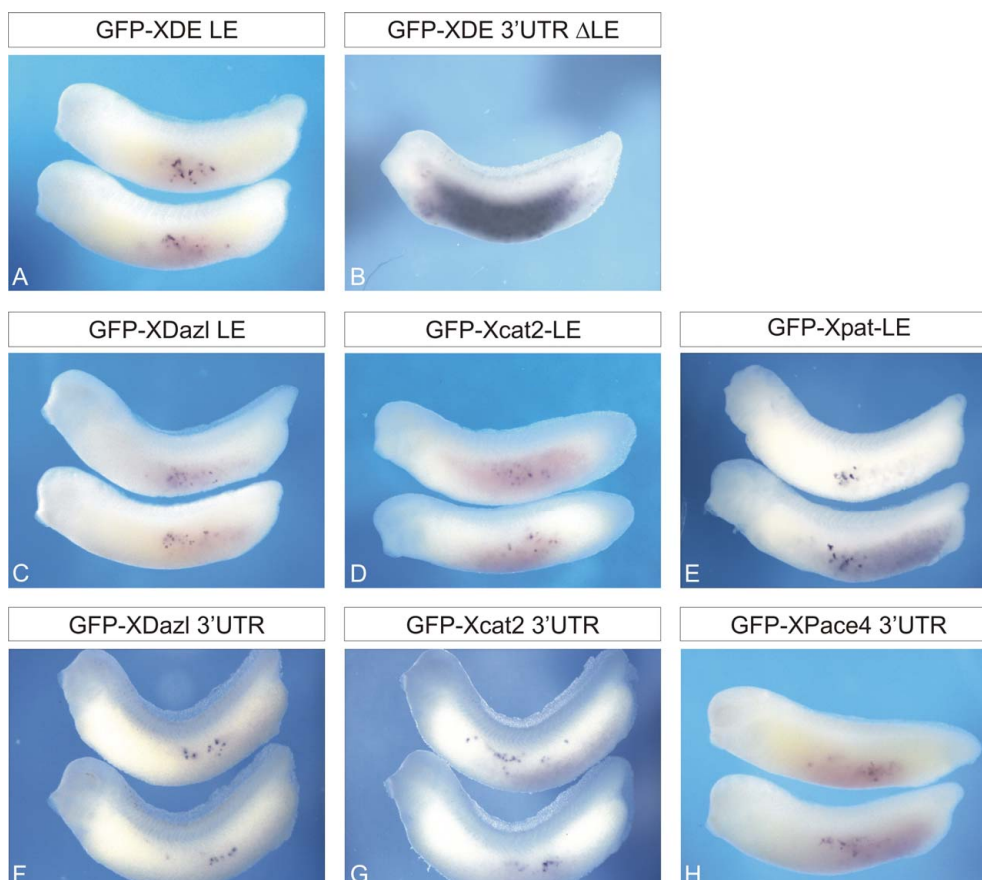
Um herauszufinden, ob die somatische Degradation ein genereller Mechanismus ist, um Keimzell-spezifische Proteinexpression zu erreichen, wurden andere früh lokalisierte, Keimplasma-spezifische mRNAs auf dieses Phänomen hin untersucht. Dazu wurden RNAs ausgewählt, deren Lokalisationselemente bereits experimentell bestimmt worden sind (*XDazl*, *Xcat2*, *Xpat*, Zhou und King 1996; Betley *et al.* 2002). Zusätzlich wurde auch die *XPace4* RNA untersucht, da diese RNA nicht nur im Keimplasma, sondern wie *Xpat* in den primordialen Keimzellen detektiert werden kann (Birsoy *et al.* 2005).

Die Lokalisationselemente bzw. die 3' untranslatierten Regionen dieser RNAs wurden hinter die kodierende Sequenz von GFP fusioniert, und in das Keimplasma, d.h. die äußersten vegetativen Pole beider Blastomere von Zweizell-Embryonen injiziert. Die Lokalisation der RNAs wurde durch *Whole Mount In Situ* Hybridisierung unter

Verwendung einer GFP-spezifischen *antisense* Sonde überprüft. Als Negativkontrolle wurde GFP an die 3'UTR von *XDead End* fusioniert, bei der das Lokalisationselement deletiert wurde (Koebernick *et al.* Manuskript eingereicht).

Dabei zeigte sich, dass alle überprüften RNAs ebenso wie das als Positivkontrolle verwendete *XDead End*-Lokalisationselement (Horvay *et al.* 2006; Koebernick *et al.* Manuskript eingereicht) im Endoderm degradiert und in den Keimzellen angereichert werden (Abb. 3.24, Tab. 3.7), und dass die Lokalisationselemente ausreichend ist, um diese Anreicherung zu vermitteln. Auffällig ist, dass die 3'UTRs von *XDazl* und *Xcat2* im Endoderm vollständig degradiert werden (Abb. 3.24F, G), während die Lokalisationselemente von *XDazl*, *Xcat2* und *Xpat* in den endodermalen Zellen teilweise noch nachgewiesen werden können (Abb. 3.24C – E). Dies könnte die Anwesenheit zusätzlicher regulatorischer Bereiche in den 3'UTRs dieser mRNAs, aber außerhalb ihrer Lokalisationselemente widerspiegeln.

Eine Ausnahme stellt die 3'UTR von *XPace4* dar; im Gegensatz zu den anderen war diese RNA nur in wenigen Embryonen in den Keimzellen nachweisbar. Allerdings wurde auch *XPace4* 3'UTR in den somatischen Zellen degradiert (Abb. 3.24H).



**Abb. 3.24:** Die Lokalisationselemente Keimplasma-spezifischer mRNAs vermitteln eine Anreicherung der RNA in den primordialen Keimzellen.

Die Lokalisationselemente (LE) oder 3' untranslatierten Regionen (3'UTR) von *XDead end* (A), *XDazl* (C, F), *Xcat2* (D, G), *Xpat* (E) und *XPace4* (H) wurden hinter die kodierende Sequenz von GFP kloniert. Die Negativkontrolle enthält die *XDead end* 3'UTR ohne das Lokalisationselement (B). 600 pg *in vitro* transkribierter mRNA wurden in das Keimplasma beider Blastomere von Zweizell-Embryonen injiziert. Die Detektion der injizierten RNA erfolgte durch *Whole Mount In Situ* Hybridisierung unter Verwendung einer GFP-spezifischen Sonde (A, C – H) bzw. einer Sonde gegen GFP-DE 3'UTR (B).

Konstrukt	Embryonen gesamt	Embryonen mit Keimzell-Färbung
GFP-XDE LE	62	48
GFP-XDazl LE	65	58
GFP-Xcat2 LE	56	40
GFP-Xpat LE	66	43
GFP-XDazl 3'UTR	22	12
GFP-Xcat2 3'UTR	18	7
GFP-XPace4 3'UTR	77	9

**Tab. 3.8: Anreicherung der Lokalisationselemente bzw. 3'UTRs Keimplasma-spezifischer RNAs in den primordialen Keimzellen nach Mikroinjektion in Embryonen.**

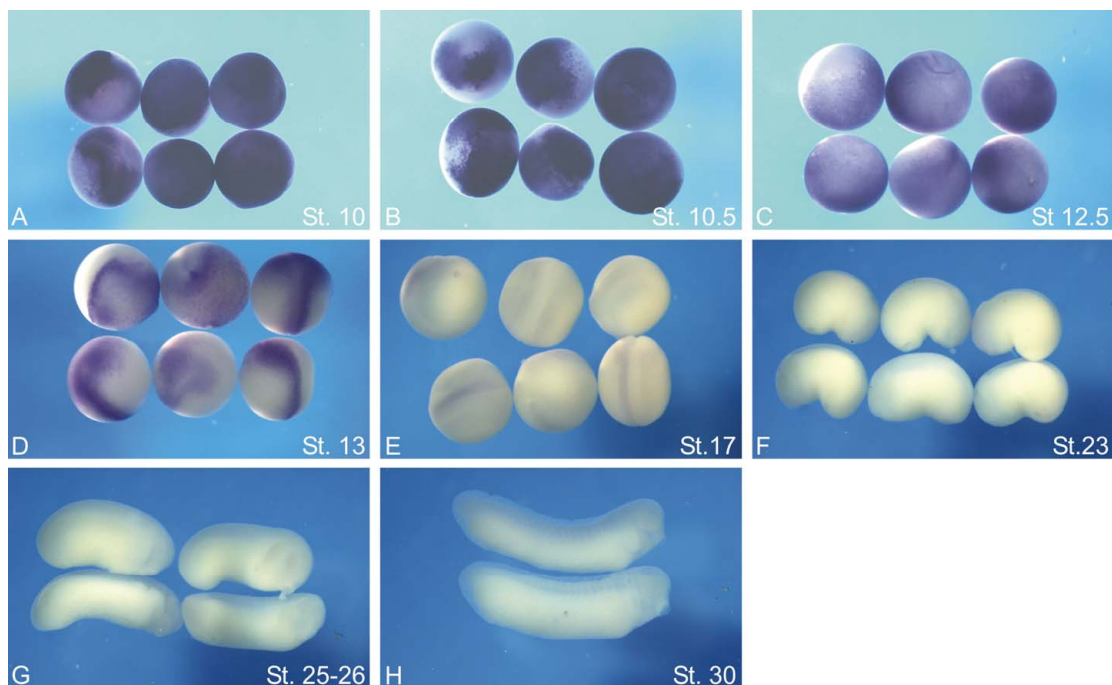
### 3.3.2. Zeitlicher Verlauf der somatischen Degradation Keimzell-spezifischer RNA im Embryo

Um nähere Informationen über den Zeitpunkt der somatischen RNA-Degradation zu erhalten, wurde das Lokalisationselement von *XDead End* (fusioniert an GFP) injiziert und der Abbau der RNA durch *Whole Mount In Situ* Hybridisierung in Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien verfolgt. Da während der Gastrulation die endodermalen Zellen internalisiert werden, kann die RNA-Degradation nach Injektion in den vegetativen Pol in älteren Stadien von außen nicht beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde die RNA für die Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der Degradation animal injiziert. Vorexperimente hatten gezeigt, dass animal injizierte RNA im Embryo vollständig abgebaut wird und sich nicht in den Keimzellen anreichert (Koebernick *et al.* Manuskript eingereicht).

Aus Abb. 3.25 wird ersichtlich, dass die RNA im Stadium 10 in einem Großteil des animalen Pols sichtbar ist (Abb. 3.25A). Ab Stadium 10,5 setzt die Degradation ein und mit Ende der Gastrulation ist die Färbung der RNA deutlich schwächer (Abb. 3.25B, C). Während der Neurulation ist die RNA deutlich entlang der Mittellinie zu erkennen, wo sie schließlich zuletzt abgebaut wird (Abb. 3.25D, E). Im Stadium 23 ist die RNA außerhalb der Keimzellen vollständig abgebaut (Abb. 3.25F). Da animal

injiziert wurde, ist im Stadium 30 keine Keimzellanreicherung zu erkennen. Nur im unteren Embryo der Abb. 3.25H ist eine einzelne, angefärbte Zelle sichtbar, die wahrscheinlich eine Keimzelle ist.

Der Abbau der injizierten Reporter-RNA findet also nicht abrupt statt, sondern zieht sich über einen Zeitraum von mehreren Stunden hin. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit einer früheren Studie, in welcher die RNA-Stabilität in einem Northern Blot Experiment überprüft wurde (Kataoka *et al.* 2006). Allerdings wurde durch das hier gezeigte Experiment der Zeitrahmen der Degradation genauer definiert und eingegrenzt.



**Abb. 3.25: Zeitlicher Verlauf der somatischen RNA-Degradation des *XDead End* Lokalisationselementes.**

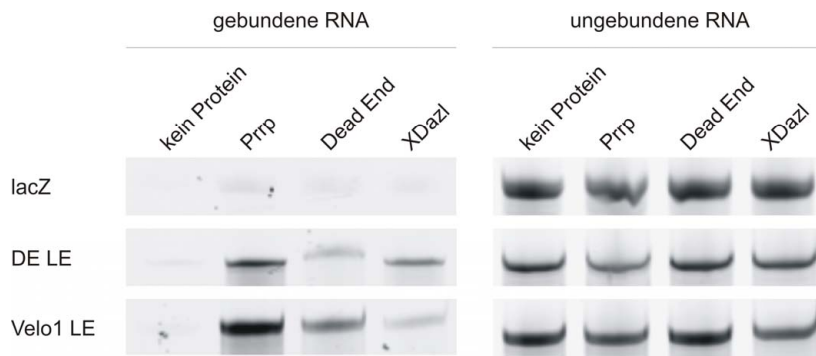
400 pg GFP-*XDead End* LE mRNA wurde in den animalen Pol beider Blastomere von Zweizell-Embryonen injiziert und die Embryonen in verschiedenen Entwicklungsstadien auf die Anwesenheit der injizierten RNA untersucht. Die jeweiligen Stadien sind unten links angegeben. (A-C) Gastrulation, (D,E) Neurulation, (F-H) Schwanzknospenstadien.

### 3.3.3. Keimplasma-spezifische RNA-Protein-Interaktionen

Es gibt starke Hinweise auf eine Beteiligung von mikroRNAs an der Degradation der injizierten RNA in somatischen Zellen. So verhindert beispielsweise die Mutation einer konservierten, möglichen mikroRNA-Bindungsstelle den RNA-Abbau im

Endoderm. Dasselbe Resultat erzielt man durch die Injektion eines Morpholino-Oligonukleotids, das sich an eben diese Bindungsstelle anlagert und damit blockiert, oder auch durch Injektion von Oligonukleotiden, die direkt an mögliche mikroRNAs binden und diese damit inhibieren. Es stellt sich nun die Frage, aus welchem Grund dieser Degradationsmechanismus in den primordialen Keimzellen nicht aktiv ist. Eine Möglichkeit wäre die Abwesenheit von mikroRNAs bzw. bestimmter Komponenten der RNA-Degradationsmaschinerie. Alternativ könnten aber auch bestimmte Proteine an die betroffenen mRNA-Moleküle binden und sie damit vor der Anlagerung von mikroRNAs oder vor der Degradation schützen.

Diese Proteine sollten Keimplasma- bzw. Keimzell-spezifisch exprimiert sein und RNA-Bindeaktivität besitzen. Horvay *et al.* konnten eine besonders starke Bindung von Prrp an das *XDead End* Lokalisationselement nachweisen (Horvay *et al.* 2006). Aus diesem Grund wurde es als Positivkontrolle für die Überprüfung der RNA-Protein-Interaktion weiterer Proteine verwendet. Weitere analysierte Proteine waren *XDead End* selbst und *XDazl*, da beide Proteine RNA-Bindedomänen besitzen und ihre Bedeutung für die Keimzellentwicklung bereits demonstriert wurde (Houston und King 2000; Horvay *et al.* 2006). *XDead End* LE wurde *in vitro* transkribiert und dabei Fluoreszenz-markiert. Nach Inkubation der RNA mit *in vitro* translatierten Proteinen wurden diese immunopräzipitiert, die gebundene RNA extrahiert, in einem Harnstoffgel aufgetrennt und im Fluoreszenz-Imager detektiert. Zum Vergleich wurde dasselbe Experiment auch für *Velo1* LE durchgeführt, da auch dieses Lokalisationselement stark von Prrp gebunden wird (Claussen und Pieler 2004). Abb. 3.26 zeigt, dass alle drei Proteine an das *XDead End* Lokalisationselement binden. Da die Proteine mit unterschiedlichen Epitop-Markierungen versehen waren, kann die Translations- und Immunopräzipitationseffizienz nicht in einem *Western Blot* verglichen werden. Aus diesem Grund kann auch die Bindung der verschiedenen Proteine an eine RNA nicht miteinander verglichen werden, sondern nur die Bindung eines Proteins an die beiden RNAs. Prrp bindet effizient an die Lokalisationselemente beider RNAs. *Dead End* Protein bindet stärker an *Velo1* als an seine eigene RNA. *XDazl* dagegen bindet die *XDead end* RNA stärker als *Velo1*. Damit kommen prinzipiell alle drei Proteine als potentielle "Schutzfaktoren" in Frage. Ein Protein, das diese Schutzfunktion tatsächlich erfüllt, sollte zum Zeitpunkt der Degradation, nämlich während der Gastrulation und Neurulation des Embryos in den primordialen Keimzellen exprimiert sein. Dies wurde bisher nur für *XDazl*, nicht aber für Prrp oder *XDead end* gezeigt (Houston und King 2000).



**Abb. 3.26: Verschiedene Proteine binden an das *XDead end* Lokalisationselement.**

*In vitro* transkribierte Alexa-markierte RNA wurde mit *in vitro* translatierten Proteinen inkubiert, immunopräzipitiert und in einem denaturierenden Harnstoffgel aufgetrennt. Die Detektion der RNA erfolgte im Fluoreszenz-Imager. Links sind die jeweils verwendeten RNAs angegeben.



## 4. Diskussion

Die Lokalisierung maternaler RNA-Moleküle stellt einen wichtigen Mechanismus zur Erzeugung intrazellulärer Asymmetrie in der Oozyte dar und ist essentiell für die frühe Embryonalentwicklung in *Xenopus laevis*. Mittlerweile ist eine Vielzahl vegetativ lokalisierter RNAs identifiziert worden, und einigen dieser RNA-Moleküle bzw. ihrer Proteinprodukte konnte bereits eine Funktion zugeordnet werden. Über den molekularen Mechanismus der RNA-Lokalisierung ist allerdings nur wenig bekannt. Zwar weiß man, dass bestimmte *cis*-Elemente innerhalb der RNA diese für den Transport markieren und die Lokalisationsmaschinerie rekrutieren können, aber die genaue Zusammensetzung der Transportkomplexe ist bisher nicht vollständig aufgeklärt.

Um noch unbekannte *trans*-agierende Transportfaktoren zu identifizieren, sollte eine Aufreinigung des Epitop-markierten Lokalisationsfaktors Vg1RBP im großen Maßstab durchgeführt werden. Bindungspartner von Vg1RBP sollten identifiziert und im Hinblick auf ihre Rolle in der RNA-Lokalisierung charakterisiert werden. Für die Expression von markiertem Vg1RBP in sehr frühen Oozyten wurden transgene Frösche generiert, in denen die Expression von TAP-Vg1RBP unter der Kontrolle des oozyten-spezifischen *TFIIIA*-Promotors stand. Die Oozyten der transgenen Frösche wurden auf DNA-, RNA- und Proteinebene hinsichtlich der Integration und der Expression der transgenen DNA analysiert. Dabei zeigte sich, dass das rekombinante Protein trotz DNA-Integration in den Oozyten der transgenen Tiere nicht exprimiert wird.

Die Expression von TAP-Vg1RBP wurde alternativ mittels RNA-Mikroinjektion erreicht, so dass anschließend eine affinitätschromatographische Aufreinigung durchgeführt werden konnte. Die isolierten Kandidatenproteine wurden massenspektrometrisch identifiziert und biochemisch auf ihre Interaktion mit der Lokalisationsmaschinerie hin untersucht.

Des Weiteren wurde die Funktion mehrerer neu identifizierter, vegetativ lokalisierender mRNAs und deren Proteine analysiert. In *gain of function* und *loss of function* Experimenten wurde die Expression dieser RNAs in *Xenopus laevis* Embryonen räumlich verändert und hochreguliert bzw. herunterreguliert. Die manipulierten Embryonen wurden auf morphologische Veränderungen hin untersucht. Dabei wurde eine RNA gefunden, die für eine Kinase der Polo-Familie kodiert und abhängig von ihrer Kinase-Aktivität bei Überexpression Teilungsdefekte in den Zellen von Blastula-Embryonen verursacht.



In einem weiteren Projekt wurden mehrere früh lokalisierte RNAs im Hinblick auf die Anreicherung in Keimzellen und die somatische Degradation im Endoderm hin analysiert.

#### 4.1. Generierung und Analyse transgener Frösche

Vg1RBP ist ein wichtiger Marker für RNA-Lokalisierungskomplexe in *Xenopus* Oozyten. Es bindet an die Lokalisationselemente von *Vg1* und *VegT*, außerdem können RNAs, deren Bindungsstellen für Vg1RBP durch Mutationen zerstört wurden, nicht mehr zum vegetativen Pol der Oozyte transportiert werden (Deshler *et al.* 1997). Damit erschien das Protein als ein geeigneter Kandidat für die Aufreinigung intakter Lokalisationskomplexe aus dem Lysat früher Oozyten. Vg1RBP wird während der gesamten Oogenese gleichmäßig exprimiert, und ist eines der ersten Proteine, die nachweislich an spät lokalisierende RNAs binden (Zhang *et al.* 1999b; Kress *et al.* 2004; Lewis und Mowry 2007). Will man eine Epitop-markierte Variante von Vg1RBP in *Xenopus* Oozyten exprimieren, mit dem Ziel, dass diese in Lokalisationskomplexe integriert wird und für eine Affinitätschromatographische Aufreinigung genutzt werden kann, ist die frühe Expression von besonderer Bedeutung. Nur, wenn das Protein bereits zu Beginn der RNA-Lokalisation in der Oozyte zur Verfügung steht, kann es mit endogenem Vg1RBP um den Einbau in den Transportkomplex konkurrieren.

Aus diesem Grund sollte Vg1RBP, welches N- bzw. C-terminal mit einem Protein-Tag versehen ist, in transgenen Fröschen unter der Kontrolle eines Oozyten-spezifischen Promotors exprimiert werden. *Xenopus* Oozyten besitzen die Eigenschaft, in den frühen Stadien ihrer Oogenese große Mengen ribosomaler RNA zu synthetisieren. Dies wird einerseits durch die Amplifikation ribosomaler Gene, andererseits durch die Überexpression des 5S rRNA-spezifischen Transkriptionsfaktors TFIIIA (Pelham und Brown 1980; Shastry *et al.* 1984) gewährleistet. So trägt TFIIIA ca. 10% zum Gesamtprotein-Gehalt in Oozyten bei, und man findet hier ca.  $10^6$ -mal mehr TFIIIA mRNA als in somatischen Zellen (Ginsberg *et al.* 1984). Aufgrund seiner überaus starken Aktivität in Oozyten der frühen und mittleren Oogenese-Stadien bietet sich der TFIIIA-Promotor besonders für die Expressionskontrolle von TAP-Vg1RBP in den Oozyten transgener Frösche an. Es wurde ein Fragment des Promotors gewählt, das die drei aktivierenden Elemente E1 – E3 enthält und für die Transkriptionsaktivierung in frühen Oozyten ausreichend sein sollte (Pfaff und Taylor 1992). Um dies zu bestätigen, wurde ein Plasmid, in welchem der TFIIIA-Promotor die Transkription von GFP kontrolliert, in die Kerne von Stadium II

und III Oozyten injiziert. Anhand der GFP-Fluoreszenz konnte gezeigt werden, dass das gewählte Promotorfragment in *Xenopus* Oozyten transkriptionsaktivierend wirkt.

Die transgenen Tiere wurden aufgrund der Reportergen-Expression in den Augenlinsen im Embryogenese-Stadium 40 selektiert und aufgezogen. Vor der Operation zur Oozytengewinnung wurde die Expression des Reporters erneut überprüft. Alle operierten Tiere zeigten in den Augen GFP-Fluoreszenz, enthielten also die transgene DNA in ihrem Genom. Die genomische DNA aus den Oozyten wurde mittels PCR auf das Vorhandensein und die Integrität der transgenen DNA untersucht. Diese Untersuchung zeigte, dass die Hälfte der Frösche das gesamte Konstrukt integriert hatte (50%), einige Frösche hatten Fragmente der transgenen DNA integriert (33,3%), und in einigen Fröschen ließ sich die DNA überhaupt nicht nachweisen (16,6%). Dies deutet auf eine mosaische Integration der Fremd-DNA in das Genom hin, d.h. die DNA war zwar im Auge vorhanden, wurde aber offensichtlich nicht in die Keimbahn weitergegeben. Da für eine nicht-mosaische DNA-Integration diese bereits vor der ersten DNA-Replikation im Einzell-Embryo erfolgen muß, kann davon ausgegangen werden, dass die Integration in den GFP-positiven Tieren, bei denen die transgene DNA nicht in den Oozyten nachweisbar ist, zu spät erfolgte. Dies kann nicht durch den Zeitpunkt der Injektion erklärt werden, denn findet die Integration im Zweizellstadium, aber nur in einem Blastomer statt, erhält man einseitig transgene Tiere. Dies war hier durchaus der Fall; von diesen Tieren wurden Oozyten aber nur aus der GFP-positiven Körperseite entnommen. Es ist wahrscheinlicher, dass bei den PCR-negativen Fröschen die DNA-Integration zu einem späteren Embryonalstadium stattfand, so dass hier eine echte mosaische, statt einer unilateralen DNA-Verteilung vorliegt. Die Reporterkassette ermöglicht nur die Selektion von Tieren, die die transgene DNA in den Linsen-Zellen enthalten, über die Oozyten erhält man darüber keine Information.

Außerdem scheint die DNA in einzelnen Fällen vor ihrer Integration fragmentiert worden zu sein. In der durchgeführten Analyse ist kein einheitliches Fragmentierungsmuster zu erkennen, was eher auf "zufällige" Spaltungen als auf einen speziellen Mechanismus hindeutet. Die Endonuklease *I-SceI* kann als Ursache ausgeschlossen werden, da innerhalb der zu integrierenden Expressionskassetten keine *I-SceI*-Schnittstelle vorhanden war. Über den Mechanismus der *I-SceI*-vermittelten DNA-Integration ist bisher nicht viel bekannt. Das Froschgenom enthält aufgrund ihrer Länge von 18 bp wahrscheinlich keine Restriktionsschnittstelle für *I-SceI*. Damit kann man die Möglichkeit ausschließen, das Enzym würde sowohl Plasmid- als auch genomische DNA spalten, so dass beide sich an den entstandenen

Enden aneinanderlagern und ligiert werden können. Es wird stattdessen vermutet, dass sich die Meganuklease an die DNA-Enden des gespaltenen Plasmids anlagert und diese dadurch vor Religierung oder Degradation schützt (Thermes *et al.* 2002; Grabher *et al.* 2004). Da die zwei Expressionskassetten zusammen eine Länge von über 3 kb haben, sind interne Strangbrüche oder Angriffe zelleigener Endonukleasen durchaus vorstellbar.

Insgesamt wurden 9 Frösche identifiziert, in deren Oozyten die DNA für die Expression TAP-markierten Vg1RBPs vorhanden ist. In diesen Fröschen sollte das Protein unter der Kontrolle des *TFIIIA*-Promotors exprimiert werden. Für die Analyse der Proteinexpression wurden für jeden Frosch jeweils alle Oozyten-Stadien in zwei verschiedenen Mengen im *Western Blot* untersucht, TAP-Vg1RBP wurde dabei jedoch nicht detektiert. Dafür kommen drei Erklärungen in Frage. Entweder war das *TFIIIA*-Promotor-Fragment nicht aktiv, oder die RNA wurde translational reprimiert, oder das rekombinante Protein wurde degradiert. Viele mRNAs werden in *Xenopus* Oozyten direkt nach der Transkription von maskierenden Proteinen gebunden und dadurch translational reprimiert (z. B. Bouvet 1994). Dieser Zustand wird meist während der Progesteron-stimulierten Eireifung aufgehoben. Die RT-PCR-Analyse zeigt jedoch, dass bereits die Transkription der transgenen DNA in den Oozyten nicht oder nur sehr ineffizient ablief. Zwar kann die RNA für TAP-Vg1RBP in wenigen Fällen detektiert werden, allerdings nur sehr schwach.

Die Funktionalität des *TFIIIA*-Promotorfragmentes wurde im Vorversuch bestätigt. Möglicherweise fehlen in diesem Fragment jedoch aktivierende, mehr distal gelegene Elemente, die für außergewöhnlich starke Aktivität des endogenen Promotors verantwortlich sind. Eine weitere Möglichkeit für das Versagen des Promotors stellt die räumliche Nähe zum  *$\gamma$ -Crystallin1*-Promotor der Reporter-kassette dar. Beide Promotoren wurden, um die Konstruktlänge gering zu halten, direkt aneinander kloniert.  *$\gamma$ -Crystallin1* ist als Linsen-spezifischer Promotor in Oozyten inaktiv. Es ist durchaus vorstellbar, dass ein inhibitorischer Komplex, welcher den  *$\gamma$ -Crystallin1*-Promotor reprimiert, auch den *TFIIIA*-Promotor blockiert. In diesem Fall sollte ein Isolatorfragment zwischen  *$\gamma$ -Crystallin1* und *TFIIIA* die Repression aufheben (Bell und Felsenfeld 1999; Allen und Weeks 2005). Weiterhin kann auch die Chromatinstruktur über die Aktivität eines Gens entscheiden, d.h. wird die transgene DNA in eine Region des Genoms integriert, die inaktiv ist, dann kann dadurch auch das eingeschleußte Gen inaktiviert werden. Auch dieser Chromatin-Positionierungseffekt kann durch schützende Isolatoren verhindert werden (Allen und Weeks 2005).

## 4.2. Aufreinigung Vg1RBP-bindender Proteine

### 4.2.1. Aufreinigungsstrategie

Da keine Expression von TAP-Vg1RBP in den Oozyten transgener Frösche erfolgte, wurde das markierte Protein alternativ durch Mikroinjektion von mRNA in Oozyten der Stadien III und IV exprimiert. Außerdem wurde ein *in vitro* transkribiertes Lokalisationselement ko-injiziert, um die Bildung neuer Lokalisationskomplexe zu ermöglichen. Die Funktionalität des Fusionsproteins wurde durch Zonalzentrifugation überprüft. Dabei entsprach das Verhalten von TAP-Vg1RBP dem des endogenen Vg1RBP.

Ursprünglich sollte der Transportkomplex durch eine Tandem-Affinitätschromatographie isoliert werden. Es waren jedoch bereits nach dem ersten Aufreinigungsschritt kaum noch unspezifische Proteine zu detektieren, daher wurde auf den zweiten Schritt verzichtet. Außerdem ging im ersten Schritt ein Anteil des TAP-Vg1RBP verloren (Daten nicht gezeigt), so dass ein weiterer Reinigungsschritt möglicherweise weiteren Materialverlust zur Folge gehabt hätte.

Die isolierten Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert. Es wurden mehrere Proteine identifiziert, auf die im Folgenden eingegangen werden soll. Darunter befand sich auch endogenes Vg1RBP, das hier als Positivkontrolle gewertet werden kann, da bekannt ist, dass es Homodimere bildet (Git und Standart 2002). Aufgrund der geringen Materialmenge konnten einige Proteine nicht identifiziert werden. Überdies war die Degradation von Vg1RBP bzw. TAP-Vg1RBP festzustellen, die auch im *Western Blot* detektiert werden konnte. Dieses Problem war in Vorexperimenten nicht aufgetreten und lässt sich nur durch zusätzliche Zwischenschritte erklären, die im kleinen Maßstab der Vorversuche nicht notwendig waren.

### 4.2.2. Embryonales Poly(A)-bindendes Protein

Embryonales Poly(A)-bindendes Protein (ePAB) wurde im Coomassie-Gel von Vg1RBP überdeckt, da beide Proteine dasselbe Molekulargewicht besitzen, aber scheinbar eine größere Menge Vg1RBP als ePAB isoliert wurde. Im Gegensatz zu Poly(A)-bindendem Protein (PABP) wird ePAB in Oozyten und während der frühen Embryogenese in *Xenopus laevis* exprimiert. Es bindet und stabilisiert Poly(A)-Regionen in der 3'UTR von mRNAs, ist in Polysomen zu finden und wirkt wie PABP als translationaler Aktivator (Voeltz *et al.* 2001; Wilkie *et al.* 2005). ePAB scheint damit generell an polyadenylierte, translatierte mRNAs zu binden. Es wird geschätzt, dass in

Stadium VI Oozyten etwa 50 ng des Proteins vorhanden sind, dies entspricht ca.  $10^{11}$  Kopien. Patel und Bag konnten zeigen, dass PABP und das Vg1RBP-Homolog IMP1 *in vitro*, über ihre C-Termini aneinander binden (Patel und Bag 2006). Diese Interaktion ist wahrscheinlich unabhängig von RNA, allerdings wurde dies nicht konkret überprüft. In dieser Arbeit wurde in Ko-Immunopräzipitationsexperimenten jedoch gezeigt, dass Vg1RBP und ePAB in *Xenopus* Oozyten zwar miteinander interagieren, die Assoziation hier allerdings von der Präsenz intakter RNA abhängig ist (Abb. 3.10). Ebenso wie Vg1RBP bindet ePAB auch an die trans-agierenden Faktoren Staufen, ElrA und evt. ElrB1 (Abb. 3.11). Überdies ko-sedimentiert es im Glycerol-Gradienten mit Vg1RBP und 40LoVe. Dies deutet darauf hin, dass ePAB entweder im Lokalisationskomplex vorhanden ist, oder die Transportfaktoren in weiteren, lokalisationsunabhängigen RNPs vorhanden sind, die ebenfalls ePAB enthalten.

#### 4.2.3. Y-Box-bindendes Protein 2 (FRGY-2B)

Das Y-Box-bindende Protein 2 wurde ursprünglich gemeinsam mit dem sehr ähnlichen Y-Box-bindenden Protein 1 als DNA-bindendes Protein identifiziert. Es wird Keimzell-spezifisch exprimiert (Tafari und Wolffe 1990). Es bindet aber auch an mRNAs, maskiert diese und verhindert dadurch ihre Translation (Braddock *et al.* 1994; Matsumoto und Wolffe 1998). Interessanterweise werden auf diese Weise nur intronfreie mRNAs reguliert (Matsumoto und Wolffe 1998). Die maskierten RNA-Moleküle können so für lange Zeit vor der Translationsmaschinerie geschützt und gespeichert werden.

Vg1RBP ist also ebenso wie FRGY-2 eine Komponente (wahrscheinlich) translationsreprimierter RNA-Protein-Partikel, da beide Proteine RNA-abhängig miteinander interagieren. Um eine räumlich kontrollierte Proteinexpression gewährleisten zu können, müssen lokalisierte RNAs während des Transportes translational inhibiert werden. So ist beispielsweise das Vg1 Protein erst in Stadium IV Oozyten detektierbar, wenn die Lokalisierung seiner mRNA abgeschlossen ist (Dale *et al.* 1989; Cahill *et al.* 2002; Colegrove-Otero *et al.* 2005); *VegT* wird sogar erst nach der Eireifung translatiert (Stennard *et al.* 1996). Die Anwesenheit von FRGY-2B im Lokalisationskomplex bestätigt also die Hypothese, dass lokalisierende RNAs translational reprimiert sind.

Hüttelmaier *et al.* konnten kürzlich zeigen, dass das Vg1RBP-Homolog ZBP1 in Hühnerfibroblasten die Translation lokalisierender  $\beta$ -aktin mRNA inhibiert. Erst nach Phosphorylierung und Dissoziation von ZBP1 am Zielort konnte die RNA translatiert werden (Hüttelmaier *et al.* 2005). Allerdings ist es bisher nicht gelungen, eine

translationsreprimierende Funktion für Vg1RBP direkt nachzuweisen (Püschel 2007). Widersprüchlich ist außerdem der Befund, dass Vg1RBP auch an den Translationsaktivator ePAB bindet (Abb. 3.10). Entweder handelt es sich hier um zwei distinkte, Vg1RBP-enhaltende RNA-Protein-Komplexe, oder ePAB bindet an mRNAs, die noch nicht translatiert werden, oder FRGY-2 bindet ebenfalls an translatierte mRNAs. Eine Antwort läßt sich nur durch weitere Protein-Protein-Bindungsstudien finden, in welchen die Interaktion zwischen FRGY-2 und ePAB genauer untersucht wird. Ein solches Ko-Immunopräzipitationsexperiment wurde kürzlich in einer Studie über FRGY-2-haltige RNPs in *Xenopus* Oozyten veröffentlicht. Dabei sind als FRGY-2-Bindungspartner sowohl Vg1RBP also auch ePAB und PABP identifiziert worden (Tanaka *et al.* 2006). Die drei Proteine sind also Teil desselben RNA-Protein-Komplexes.

Interessant ist an dieser Stelle, dass sowohl FRGY-2B als auch ePAB *in vivo* an translational aktive, wie *XDazl* (Mita und Yamashita 2000), und inaktive mRNAs wie *VegT* binden. Es konnte in dieser Arbeit keine spezifische Bindung von FRGY-2 an lokalisierte mRNAs festgestellt werden. Dies war zu erwarten, da die Bindung an nicht lokalisierende mRNAs bereits in der Literatur beschrieben wurde (z.B. an Histon H1, Bouvet und Wolffe 1994). Wahrscheinlich werden die RNAs in Lokalisationskomplexen von FRGY-2 ebenso maskiert wie ubiquitär verteilte mRNAs und auf diese Weise translational inhibiert.

#### 4.2.4. Elongationsfaktor-1 $\alpha$ (42Sp50)

Der dritte identifizierte Vg1RBP-Bindungspartner ist 42Sp50 (bzw. 42Sp48, Thesaurin a), ein Mitglied der Familie der Elongationsfaktoren 1 $\alpha$ , zu der außerdem EF-1 $\alpha$ O (in Oozyten) und EF-1 $\alpha$ S (in somatischen Zellen) gehören. Während EF-1 $\alpha$ O und EF-1 $\alpha$ S zu 91% identische Aminosäuren besitzen, ist 42Sp50 zu 69% identisch mit EF-1 $\alpha$ O (Dje *et al.* 1990). Trotz der großen Ähnlichkeit dieser Proteine können die Peptidsequenzen aus der massenspektrometrischen Analyse jedoch eindeutig 42Sp50 zugeordnet werden.

Die Hauptaufgabe von 42Sp50 ist die Stabilisierung und Speicherung von 5S ribosomaler RNA und tRNAs in 42S Ribonukleoprotein-Partikeln. Es wird in sehr frühen Oozyten exprimiert und trägt in diesen bis zu 20% des Gesamtprotein-Gehaltes bei (Mattaj *et al.* 1983). Damit ist es neben TFIIIA eines der am stärksten exprimierten Proteine in frühen Oozyten. Interessanterweise konnte es in Oozyten der Stadien III – V in einer früheren Studie nicht mehr detektiert werden (Mattaj *et al.* 1987). Stattdessen wurde ab Stadium III ausschließlich EF-1 $\alpha$ O nachgewiesen.

In dieser Arbeit wurde 42Sp50 als Vg1RBP-Interaktionspartner in Stadium III – IV Oozyten identifiziert, obwohl es von Mattaj *et al.* in diesen Stadien immunologisch nicht mehr detektiert werden konnte (Mattaj *et al.* 1987). Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte darin zu suchen sein, dass für die Expressionsanalyse von Mattaj *et al.* hauptsächlich späte Stadium III Oozyten verwendet wurden, während in der hier vorliegenden Arbeit zur Expression von TAP-Vg1RBP u.a. frühe Stadium III und wahrscheinlich auch späte Stadium II Oozyten benutzt wurden, die noch genügend 42Sp50 exprimierten, um es mit aufzureinigen.

Für die weiteren Experimente dieser Arbeit wurden Oozyten der Stadien III – IV bzw. V – VI verwendet. Dabei zeigte sich, dass durch RNA-Mikroinjektion exprimiertes 42Sp50 in den Stadien III – IV schwach und in älteren Oozyten stark mit Vg1RBP assoziiert. Auch eine schwache Bindung an Staufen und ElrA, jedoch nicht an 40LoVe konnte festgestellt werden. Ob diese Interaktionen auch von dem endogenen Protein eingegangen werden, konnte mangels eines spezifischen Antikörpers gegen 42Sp50 nicht untersucht werden. Die beobachteten Assoziationen sind auch im Fall von 42Sp50 von der Präsenz intakter RNAs abhängig; es wurde keine RNA-unabhängige Protein-Protein-Interaktion gefunden. 42Sp50 ist für seine Bindung an ribosomale RNA und tRNA bekannt (Picard *et al.* 1980), in dieser Arbeit konnte zusätzlich auch eine schwache Assoziation an Boten-RNAs gezeigt werden. *In vitro* bindet EF-1 $\alpha$  nur sehr schwach an mRNAs, d.h. die Assoziationen zwischen den RNA-Molekülen und EF-1 $\alpha$  sind wahrscheinlich indirekt. *In vivo* wurde eine Präferenz für bestimmte lokalisierende RNAs festgestellt. So ist ca. 40 Mal mehr *VegT* oder *XNIF* RNA im EF-1 $\alpha$ -RNP detektierbar als GAPDH, eine RNA, die in der *Xenopus* Oozyte nicht am vegetativen Kortex lokalisiert vorliegt. Interessanterweise werden aber nicht alle lokalisierenden RNAs im EF-1 $\alpha$ -RNP gleichermaßen angereichert. Für *Vg1* und *XDead end* konnte keine Akkumulation im RNP nachgewiesen werden (Abb. 3.14D). Ob dies von funktioneller Bedeutung ist, muss noch untersucht werden. Da *VegT* und *XNIF* über unterschiedliche Transportwege lokalisiert werden, liegt zumindest dahingehend keine Spezifität vor.

Im Folgenden soll auf die mögliche Funktion des Elongationsfaktors im Kontext der RNA-Lokalisierung eingegangen und Experimente vorgeschlagen werden, mit denen diese Hypothese untersucht werden kann.

Die am besten untersuchte Funktion des Elongationsfaktors 1 $\alpha$  ist der Transport von tRNAs zum Ribosom, wo die tRNA in einer GTP-abhängigen Reaktion an die mRNA angelagert wird (Riis *et al.* 1990). Jedoch wird seit langem vermutet, dass EF-1 $\alpha$  auch andere, bisher unbekannte Aufgaben übernimmt, da es in den meisten

Zelltypen im Vergleich zu anderen Proteinen der Elongationsmaschinerie im großen Überschuß vorhanden ist, und z.B. bekannte posttranslationale Modifikationen keinen Einfluss auf seine Aktivität als Elongationsfaktor haben (Durso und Cyr 1994a).

Es ist bekannt, dass Mitglieder der EF-1 $\alpha$ -Familie mit Komponenten des Zytoskeletts interagieren. So wurde z. B. das Aktin-Filament-bindende Protein ABP-50 aus *Dictyostelium discoideum* als EF-1 $\alpha$ -Homolog identifiziert. In einem Sequenz-Vergleich zwischen der Aktin-Bindedomäne des Aktin-bindenden Protein Depactin und ABP-50 zeigte sich ein gewisser Grad an Konservierung (Yang *et al.* 1990). Auch die Elongationsfaktoren 42Sp50 und EF-1 $\alpha$ O aus *Xenopus laevis* zeigen in der entsprechenden Region eine gewisse Homologie zu Depactin, u. a. sind 4 der 7 für die Bindung an Aktin essentiellen Aminosäuren identisch (Abb. 4.1). Des Weiteren konnte auch gezeigt werden, dass EF-1 $\alpha$  an Mikrotubuli bindet und diese bündelt (Durso und Cyr 1994b).

42Sp50 (Dje <i>et al.</i> 1990)	161	PYSHKRFDEVVNRNVMVYLKK
EF-1 $\alpha$ O (Dje <i>et al.</i> 1990)	161	PFSQKRFEETKEVSAVTKK
ABP-50 (Yang <i>et al.</i> 1990)	164	NYSQARYDEIVKEVSSFIKK
Depactin (Sutoh und Mabuchi 1989)	1	POSQGTALDENVKEEIRAFKM
		*            **        ***        *

**Abb. 4.1: Sequenzvergleich zwischen Formen des Elongationsfaktors 1 $\alpha$  aus *Xenopus laevis* und *Dictyostelium discoideum* und der Aktin-bindenden Region von Depactin.**

Aminosäuren, die identisch zur Sequenz von 42Sp50 sind, sind schwarz, Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften sind grau unterlegt. Die Sterne markieren die essentiellen Aminosäuren für die Aktin-Bindung von Depactin (Sutoh und Mabuchi 1989; Yang *et al.* 1990).

Die Bedeutung des Zytoskeletts für den Transport und die Verankerung vegetativ lokalisierter RNAs ist bereits in Kapitel 1.5.3 ausführlich besprochen worden. Es gibt verschiedene Hinweise auf eine Assoziation zwischen dem Zytoskelett und EF-1 $\alpha$ . So wurde in elektronenmikroskopischen Untersuchungen eine Ko-Lokalisierung von EF-1 $\alpha$  und Poly(A)-RNAs an Aktin-Filamenten festgestellt (Bassell *et al.* 1994). Außerdem konnten Liu *et al.* zeigen, dass EF-1 $\alpha$  in Hühnerfibroblasten gleichzeitig an F-Aktin und  $\beta$ -aktin mRNA bindet, und mit der RNA in den peripheren Regionen der Lammelipodien ko-lokalisiert. Eine dominant-negative Version des Elongationsfaktors inhibiert bei Überexpression die intrazelluläre Lokalisierung der  $\beta$ -aktin mRNA (Liu *et al.* 2002). Es scheint daher naheliegend, dass auch EF-1 $\alpha$  bzw. 42Sp50 in der *Xenopus* Oozyte eine



Rolle bei der Verankerung der RNA-Moleküle am kortikalen Aktin-Netzwerk spielen könnten.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnten *in vitro* nur sehr schwache RNA-Protein-Bindungen für 42Sp50 nachgewiesen werden. *In vivo* ließen sich RNA-Protein-Interaktionen jedoch eindeutig nachweisen, und überdies eine Anreicherung bestimmter lokalisierender RNAs demonstrieren. Möglicherweise bindet 42Sp50 nicht direkt an die zu lokalisierenden RNAs, sondern benötigt dafür einen Adaptor. Dafür kommt im Prinzip jedes Protein in Frage, das spezifisch an lokalisierte RNAs bindet. In dieser Arbeit wurden RNA-abhängige Interaktionen von 42Sp50 mit Vg1RBP, ElrA und Staufen nachgewiesen. Bisher wurde nur für Vg1RBP und Staufen eine vegetale-kortikale Lokalisierung in *Xenopus* Oozyten gezeigt (Zhang *et al.* 1999a; Yoon und Mowry 2004).

Um herauszufinden, ob 42Sp50 in *Xenopus* Oozyten für die Verankerung vegetativ lokalisierter RNAs am kortikalen Aktin-Skelett von Bedeutung ist, sind weitere Experimente durchzuführen. Zunächst ist zu klären, ob 42Sp50 in Stadium III und IV Oozyten exprimiert ist. Falls dies nicht der Fall ist, wäre es vorstellbar, dass 42Sp50 früh lokalisierte RNAs verankert, diese Aufgabe dann aber für die spät lokalisierten RNAs von EF-1 $\alpha$ O übernommen wird. Außerdem ist zu prüfen, ob 42Sp50 (bzw. EF-1 $\alpha$ O) an F-Aktin bindet und am Kortex lokalisiert ist. Nachdem der Aktin-bindende Bereich von 42Sp50 eingegrenzt wurde, kann ein dominant-negatives Konstrukt hergestellt und überexprimiert werden, um festzustellen, ob dies die Lokalisierung von Reporter-RNAs beeinflusst.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass als potentielle Lokalisationsfaktoren drei Proteine isoliert wurden, die in sehr großer Kopienzahl in der Oozyte vorliegen. Jedes dieser Proteine bindet an RNAs und zwar ungeachtet dessen, ob die RNA lokalisiert wird oder nicht. Für EF-1 $\alpha$  konnte jedoch gezeigt werden, dass es mit einigen lokalisierenden RNAs bevorzugt assoziiert. Allen drei Proteinen wird eine Funktion bei der Translation von mRNAs zugeschrieben, wobei ePAB und FRGY-2B eine regulatorische Rolle spielen, während 42Sp50 als tRNA- und rRNA-Speicherprotein fungiert bzw. tRNAs zum Ribosom transportiert.

Weitere bekannte Proteine des Transportkomplexes, wie z.B. Staufen oder VgRBP60, wurden wahrscheinlich aufgrund ihrer geringen Menge in der Oozyte nicht identifiziert.

Die Identifizierung der oben genannten Proteine spricht dafür, dass Vg1RBP auch Teil nichtlokalisierender RNP-Komplexe ist. Welche Funktion es dort ausführen könnte, ist derzeit nicht geklärt. Für das homologe Protein ZBP1 wurde eine Rolle in

der Regulierung der Translation und der mRNA-Stabilität unter Stress vorgeschlagen (Huttelmaier *et al.* 2005; Stohr *et al.* 2006). Ob Vg1RBP diese oder ähnliche Funktionen auch in *Xenopus* Oozyten oder sogar innerhalb des Lokalisationskomplexes ausführt, ist bisher nicht bekannt.

### 4.3. Funktionsanalyse vegetal lokalisierter Klone

Die intrazelluläre, asymmetrische Verteilung von mRNA ist ein effektiver Mechanismus, um die Expression von Proteinen lokal zu begrenzen. Vor allem in der frühen Embryogenese von *Drosophila* und *Xenopus laevis* ist die räumlich begrenzte Expression bestimmter Proteine, die durch die Lokalisierung ihrer mRNAs in der Oozyte erreicht wird, von entscheidender Bedeutung für die Spezifizierung der Körperachsen, die Keimblattdeterminierung und die Bildung von Keimzellen (King *et al.* 2005).

In einer früheren Arbeit ist eine Vielzahl neuer, vegetal lokalisierter mRNAs in der *Xenopus* Oozyte identifiziert worden (Horvay 2005). Ein Teil dieser RNAs assoziiert mit dem Keimplasma und könnte deshalb Funktionen in der Entwicklung primordialer Keimzellen ausüben. Die restlichen RNAs spielen wahrscheinlich während der Embryogenese eine Rolle in den frühen Musterbildungsprozessen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden neu identifizierte, spät lokalisierte RNAs ausgewählt und die Expression ihrer Proteine entweder durch Injektion von Morpholino-Oligonukleotiden inhibiert oder durch mRNA-Injektion heraufreguliert.

#### 4.3.1. Wahl der verwendeten Methodik

Es gibt mehrere Möglichkeiten, um die Expression von Proteinen in *Xenopus* Embryonen zu inhibieren. Die Injektion spezifischer *antisense* Morpholino-Oligonukleotide in sehr frühe Teilungsstadien kann einerseits die Translation inhibieren, wenn sich das Oligonukleotid in der Nähe des Startkodons an die entsprechende Ziel-RNA anlagert und sie für die Translationsmaschinerie unzugänglich macht. Andererseits kann durch Anlagerung an Intron-Exon-Übergänge das Spleißen der prä-RNA verhindert werden (Partridge *et al.* 1996; Draper *et al.* 2001). Allerdings blockiert diese Methode die Proteinsynthese nur im Embryo, ist aber nicht geeignet, wenn das Protein bereits in der Oozyte bzw. im Ei vorhanden ist. Außerdem muß stets bedacht werden, dass mögliche Pseudoallele die Funktion der herunterregulierten Proteine kompensieren können.

Wird das Protein bereits in der Oozyte oder im Ei synthetisiert, muss die entsprechende RNA durch Injektion von *antisense* Oligonukleotiden in den Oozyten zerstört werden. Die Eireifung wird durch Zugabe von Progesteron ausgelöst und die gereiften Oozyten mittels *Host Transfer* befruchtet. Dafür müssen sie markiert und in einen Empfängerfrosch implantiert werden. Dieser Frosch legt die behandelten Eier gemeinsam mit eigenen Eiern ab, und sie werden anschließend *in vitro* befruchtet (Heasman *et al.* 1991).

Diese Methode ist technisch sehr anspruchsvoll und für ein *Screening* mehrerer RNAs daher nur bedingt geeignet. Da außerdem für die meisten der hier untersuchten Proteine keine Information über den Zeitpunkt ihrer Synthese vorlag, wurde die Injektion von Morpholino-Oligonukleotiden zur Inhibierung der Proteinexpression durchgeführt.

Um eine Überexpression zu erreichen, wurde die mRNA in die Embryonen injiziert. Die Injektion in den animalen Pol der Blastomeren hatte zusätzlich auch eine Misslokalisierung der Proteinexpression zur Folge.

#### 4.3.2. Zusammenfassung des funktionellen Screens

Es wurden mehrere neue, vegetativ lokalisierte mRNAs in einer funktionellen Übersichtsanalyse auf ihre mögliche Bedeutung in der frühen Embryogenese hin untersucht. Ziel des Screens war die Identifizierung interessanter Klone für eine detailliertere Untersuchung.

Die Herunterregulation der Proteinexpression der *Velo*-Klone hatte unterschiedliche Auswirkungen auf die Entwicklung der Embryonen. Während einige Morpholinos keinen Effekt verursachten (*Velo7*, *Velo40*), wirkten andere stark toxisch (*Velo8*, 22, 76). Die Injektion der Morpholinos gegen *Velo22*, 39 und 76 hatte zudem eine Verkürzung der antero-posterioren Achse zur Folge, was auf eine wichtige Rolle dieser *Velo*-Klone in der frühen Embryogenese hinweist (Abb. 3.18). Um die Spezifität dieser Effekte zu überprüfen, sind Rettungsexperimente durchzuführen, indem Morpholino-insensitive RNAs ko-injiziert werden, die die jeweiligen *Velo* Protein kodieren.

Die mangelnden Auswirkungen der Morpholinos gegen *Velo7* und 40 können einerseits von einer unvollständigen Translationsinhibierung herrühren, andererseits dadurch bedingt sein, dass die Proteine maternal translatiert wurden und zum Zeitpunkt der Morpholino-Injektion im Embryo bereits vorlagen (Claussen, unveröffentlichte Daten, (Duncan *et al.* 2001). Hier könnte ein *Host Transfer*

Experiment Auskunft über die Auswirkungen der Herunterregulation der Proteinsynthese geben.

Über den Zeitpunkt der Expression der anderen Proteine liegen keine Informationen vor. Es ist jedoch durchaus vorstellbar, dass noch weitere vegetativ lokalisierte RNAs bereits in der Oozyte translatiert werden. Dies wurde z.B. auch schon für *XDazl* und *Vg1* gezeigt (Dale *et al.* 1989; Mita und Yamashita 2000; Colegrove-Otero *et al.* 2005). Es wäre höchst interessant herauszufinden, ob auch die maternal exprimierten Proteine am vegetativen Kortex lokalisiert oder sogar verankert sind, d.h. ob die Lokalisierung der RNA auch eine spezifische räumliche Proteinverteilung in der Oozyte zur Folge hat. Lokalisierte Proteine könnten nicht nur in der frühen Embryogenese, sondern auch während der komplexen Vorgänge der Eireifung oder in der Regulation weiterer (lokalisierter) RNA-Moleküle eine Rolle spielen. Bisher gibt es dafür allerdings keine experimentellen Anhaltspunkte.

Wenn der Ort der Proteinexpression im Embryo für die korrekte Ausübung der Funktion von Bedeutung ist, dann sollte eine ektopische Expression Folgen für die Embryogenese haben. Um diese Hypothese für die hier vorliegenden *VeLo*-Klone zu überprüfen, wurden diese im animalen Pol der Embryonen überexprimiert. Dies hatte allerdings bei den meisten *VeLo*-Klonen keine Auswirkungen auf die Entwicklung der Embryonen (Abb. 3.20). Möglicherweise ist hier der Ort der Überexpression genauer einzuschränken. So hat die Expression von *VegT* im animalen Pol Gastrulationsdefekte zur Folge, wird *VegT* aber in den ventralen Zellen überexprimiert, verursacht es die Ausbildung einer zweiten Körperachse (Zhang und King 1996). Durch eine präzisere Beschränkung des Expressionsortes konnte in dieser Studie also die Funktion von *VegT* näher eingegrenzt werden.

Im Folgenden soll nun auf die zwei auffälligen Phänotypen der funktionellen Übersichtsanalyse, nämlich die Achsenverkürzung durch Herabregulation der Expression von *VeLo22*, *39* und *76* und den Zellteilungsdefekt durch Überexpression von *VeLo40/Pix3* und in diesem Zusammenhang durchgeführte weitere Experimente eingegangen werden.

#### **4.3.3. Expressionsinhibierung von *VeLo22*, *39* und *76* führt zu Achsenverkürzungen**

Die Inhibierung der Proteinexpression führte bei drei der untersuchten Klone zu einer Verkürzung der anterior-posterioren Körperachse (Abb. 3.18). Es können jedoch phänotypische Unterschiede zwischen den behandelten Embryonen festgestellt werden.

Den auffälligsten Phänotyp zeigten Embryonen, in denen die Expression von *Velo22* inhibiert wurde. Da der Morpholino *in vitro* eine sehr effektive Translationsblockade bewirkte, ist der Effekt in den Embryonen wahrscheinlich tatsächlich auf den Verlust des *Velo22* Proteins zurückzuführen. Zunächst wirkte der Morpholino sehr toxisch, so dass nur ca. ein Viertel der behandelten Embryonen bis zum Schwanzknospen-Stadium überlebte. Die überlebenden Embryonen zeigten nicht nur eine verkürzte Achse, sondern auch verkleinerte Kopfstrukturen ohne Augen, sowie eine verminderte Pigmentierung. Die Zementdrüse ist dagegen intakt (Abb. 3.18C, F). Da keine Vergrößerung der Bauchstrukturen zu beobachten ist, kann allerdings nicht von einer Ventralisierung gesprochen werden. Um herauszufinden, ob sich die beobachteten Defekte auf Vorgänge während der Gastrulation oder Neurulation zurückführen lassen, muss die Entwicklung der Embryonen während dieser Stadien genauer untersucht werden. *Velo22* kodiert ein Rab11-interagierendes Protein, welches wahrscheinlich am Transport von Vesikeln beteiligt ist. Möglicherweise wird durch die Expressionsinhibierung von *Velo22* die Sekretion von Signalmolekülen gestört.

Auch die Injektion von Morpholinos gegen *Velo39* bewirkte eine Achsenverkürzung in den behandelten Embryonen. Abgesehen davon sind in diesem Fall jedoch alle Strukturen, insbesondere der Kopf, vollständig ausgebildet (Abb. 3.18G, J), so dass der Phänotyp auch durch eine verlangsamte Entwicklung hervorgerufen werden könnte. Da der Morpholino *in vitro* keine Wirksamkeit zeigte, ist außerdem fraglich, inwieweit die Synthese von *Velo39* Protein im Embryo tatsächlich inhibiert wurde.

*Velo76* kodiert für ein *Spire*-ähnliches Protein, welches eine Rolle in der Aktinfilament-Synthese spielt. *Spire* ist zunächst in *Drosophila* als maternaler Effekt-Lokus identifiziert worden, der an der Spezifikation sowohl der anterior-posterioren als auch der dorso-ventralen Achse beteiligt ist (Manseau und Schupbach 1989). Allerdings ist die *Spire*-RNA selbst in der *Drosophila* Oozyte nicht lokalisiert, vielmehr ist *Spire* als Aktin-assoziiertes Protein an der Lokalisierung von anderen RNAs beteiligt (Pring *et al.* 2003).

Im Verlauf dieser Arbeit wurde *Velo76* als *Eg6* veröffentlicht (Le Goff *et al.* 2006). Neben der vegetalen Keimplasma-spezifischen RNA-Lokalisierung wurde gezeigt, dass die RNA während der Eireifung polyadenyliert wird, im Embryo jedoch wieder ohne Poly(A)-Schwanz vorliegt. Außerdem wird eine Funktion in der Organisation des Aktin-Skeletts demonstriert.

Interessanterweise ist die RNA im Embryo Keimplasma-assoziiert, obwohl sie über den späten Transportweg lokalisiert wird. Der Morpholino gegen *Velo76* wirkte stark toxisch, so dass nur wenige Embryonen bis zum Erreichen des Schwanzknospenstadiums überlebten. Diese entwickelten sich bedeutend langsamer als die Kontrollembryonen und zeigten einen deformierten Phänotyp mit stark verkürzter anterior-posterioren Achse. Ob dies durch eine Störung der Aktinfilament-Regulierung verursacht wurde, ist noch zu klären. Die Keimplasma-Assoziation lässt vermuten, dass *Velo76* auch eine Rolle in der Bildung primordialer Keimzellen spielen könnte.

#### 4.3.4. Velo 40 / Plx3

*Velo40* ist eine intermediär lokalisierte mRNA, welche für *Xenopus* Polo-Kinase 3 (Plx3), ein Mitglied der Familie der Polo-ähnlichen Kinasen, kodiert. Die Polo-Familie besteht aus Serin/Threonin-Kinasen, zu deren Substraten u.a. Cdc25C gehört und die Zellzyklus-aktivierend wirken (Qian *et al.* 1998), wobei Plx1 den Austritt aus der M-Phase kontrolliert (Descombes und Nigg 1998).

Die Überexpression von *Velo40* verursachte eine Zellzyklusblockade in Blastula-Embryonen, die zum Tod der injizierten Embryonen führte. Die Expression einer Kinase-inaktiven Variante von *Velo40* hatte dagegen keinen Effekt auf die Zellteilung. Die Injektion des Morpholinos gegen *Velo40* führte nicht zu morphologischen Veränderungen. Der Grund dafür ist wahrscheinlich in der frühen Translation der mRNA zu finden.

Plx3 ist ebenso wie Plx1 bereits in der Oozyte als Protein vorhanden und wird während der Eireifung gleichmäßig exprimiert (Duncan *et al.* 2001). Über die Proteinexpression während der frühen Embryogenese gibt es zwar bisher keine Angaben, jedoch kann im Zweizell-Embryo durch *Whole Mount In Situ* Hybridisierung die *Velo40* RNA nicht mehr detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die embryonale RNA-Expression setzt während der Gastrulation ein; zu diesem Zeitpunkt ist die *Velo40/Plx3* RNA im marginalen Bereich rund um den Blastoporus detektierbar (Duncan *et al.* 2001). Der injizierte Morpholino konnte also lediglich die Expression ab den Gastrula-Stadien inhibieren. Dagegen bleibt weiterhin unklar, ob *Velo40/Plx3* eine Rolle während der frühen embryonalen Zellteilungen spielt.

Interessanterweise ist zwar die *Velo40/Plx3* RNA zwar vegetal lokalisiert, die *Plx1* RNA ist dagegen ubiquitär in der Oozyte verteilt. Die Lokalisierung der RNAs könnte durchaus funktionelle Unterschiede der beiden Proteine widerspiegeln.

Duncan *et al.* hatten die drei Polo-Kinasen Plx1, Plx2 und Plx3 hinsichtlich ihrer Rolle in der Reifung von *Xenopus* Oozyten untersucht und festgestellt, dass die Überexpression aller drei Kinasen zu einer Aktivierung der Eireifung, d.h. der meiotischen Zellteilung führt, die Expression nicht-funktioneller Proteine dagegen zu einer Inhibierung (Duncan *et al.* 2001). Diese scheinbare funktionelle Redundanz kann auch experimentell bedingt sein, d.h. Plx2 und Plx3 könnten unter Überexpressionsbedingungen die Funktion von Plx1 einfach imitieren. Um festzustellen, ob Plx3 tatsächlich eine Aufgabe während der Eireifung erfüllt, muss seine Expression in der Oozyte durch die Injektion von *antisense* Oligonukleotiden herunterreguliert und anschließend der Effekt auf die Reifung analysiert werden.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass *Velo40/Plx3* in dieser Arbeit im Embryo ebenfalls überexprimiert wurde, hier aber ein gegensätzlicher Phänotyp zu beobachten war. Obwohl die Familie der Polo-Kinasen zu den Zellzyklus-Aktivatoren gezählt wird, inhibiert *Velo40/Plx3* den Zellzyklus in *Xenopus* Embryonen. Auch in der Literatur sind Hinweise auf eine von der Zellzyklus-Aktivierung abweichende Funktion für die Polo-Kinase 3 zu finden. So findet man die Expression von *Plk3* in Karzinomzellen herunterreguliert (Ando *et al.* 2004; Li *et al.* 2005). *Plk3* wirkt Apoptose-aktivierend und inhibiert die Koloniebildung von Zellen (Conn *et al.* 2000; Li *et al.* 2005). Außerdem phosphoryliert es p53 und Chk2, was zum Zellzyklus-Arrest und zum Eintritt der Zelle in die Apoptose führen könnte (Xie *et al.* 2001; Bahassi *et al.* 2002).

Die murine Form von *Plk3* wurde ursprünglich als FGF-induzierbare Kinase (Fnk) identifiziert (Donohue *et al.* 1995). Interessanterweise überlappt während der Gastrulation und der frühen Neurulation das Expressionsmuster von *Plx3* mit der Expressionsdomäne von *eFGF* (Isaacs *et al.* 1995; Duncan *et al.* 2001). Es wäre daher interessant herauszufinden, ob *Plx3* auch im *Xenopus* Embryo ein Zielgen der FGF-Signaltransduktionskaskade ist und welche Bedeutung dies für die Embryogenese hat.

Inwieweit die Funktion von *Velo40/Plk3* in der *Xenopus* Oozyte bzw. im frühen Embryo die vegetative Lokalisierung der mRNA erfordert, liegt bislang im Dunkeln. Um diesen Aspekt näher zu beleuchten, müsste zunächst überprüft werden, ob das Protein auch am vegetalen Oozyten-Kortex und später in den vegetativen Zellen des frühen Embryos angereichert ist. Auch ist zu klären, ob *Plk3* während der ersten Teilungsstadien tatsächlich exprimiert ist, oder ob sich die Funktion des maternalen Proteins auf Vorgänge in der Oozyte (wie z.B. der Eireifung) beschränkt.

#### 4.4. Anreicherung lokalisierter mRNAs in den primordialen Keimzellen

Sowohl in Zebrafisch als auch in *Xenopus* sind RNAs identifiziert worden, die spezifisch in den primordialen Keimzellen angereichert und stabilisiert werden, während sie im Soma degradiert werden (Kopranner *et al.* 2001; Kataoka *et al.* 2006; Koebernick *et al.* Manuskript eingereicht). Es gibt Hinweise, dass die somatische Degradation über mikro-RNAs vermittelt wird (Giraldez *et al.* 2006). Die *Xenopus* RNAs, die über diese Strategie in Keimzellen angereichert werden (*XDead end* und *XDEADSouth*), liegen in der Oozyte vegetativ lokalisiert und im Embryo Keimplasma-assoziiert vor (MacArthur *et al.* 2000; Horvay *et al.* 2006). In beiden mRNAs überlappt das minimal benötigte Element für die Keimzellanreicherung mit dem Lokalisationselement für den Transport zum vegetativen Pol der Oozyte (Kataoka *et al.* 2006; Koebernick *et al.* Manuskript eingereicht). Um zu überprüfen, ob dies auch für andere, Keimplasma-assoziierte RNAs der Fall ist, wurden die Lokalisationselemente von *XDazl*, *Xcat2* und *Xpat*, sowie die 3'UTR von *XPace4* in den vegetativen Pol von Zweizell-Embryonen injiziert und die Lokalisation im Schwanzknospenstadium durch *Whole Mount In Situ* Hybridisierung überprüft.

Dabei zeigte sich, dass alle überprüften Fragmente sowohl im Soma degradiert, als auch effizient in den Keimzellen angereichert werden. Einzig die Anreicherung der *XPace4* 3'UTR konnte nur in wenigen Embryonen beobachtet werden (Abb. 3.24). Es könnte hier also ein genereller Mechanismus vorliegen, den sich verschiedene RNAs zunutze machen, um räumliche Proteinexpression in einem mehrzelligen Organismus posttranskriptional zu kontrollieren.

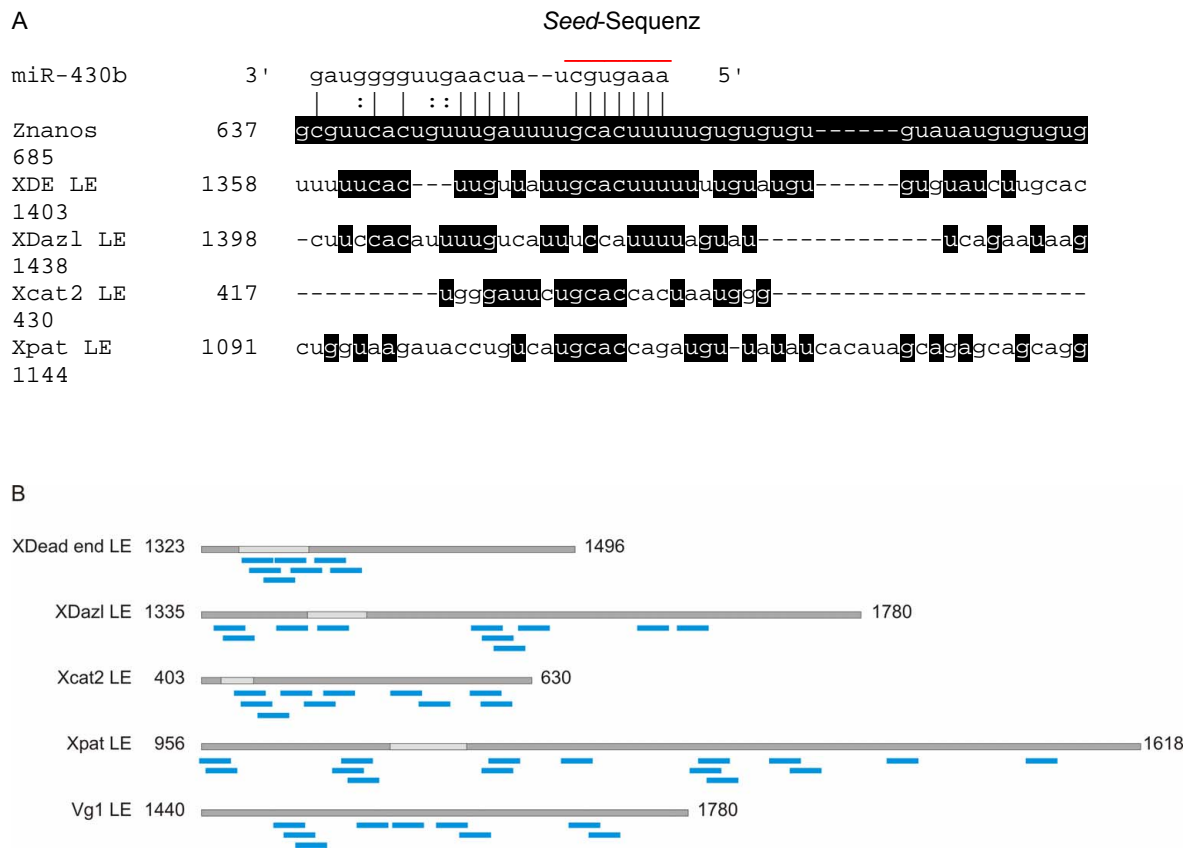
Im Zebrafisch regulieren mikroRNAs der miR-430 Familie die Polyadenylierung und den Abbau maternaler RNA in somatischen Zellen (Giraldez *et al.* 2006; Mishima *et al.* 2006). Die Mitglieder der miR-430 Familie werden mit Beginn der zygotischen Transkription exprimiert. Damit fällt die Stilllegung und Degradation maternaler RNAs zeitlich mit der Expression zygotischer Gene zusammen (Giraldez *et al.* 2006). Im *Xenopus* Embryo sind bestimmte mikroRNAs bereits im Stadium 8, also noch der Midblastula-Transition nachweisbar, andere treten mit Einsetzen der Gastrulation auf (Watanabe *et al.* 2005; Martello *et al.* 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Abbau injizierter Reporter-RNA mit der Gastrulation beginnt und bis zum Ende der Neurulation abgeschlossen ist (Abb. 3.25). Dieses zeitliche Muster entspricht der Hypothese von Giraldez *et al.*, wonach zygotische mikroRNAs den raschen Abbau maternaler Transkripte mit dem Einsetzen der zygotischen Transkription gewährleisten (Giraldez *et al.* 2006). Dass die Degradation der Reporter-RNA verhältnismäßig langsam verläuft, kann daran liegen, dass ein Vielfaches der endogenen RNA injiziert



wurde. Interessanterweise sind viele mikro-RNAs auch in *Xenopus* Oozyten nachweisbar (Watanabe *et al.* 2005), bislang ist aber nicht geklärt, welche Aufgaben sie dort übernehmen und an welche Ziel-RNAs sie binden.

Da die Zebrafisch *nanos-1* 3'UTR ebenfalls eine Keimzell-spezifische Anreicherung vermittelt (Koprunner *et al.* 2001), wurde ein Sequenzvergleich zwischen *nanos* und dem *XDead end* Lokalisationselement durchgeführt (Koebernick *et al.* Manuskript eingereicht). Dabei konnte ein Bereich eingegrenzt werden, in dem nicht nur beide RNAs eine große Homologie aufweisen, sondern auch eine Bindungsstelle für die Zebrafisch mikroRNA 430b identifiziert wurde (Abb. 4.2A, Mishima *et al.* 2006). Die Mutation dieser Region in der *XDead end* RNA führt zu einem Verlust der somatischen Degradation. Desweiteren kann der somatische RNA-Abbau auch durch Ko-Injektion eines Morpholinos inhibiert werden, welcher sich spezifisch an diesen Bereich anlagert (Koebernick *et al.* Manuskript eingereicht). Damit wird die Vermutung, dass mikroRNAs die Stabilität von *XDead end* im *Xenopus* Embryo kontrollieren, weiter untermauert. Welche mikroRNAs konkret den Abbau von *XDead end* bzw. *XDEADSouth* in somatischen Zellen vermitteln könnten, ist bisher nicht geklärt.

Um zu überprüfen, ob auch die Lokalisationselemente der anderen analysierten RNAs diese mikroRNA Bindungsstelle besitzen, wurde der Sequenzvergleich ausgeweitet (Abb. 4.2A). Obgleich ein gewisses Maß an Homologie zu finden ist, enthalten weder die Lokalisationselemente von *XDazi*, *Xcat2*, *Xpat* noch die *XPace4* 3'UTR die in *XDead end* gefundene sogenannte *Seed*-Sequenz, also 6 bis 7 Nukleotide (meist Nukleotid 2 bis 7) die perfekt an das 5' Ende der mikroRNA binden (Brennecke *et al.* 2005). Da jedoch sowohl im Lokalisationselement von *XDead end*, als auch in den anderen untersuchten RNAs weitere potentielle mikro-RNA Zielsequenzen vorhanden sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch diese RNAs über denselben Mechanismus, aber andere mikro-RNAs in den somatischen Zellen degradiert werden (Abb. 4.2B, K. Koebernick, unveröffentlichte Daten). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass z.B. auch das *Vg1* Lokalisationselement, das im Soma nicht degradiert wird, Bindungsstellen für mikro-RNAs besitzt (Abb. 4.2B, Koebernick *et al.* Manuskript eingereicht).



**Abb. 4.2: Die Lokalisationselemente Keimzell-spezifischer und –unspezifischer mRNAs enthalten mehrere potentielle mikroRNA-Bindungsstellen.**

(A) Sequenzvergleich zwischen der Zebrafisch nanos RNA und verschiedenen *Xenopus* Lokalisationselementen. Die miR-430b-Bindungsstelle wurde von Mishima et al. ermittelt (Mishima *et al.* 2006). Konventionelle Basenpaarungen sind durch einen senkrechten Strich markiert, u – g Basenpaarungen sind mit einem Doppelpunkt gekennzeichnet. Im Sequenzvergleich sind identische Nukleotide schwarz unterlegt, und fehlende Basen durch – ersetzt. Die jeweiligen Nukleotidpositionen sind vor bzw. hinter dem jeweiligen Fragment angegeben. Die *Seed*-Sequenz ist oberhalb der mikro-RNA 430b durch einen roten Strich gekennzeichnet (Koebernick *et al.* Manuskript eingereicht). (B) Potentielle mikro-RNA-Bindungsstellen innerhalb der *Xenopus* Lokalisationselemente. Die Lokalisationselemente wurden mit Hilfe des Programms MiRanda (Enright *et al.* 2003) mit einer *Xenopus tropicalis* mikro-RNA Datenbank verglichen (Betel *et al.* 2008). Die potentiellen mikroRNA-Bindungsstellen wurden durch blaue Balken dargestellt. Es wurden nur Bindungsstellen abgebildet, in denen die *Seed*-Sequenz (Nukleotide 2 – 7) der mikro-RNA zu 100% an die mRNA bindet. In hellgrau sind die in (A) dargestellten Sequenzbereiche gekennzeichnet. Die Zahlen geben die genaue Nukleotidposition der Lokalisationselemente an (Abb. erstellt nach K. Koebernick, unveröffentlichte Daten).

Auf welche Weise wird nun die differentielle RNA-Stabilität im Embryo bewirkt? Hier sind mehrere Szenarien vorstellbar. Erstens könnten die entsprechenden mikro-RNAs spezifisch in somatischen, nicht aber in Keimzellen exprimiert werden. Zweitens könnten die Ziel-RNAs in den Keimzellen für mikro-RNAs unzugänglich gelagert werden. Drittens ist es möglich, dass Proteine an die Ziel-RNAs binden und diese vor der Anlagerung der mikro-RNA bzw. vor der Degradationsmaschinerie schützen. Diese Proteine könnten gleichzeitig, abhängig oder unabhängig von der mikro-RNA-vermittelten Regulation, die Translation der RNAs kontrollieren, so dass eine Keimzell-spezifische Expression erreicht wird.

Drei Proteine wurden in diesem Kontext auf die Eigenschaft, das *XDead end* Lokalisationselement zu binden, untersucht. Als Positivkontrolle wurde *Prrp* verwendet, ein Faktor, der wahrscheinlich an der vegetativen Lokalisierung von RNAs in der Oozyte beteiligt ist (Zhao *et al.* 2001), und der sehr stark an das *XDead end* Lokalisationselement bindet (Horvay *et al.* 2006). *XDead end* selbst wurde untersucht, da es ein RNA-bindendes Protein ist und gezeigt wurde, dass es für die Entwicklung der Keimzellen benötigt wird (Horvay *et al.* 2006). Überdies ist im Zebrafisch bereits ein Zusammenhang zwischen mikroRNA-vermittelter Translationskontrolle und *Dead end* (*Dnd1*) etabliert. So verhindert die Bindung von *Dnd1* an eine Reporter-RNA die Anlagerung von mikroRNAs und die daraus resultierende translationale Reprimierung (Kedde *et al.* 2007). Schließlich wurde auch *XDazl* in die Analyse einbezogen, da es als Keimzell-spezifisches RNA-Bindeprotein translationsaktivierend wirkt und ebenfalls für die Entwicklung der Keimzellen von Bedeutung ist (Houston und King 2000; Collier *et al.* 2005).

Es konnte gezeigt werden, dass alle drei Proteine *in vitro* an das *XDead end* Lokalisationselement binden (Abb. 3.26). Allerdings bindet nur *XDazl* stärker an *XDead end* als an *Velo1* RNA, welche nicht Keimzell-spezifisch angereichert wird (K. Koebernick, unveröffentlichte Daten). Weder von *Prrp* noch von *XDead end* ist bekannt, wann und wo die Proteine im Embryonen exprimiert werden. *XDead end* konnte zwar mit einem spezifischen Antikörper in den primordialen Keimzellen in Embryonen der Schwanzknospenstadien nachgewiesen werden (S. Koch, unveröffentlichte Daten), wann genau die Expression von *XDead end* beginnt, ist aber noch unklar.

*XDazl* wurde im Gegensatz zu den anderen beiden Proteinen in den primordialen Keimzellen von Blastula-, Gastrula- und Neurula-Embryonen, also während der mikro-RNA-vermittelten somatischen RNA-Degradation, nachgewiesen (Houston und King 2000) und kommt somit als "Schutzfaktor" in Frage. Die *XDazl* mRNA ist sowohl in den Oozyten als auch im frühen Embryo im Keimplasma zu finden. Überdies ist das *XDazl*

Protein bereits in den Oozyten exprimiert und könnte sich demzufolge schon vor der Befruchtung an die Keimplasma-assoziierten RNAs (auch seine eigene) anlagern.

Kürzlich wurde gezeigt, dass auch Proteine der Elav-Familie an die *Seed*-Region in der XDead end 3'UTR binden und damit die Anlagerung von mikroRNAs an dieser Stelle verhindern könnten (Koebernick *et al.* Manuskript eingereicht). Die Überexpression dieser Proteine im Embryo inhibiert überdies die somatische Degradation von Reporter-RNAs. Interessanterweise scheinen Elav-Proteine auch an der RNA-Lokalisierung in Oozyten beteiligt zu sein (Arthur *et al.* Manuskript eingereicht). Es ist also vorstellbar, dass diese Proteine im Rahmen der vegetativen RNA-Lokalisierung an ihre Ziel-RNAs binden und diese Bindung bis in die Embryogenese beibehalten wird. Da die RNAs mit dem Keimplasma assoziieren, werden auch die gebundenen Elav-Proteine dort angereichert und erhalten auf diese Weise schließlich eine Keimzell-spezifische Lokalisierung (Koebernick *et al.* Manuskript eingereicht). Bisher konnten die Proteine allerdings nicht in den primordialen Keimzellen nachgewiesen werden, so dass weitere Untersuchungen notwendig sind, um diese Hypothese zu beweisen.

Es bleibt zu erörtern, warum der Embryo neben der vegetativen RNA-Lokalisierung innerhalb der Oozyte einen zweiten Mechanismus benötigt, um bestimmte RNAs in den primordialen Keimzellen anzureichern. Mit der Verankerung der RNAs im Keimplasma und der daraus resultierenden passiven Verteilung auf die Keimzell-Vorläufer liegt bereits eine effektive Anreicherungsstrategie vor.

Es ist vorstellbar, dass ein geringer Anteil dieser RNAs trotzdem auf Zellen verteilt wird, die zu geringe Mengen an Keimplasma erhalten, um als Keimzellen spezifiziert zu werden. Die Translation der Keimzell-spezifischen RNAs in somatischen Zellen könnte negative Folgen für die Zellen oder sogar den ganzen Embryo haben. In diesem Szenario wäre ein zweiter Kontrollschritt in den somatischen Zellen notwendig, durch den gewährleistet wird, dass diese absolut frei von Keimzell-Determinanten sind.

Andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass in *Xenopus* wie im Zebrafisch maternale RNAs mit Einsetzen der zygotischen Genexpression global abgebaut werden (Giraldez *et al.* 2006). Die somatische Degradation der Keimzell-spezifischen RNAs wäre dann kein Sonderfall, sondern die Regel.

In beiden Fällen müssen sich die Keimzellen bezüglich dieser mikroRNA-vermittelten RNA-Degradation von somatischen Zellen unterscheiden, entweder durch Unterschiede in der Degradationsmaschinerie oder durch spezielle Schutzmechanismen, wie z.B. durch bestimmte maskierende RNA-Bindeproteine.

## 5. Zusammenfassung

Die Lokalisierung von mRNA-Molekülen ist eine wichtige Strategie zur Schaffung intrazellulärer Asymmetrien und spielt z.B. eine wichtige Rolle in der frühen Embryogenese von *Xenopus laevis*. Die Aufklärung dieses molekularen Mechanismus und die funktionelle Analyse lokalisierter RNAs tragen somit zum Verständnis der frühen Musterbildungsprozesse im Embryo bei.

Mit dem Ziel, neue RNA-Lokalisationsfaktoren zu isolieren, wurden transgene Frösche generiert, die unter der Kontrolle eines Oozyten-spezifischen Promotors eine Epitop-markierte Form des bekannten Transportfaktors Vg1RBP exprimieren sollten. Diese sollte dann gemeinsam mit Interaktionspartnern affinitätschromatographisch aufgereinigt werden. Die transgenen Tiere wurden auf die Integration der Fremd-DNA und die Expression dieses Proteins hin analysiert. Obwohl die DNA-Integration nachweislich stattgefunden hat, wurde das rekombinante Protein in den Oozyten der Tiere nicht produziert.

Die Proteinexpression wurde durch eine alternative Strategie erreicht und die Aufreinigung durchgeführt. Die Bindungspartner wurden massenspektrometrisch identifiziert und anschließend unter dem Aspekt der RNA-Lokalisierung funktionell charakterisiert. Dabei wurde gezeigt, dass die Proteine nicht nur mit Vg1RBP, sondern auch mit anderen bekannten Transportfaktoren RNA-abhängig assoziieren. Außerdem konnte für eines der identifizierten Proteine eine spezifische Anreicherung lokalisierter RNAs nachgewiesen werden.

In einem weiteren Projekt wurden vegetativ lokalisierte mRNAs funktionell analysiert. Eine RNA, welche für Plx3 kodiert, wurde ausgewählt und detaillierter untersucht. Dabei zeigte sich, dass Plx3 innerhalb der Polo-Kinase-Familie wahrscheinlich eine spezifische Funktion ausführt.

Im Zusammenhang mit einem dritten Projekt wurde die Eigenschaft vegetativ lokalisierter und Keimplasma-assoziiierter RNAs untersucht, spezifisch in den primordialen Keimzellen angereichert und im Soma degradiert zu werden. Der Zeitraum der Degradation wurde eingegrenzt und Keimzell-spezifische Proteine auf eine mögliche Funktion als Degradationsschutzfaktor hin untersucht.

## 6. Literaturverzeichnis

- Agius, E., Oelgeschlager, M., Wessely, O., Kemp, C., und De Robertis, E.M. 2000. Endodermal Nodal-related signals and mesoderm induction in *Xenopus*. *Development* **127**: 1173-1183.
- Allen, B.G., und Weeks, D.L. 2005. Transgenic *Xenopus laevis* embryos can be generated using phiC31 integrase. *Nat Methods* **2**: 975-979.
- Allison, R., Czaplinski, K., Git, A., Adegbenro, E., Stennard, F., Houliston, E., und Standart, N. 2004. Two distinct Staufn isoforms in *Xenopus* are vegetally localized during oogenesis. *RNA* **10**: 1751-1763.
- Ando, K., Ozaki, T., Yamamoto, H., Furuya, K., Hosoda, M., Hayashi, S., Fukuzawa, M., und Nakagawara, A. 2004. Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. *J Biol Chem* **279**: 25549-25561.
- Arthur, P.K., Koch, S., Tarbashevich, K., Jahn, O., Claußen, M., und Pieler, T. Manuskript eingereicht. Participation of *Xenopus* Elr-type proteins in vegetal mRNA localization during oogenesis.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A., und Struhl, K. 2002. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience, Somerset.
- Bahassi el, M., Conn, C.W., Myer, D.L., Hennigan, R.F., McGowan, C.H., Sanchez, Y., und Stambrook, P.J. 2002. Mammalian Polo-like kinase 3 (Plk3) is a multifunctional protein involved in stress response pathways. *Oncogene* **21**: 6633-6640.
- Bashirullah, A., Cooperstock, R.L., und Lipshitz, H.D. 1998. RNA localization in development. *Annu Rev Biochem* **67**: 335-394.
- Bassell, G.J., Powers, C.M., Taneja, K.L., und Singer, R.H. 1994. Single mRNAs visualized by ultrastructural in situ hybridization are principally localized at actin filament intersections in fibroblasts. *J Cell Biol* **126**: 863-876.
- Bell, A.C., und Felsenfeld, G. 1999. Stopped at the border: boundaries and insulators. *Curr Opin Genet Dev* **9**: 191-198.

- Berekelya, L.A., Ponomarev, M.B., Luchinskaya, N.N., und Belyavsky, A.V. 2003. *Xenopus* Germes encodes a novel germ plasm-associated transcript. *Gene Expr Patterns* **3**: 521-524.
- Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D.S., und Sander, C. 2008. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res* **36**: D149-153.
- Betley, J.N., Frith, M.C., Graber, J.H., Choo, S., und Deshler, J.O. 2002. A ubiquitous and conserved signal for RNA localization in chordates. *Curr Biol* **12**: 1756-1761.
- Betley, J.N., Heinrich, B., Vernos, I., Sardet, C., Prodon, F., und Deshler, J.O. 2004. Kinesin II mediates Vg1 mRNA transport in *Xenopus* oocytes. *Curr Biol* **14**: 219-224.
- Birsoy, B., Berg, L., Williams, P.H., Smith, J.C., Wylie, C.C., Christian, J.L., und Heasman, J. 2005. XPACE4 is a localized pro-protein convertase required for mesoderm induction and the cleavage of specific TGFbeta proteins in *Xenopus* development. *Development* **132**: 591-602.
- Birsoy, B., Kofron, M., Schaible, K., Wylie, C., und Heasman, J. 2006. Vg 1 is an essential signaling molecule in *Xenopus* development. *Development* **133**: 15-20.
- Bouvet, P., und Wolffe, A.P. 1994. A role for transcription and FRGY2 in masking maternal mRNA within *Xenopus* oocytes. *Cell* **77**: 931-941.
- Braddock, M., Muckenthaler, M., White, M.R., Thorburn, A.M., Sommerville, J., Kingsman, A.J., und Kingsman, S.M. 1994. Intron-less RNA injected into the nucleus of *Xenopus* oocytes accesses a regulated translation control pathway. *Nucleic Acids Res* **22**: 5255-5264.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., und Cohen, S.M. 2005. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* **3**: e85.

- Bubunencko, M., und King, M.L. 2001. Biochemical characterization of a cellular structure retaining vegetally localized RNAs in *Xenopus* late stage oocytes. *J Cell Biochem* **80**: 560-570.
- Bubunencko, M., Kress, T.L., Vempati, U.D., Mowry, K.L., und King, M.L. 2002. A consensus RNA signal that directs germ layer determinants to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* **248**: 82-92.
- Cahill, N.M., Friend, K., Speckmann, W., Li, Z.H., Terns, R.M., Terns, M.P., und Steitz, J.A. 2002. Site-specific cross-linking analyses reveal an asymmetric protein distribution for a box C/D snoRNP. *Embo J* **21**: 3816-3828.
- Chan, A.P., Kloc, M., und Etkin, L.D. 1999. *fatvg* encodes a new localized RNA that uses a 25-nucleotide element (FVLE1) to localize to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Development* **126**: 4943-4953.
- Chan, A.P., Kloc, M., Larabell, C.A., LeGros, M., und Etkin, L.D. 2007. The maternally localized RNA *fatvg* is required for cortical rotation and germ cell formation. *Mech Dev* **124**: 350-363.
- Chomczynski, P., und Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159.
- Claussen, M., Horvay, K., und Pieler, T. 2004. Evidence for overlapping, but not identical, protein machineries operating in vegetal RNA localization along early and late pathways in *Xenopus* oocytes. *Development* **131**: 4263-4273.
- Claussen, M., und Pieler, T. 2004. *Xvelo1* uses a novel 75-nucleotide signal sequence that drives vegetal localization along the late pathway in *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* **266**: 270-284.
- Clements, D., Friday, R.V., und Woodland, H.R. 1999. Mode of action of VegT in mesoderm and endoderm formation. *Development* **126**: 4903-4911.
- Colegrove-Otero, L.J., Devaux, A., und Standart, N. 2005. The *Xenopus* ELAV protein ElrB represses *Vg1* mRNA translation during oogenesis. *Mol Cell Biol* **25**: 9028-9039.



- Collier, B., Gorgoni, B., Loveridge, C., Cooke, H.J., und Gray, N.K. 2005. The DAZL family proteins are PABP-binding proteins that regulate translation in germ cells. *Embo J* **24**: 2656-2666.
- Conn, C.W., Hennigan, R.F., Dai, W., Sanchez, Y., und Stambrook, P.J. 2000. Incomplete cytokinesis and induction of apoptosis by overexpression of the mammalian polo-like kinase, Plk3. *Cancer Res* **60**: 6826-6831.
- Cote, C.A., Gautreau, D., Denegre, J.M., Kress, T.L., Terry, N.A., und Mowry, K.L. 1999. A Xenopus protein related to hnRNP I has a role in cytoplasmic RNA localization. *Mol Cell* **4**: 431-437.
- Czaplinski, K., Kocher, T., Schelder, M., Segref, A., Wilm, M., und Mattaj, I.W. 2005. Identification of 40LoVe, a Xenopus hnRNP D family protein involved in localizing a TGF-beta-related mRNA during oogenesis. *Dev Cell* **8**: 505-515.
- Czaplinski, K., und Mattaj, I.W. 2006. 40LoVe interacts with Vg1RBP/Vera and hnRNP I in binding the Vg1-localization element. *RNA* **12**: 213-222.
- Czaplinski, K., und Singer, R.H. 2006. Pathways for mRNA localization in the cytoplasm. *Trends Biochem Sci* **31**: 687-693.
- Dale, L., Matthews, G., und Colman, A. 1993. Secretion and mesoderm-inducing activity of the TGF-beta-related domain of Xenopus Vg1. *Embo J* **12**: 4471-4480.
- Dale, L., Matthews, G., Tabe, L., und Colman, A. 1989. Developmental expression of the protein product of Vg1, a localized maternal mRNA in the frog *Xenopus laevis*. *Embo J* **8**: 1057-1065.
- Descombes, P., und Nigg, E.A. 1998. The polo-like kinase Plx1 is required for M phase exit and destruction of mitotic regulators in *Xenopus* egg extracts. *Embo J* **17**: 1328-1335.
- Deshler, J.O., Highett, M.I., Abramson, T., und Schnapp, B.J. 1998. A highly conserved RNA-binding protein for cytoplasmic mRNA localization in vertebrates. *Curr Biol* **8**: 489-496.
- Deshler, J.O., Highett, M.I., und Schnapp, B.J. 1997. Localization of *Xenopus* Vg1 mRNA by Vera protein and the endoplasmic reticulum. *Science* **276**: 1128-1131.

- Dje, M.K., Mazabraud, A., Viel, A., le Maire, M., Denis, H., Crawford, E., und Brown, D.D. 1990. Three genes under different developmental control encode elongation factor 1-alpha in *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Res* **18**: 3489-3493.
- Donohue, P.J., Alberts, G.F., Guo, Y., und Winkles, J.A. 1995. Identification by targeted differential display of an immediate early gene encoding a putative serine/threonine kinase. *J Biol Chem* **270**: 10351-10357.
- dos Santos, G., Simmonds, A.J., und Krause, H.M. 2008. A stem-loop structure in the wingless transcript defines a consensus motif for apical RNA transport. *Development* **135**: 133-143.
- Draper, B.W., Morcos, P.A., und Kimmel, C.B. 2001. Inhibition of zebrafish *fgf8* pre-mRNA splicing with morpholino oligos: a quantifiable method for gene knockdown. *Genesis* **30**: 154-156.
- Driever, W., und Nusslein-Volhard, C. 1988. A gradient of bicoid protein in *Drosophila* embryos. *Cell* **54**: 83-93.
- Driever, W., und Nusslein-Volhard, C. 1989. The bicoid protein is a positive regulator of hunchback transcription in the early *Drosophila* embryo. *Nature* **337**: 138-143.
- Driever, W., Siegel, V., und Nusslein-Volhard, C. 1990. Autonomous determination of anterior structures in the early *Drosophila* embryo by the bicoid morphogen. *Development* **109**: 811-820.
- Dumont, J.N. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* **136**: 153-179.
- Duncan, P.I., Pollet, N., Niehrs, C., und Nigg, E.A. 2001. Cloning and characterization of Plx2 and Plx3, two additional Polo-like kinases from *Xenopus laevis*. *Exp Cell Res* **270**: 78-87.
- Durso, N.A., und Cyr, R.J. 1994a. Beyond translation: elongation factor-1a and the cytoskeleton. *Protoplasma* **180**: 99 - 105.
- Durso, N.A., und Cyr, R.J. 1994b. A calmodulin-sensitive interaction between microtubules and a higher plant homolog of elongation factor-1 alpha. *Plant Cell* **6**: 893-905.

- Enright, A.J., John, B., Gaul, U., Tuschl, T., Sander, C., und Marks, D.S. 2003. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol* **5**: R1.
- Evans, J.P., und Kay, B.K. 1991. Biochemical fractionation of oocytes. In *Methods Cell Biol.* Academic Press, San Diego.
- Ferrandon, D., Elphick, L., Nusslein-Volhard, C., und St Johnston, D. 1994. Stufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* **79**: 1221-1232.
- Forristall, C., Pondel, M., Chen, L., und King, M.L. 1995. Patterns of localization and cytoskeletal association of two vegetally localized RNAs, Vg1 and Xcat-2. *Development* **121**: 201-208.
- Frigerio, G., Burri, M., Bopp, D., Baumgartner, S., und Noll, M. 1986. Structure of the segmentation gene paired and the *Drosophila* PRD gene set as part of a gene network. *Cell* **47**: 735-746.
- Gautreau, D., Cote, C.A., und Mowry, K.L. 1997. Two copies of a subelement from the Vg1 RNA localization sequence are sufficient to direct vegetal localization in *Xenopus* oocytes. *Development* **124**: 5013-5020.
- Gilbert, S.F. 2003. *Developmental Biology*, 7th ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Ginsberg, A.M., King, B.O., und Roeder, R.G. 1984. *Xenopus* 5S gene transcription factor, TFIIIA: characterization of a cDNA clone and measurement of RNA levels throughout development. *Cell* **39**: 479-489.
- Giraldez, A.J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R.J., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A.J., und Schier, A.F. 2006. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* **312**: 75-79.
- Git, A., und Standart, N. 2002. The KH domains of *Xenopus* Vg1RBP mediate RNA binding and self-association. *Rna* **8**: 1319-1333.
- Grabher, C., Joly, J.S., und Wittbrodt, J. 2004. Highly efficient zebrafish transgenesis mediated by the meganuclease I-SceI. *Methods Cell Biol* **77**: 381-401.
- Griffin, D., Penberthy, W.T., Lum, H., Stein, R.W., und Taylor, W.L. 2003. Isolation of the B3 transcription factor of the *Xenopus* TFIIIA gene. *Gene* **313**: 179-188.

- Hall, R.K., und Taylor, W.L. 1989. Transcription factor IIIA gene expression in *Xenopus* oocytes utilizes a transcription factor similar to the major late transcription factor. *Mol Cell Biol* **9**: 5003-5011.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Harland, R.M. 1991. In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol* **36**: 685-695.
- Hausen, P., und Riebesell, M. 1991. *The Early Development of Xenopus laevis. An Atlas of the Histology*. Springer Verlag, Stuttgart.
- Havin, L., Git, A., Elisha, Z., Oberman, F., Yaniv, K., Schwartz, S.P., Standart, N., und Yisraeli, J.K. 1998. RNA-binding protein conserved in both microtubule- and microfilament-based RNA localization. *Genes Dev* **12**: 1593-1598.
- Heasman, J., Holwill, S., und Wylie, C. 1991. *Fertilization of cultured Xenopus oocytes and use in studies of maternally inherited molecules*. Academic Press.
- Heasman, J., Wessely, O., Langland, R., Craig, E.J., und Kessler, D.S. 2001. Vegetal localization of maternal mRNAs is disrupted by VegT depletion. *Dev Biol* **240**: 377-386.
- Horvay, K. 2005. Identifizierung neuer vegetal lokalisierter RNAs in der *Xenopus laevis* Oozyte und deren funktionelle Charakterisierung. In *Abt. für Entwicklungsbiochemie*. Georg-August-Universität, Göttingen.
- Horvay, K., Claussen, M., Katzer, M., Landgrebe, J., und Pieler, T. 2006. *Xenopus* Dead end mRNA is a localized maternal determinant that serves a conserved function in germ cell development. *Dev Biol* **291**: 1-11.
- Houston, D.W., und King, M.L. 2000. A critical role for Xdazl, a germ plasm-localized RNA, in the differentiation of primordial germ cells in *Xenopus*. *Development* **127**: 447-456.
- Houston, D.W., Zhang, J., Maines, J.Z., Wasserman, S.A., und King, M.L. 1998. A *Xenopus* DAZ-like gene encodes an RNA component of germ plasm and is a functional homologue of *Drosophila* boule. *Development* **125**: 171-180.

- Hudson, C., und Woodland, H.R. 1998. Xpat, a gene expressed specifically in germ plasm and primordial germ cells of *Xenopus laevis*. *Mech Dev* **73**: 159-168.
- Huttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Dichtenberg, J., Lorenz, M., Meng, X., Bassell, G.J., Condeelis, J., und Singer, R.H. 2005. Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* **438**: 512-515.
- Irish, V., Lehmann, R., und Akam, M. 1989. The *Drosophila* posterior-group gene nanos functions by repressing hunchback activity. *Nature* **338**: 646-648.
- Isaacs, H.V., Pownall, M.E., und Slack, J.M. 1995. eFGF is expressed in the dorsal midline of *Xenopus laevis*. *Int J Dev Biol* **39**: 575-579.
- Jahn, O., Hesse, D., Reinelt, M., und Kratzin, H.D. 2006. Technical innovations for the automated identification of gel-separated proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **386**: 92-103.
- Jansen, R.P. 2001. mRNA localization: message on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 247-256.
- Joseph, E.M., und Melton, D.A. 1998. Mutant Vg1 ligands disrupt endoderm and mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Development* **125**: 2677-2685.
- Kanai, Y., Dohmae, N., und Hirokawa, N. 2004. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* **43**: 513-525.
- Kataoka, K., Yamaguchi, T., Orii, H., Tazaki, A., Watanabe, K., und Mochii, M. 2006. Visualization of the *Xenopus* primordial germ cells using a green fluorescent protein controlled by cis elements of the 3' untranslated region of the DEADSouth gene. *Mech Dev* **123**: 746-760.
- Kedde, M., Strasser, M.J., Boldajipour, B., Vrielink, J.A., Slanchev, K., le Sage, C., Nagel, R., Voorhoeve, P.M., van Duijse, J., Orom, U.A., *et al.* 2007. RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell* **131**: 1273-1286.
- Kick, D., Barrett, P., Cummings, A., und Sommerville, J. 1987. Phosphorylation of a 60 kDa polypeptide from *Xenopus* oocytes blocks messenger RNA translation. *Nucleic Acids Res* **15**: 4099-4109.

- King, M.L., Messitt, T.J., und Mowry, K.L. 2005. Putting RNAs in the right place at the right time: RNA localization in the frog oocyte. *Biol Cell* **97**: 19-33.
- Kislauskis, E.H., Zhu, X., und Singer, R.H. 1994. Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype. *J Cell Biol* **127**: 441-451.
- Kloc, M., und Etkin, L.D. 1994. Delocalization of Vg1 mRNA from the vegetal cortex in *Xenopus* oocytes after destruction of Xisrt RNA. *Science* **265**: 1101-1103.
- Kloc, M., und Etkin, L.D. 1995. Two distinct pathways for the localization of RNAs at the vegetal cortex in *Xenopus* oocytes. *Development* **121**: 287-297.
- Kloc, M., Spohr, G., und Etkin, L.D. 1993. Translocation of repetitive RNA sequences with the germ plasm in *Xenopus* oocytes. *Science* **262**: 1712-1714.
- Kloc, M., Wilk, K., Vargas, D., Shirato, Y., Bilinski, S., und Etkin, L.D. 2005. Potential structural role of non-coding and coding RNAs in the organization of the cytoskeleton at the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Development* **132**: 3445-3457.
- Koebernick, K., Loeber, J., Arthur, P.K., Tarbashevich, K., und Pieler, T. Manuskript eingereicht. A novel role for vegetal RNA localization in the selective protection of *Xenopus* germline mRNAs from miRNA-mediated decay.
- Kohrmann, M., Luo, M., Kaether, C., DesGroseillers, L., Dotti, C.G., und Kiebler, M.A. 1999. Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol Biol Cell* **10**: 2945-2953.
- Kopranner, M., Thisse, C., Thisse, B., und Raz, E. 2001. A zebrafish nanos-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes Dev* **15**: 2877-2885.
- Kress, T.L., Yoon, Y.J., und Mowry, K.L. 2004. Nuclear RNP complex assembly initiates cytoplasmic RNA localization. *J Cell Biol* **165**: 203-211.
- Krieg, P.A., und Melton, D.A. 1984. Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Res* **12**: 7057-7070.

- Kwon, S., Abramson, T., Munro, T.P., John, C.M., Kohrmann, M., und Schnapp, B.J. 2002. UUCAC- and vera-dependent localization of VegT RNA in *Xenopus* oocytes. *Curr Biol* **12**: 558-564.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Le Goff, C., Laurent, V., Le Bon, K., Tanguy, G., Couturier, A., Le Goff, X., und Le Guellec, R. 2006. pEg6, a spire family member, is a maternal gene encoding a vegetally localized mRNA in *Xenopus* embryos. *Biol Cell* **98**: 697-708.
- Lee, K.S., Yuan, Y.L., Kuriyama, R., und Erikson, R.L. 1995. Plk is an M-phase-specific protein kinase and interacts with a kinesin-like protein, CHO1/MKLP-1. *Mol Cell Biol* **15**: 7143-7151.
- Lehmann, R., und Nusslein-Volhard, C. 1991. The maternal gene nanos has a central role in posterior pattern formation of the *Drosophila* embryo. *Development* **112**: 679-691.
- Lewis, R.A., Gagnon, J.A., und Mowry, K.L. 2008. PTB/hnRNP I is required for RNP remodeling during RNA localization in *Xenopus* oocytes. *Mol Cell Biol* **28**: 678-686.
- Lewis, R.A., Kress, T.L., Cote, C.A., Gautreau, D., Rokop, M.E., und Mowry, K.L. 2004. Conserved and clustered RNA recognition sequences are a critical feature of signals directing RNA localization in *Xenopus* oocytes. *Mech Dev* **121**: 101-109.
- Lewis, R.A., und Mowry, K.L. 2007. Ribonucleoprotein remodeling during RNA localization. *Differentiation* **75**: 507-518.
- Li, Z., Niu, J., Uwagawa, T., Peng, B., und Chiao, P.J. 2005. Function of polo-like kinase 3 in NF-kappaB-mediated proapoptotic response. *J Biol Chem* **280**: 16843-16850.
- Litman, P., Barg, J., Rindzoonki, L., und Ginzburg, I. 1993. Subcellular localization of tau mRNA in differentiating neuronal cell culture: implications for neuronal polarity. *Neuron* **10**: 627-638.
- Liu, G., Grant, W.M., Persky, D., Latham, V.M., Jr., Singer, R.H., und Condeelis, J. 2002. Interactions of elongation factor 1alpha with F-actin and beta-actin

- mRNA: implications for anchoring mRNA in cell protrusions. *Mol Biol Cell* **13**: 579-592.
- Livak, K.J., und Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Long, R.M., Singer, R.H., Meng, X., Gonzalez, I., Nasmyth, K., und Jansen, R.P. 1997. Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science* **277**: 383-387.
- Lottspeich, F., und Zorbas, H. 1998. *Bioanalytik*. Spektrum Verlag, Heidelberg.
- MacArthur, H., Bubunenko, M., Houston, D.W., und King, M.L. 1999. Xcat2 RNA is a translationally sequestered germ plasm component in *Xenopus*. *Mech Dev* **84**: 75-88.
- MacArthur, H., Houston, D.W., Bubunenko, M., Mosquera, L., und King, M.L. 2000. DEADSouth is a germ plasm specific DEAD-box RNA helicase in *Xenopus* related to eIF4A. *Mech Dev* **95**: 291-295.
- Macdonald, P.M., und Kerr, K. 1998. Mutational analysis of an RNA recognition element that mediates localization of bicoid mRNA. *Mol Cell Biol* **18**: 3788-3795.
- Manseau, L.J., und Schubach, T. 1989. cappuccino and spire: two unique maternal-effect loci required for both the anteroposterior and dorsoventral patterns of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **3**: 1437-1452.
- Martello, G., Zacchigna, L., Inui, M., Montagner, M., Adorno, M., Mamidi, A., Morsut, L., Soligo, S., Tran, U., Dupont, S., *et al.* 2007. MicroRNA control of Nodal signalling. *Nature* **449**: 183-188.
- Matsumoto, K., und Wolffe, A.P. 1998. Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation. *Trends Cell Biol* **8**: 318-323.
- Mattaj, I.W., Coppard, N.J., Brown, R.S., Clark, B.F., und De Robertis, E.M. 1987. 42S p48--the most abundant protein in previtellogenic *Xenopus* oocytes--resembles elongation factor 1 alpha structurally and functionally. *Embo J* **6**: 2409-2413.



- Mattaj, I.W., Lienhard, S., Zeller, R., und DeRobertis, E.M. 1983. Nuclear exclusion of transcription factor IIIA and the 42s particle transfer RNA-binding protein in *Xenopus* oocytes: a possible mechanism for gene control? *J Cell Biol* **97**: 1261-1265.
- Melton, D.A. 1987. Translocation of a localized maternal mRNA to the vegetal pole of *Xenopus* oocytes. *Nature* **328**: 80-82.
- Mishima, Y., Giraldez, A.J., Takeda, Y., Fujiwara, T., Sakamoto, H., Schier, A.F., und Inoue, K. 2006. Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430. *Curr Biol* **16**: 2135-2142.
- Mita, K., und Yamashita, M. 2000. Expression of *Xenopus* Daz-like protein during gametogenesis and embryogenesis. *Mech Dev* **94**: 251-255.
- Mosquera, L., Forristall, C., Zhou, Y., und King, M.L. 1993. A mRNA localized to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes encodes a protein with a nanos-like zinc finger domain. *Development* **117**: 377-386.
- Mowry, K.L., und Melton, D.A. 1992. Vegetal messenger RNA localization directed by a 340-nt RNA sequence element in *Xenopus* oocytes. *Science* **255**: 991-994.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., und Ehrhardt, W. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**: 255-262.
- Nieuwkoop, P.D., und Faber, J. 1967. *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin)*, 2nd ed. Amsterdam: North-Holland Publ. Co., Amsterdam.
- Nigg, E.A. 1998. Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 776-783.
- Offield, M.F., Hirsch, N., und Grainger, R.M. 2000. The development of *Xenopus tropicalis* transgenic lines and their use in studying lens developmental timing in living embryos. *Development* **127**: 1789-1797.
- Olivier, C., Poirier, G., Gendron, P., Boisgontier, A., Major, F., und Chartrand, P. 2005. Identification of a conserved RNA motif essential for She2p recognition and mRNA localization to the yeast bud. *Mol Cell Biol* **25**: 4752-4766.

- Pan, F.C., Chen, Y., Loeber, J., Henningfeld, K., und Pieler, T. 2006. I-SceI meganuclease-mediated transgenesis in *Xenopus*. *Dev Dyn* **235**: 247-252.
- Partridge, M., Vincent, A., Matthews, P., Puma, J., Stein, D., und Summerton, J. 1996. A simple method for delivering morpholino antisense oligos into the cytoplasm of cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **6**: 169-175.
- Patel, G.P., und Bag, J. 2006. IMP1 interacts with poly(A)-binding protein (PABP) and the autoregulatory translational control element of PABP-mRNA through the KH III-IV domain. *Febs J* **273**: 5678-5690.
- Pelham, H.R., und Brown, D.D. 1980. A specific transcription factor that can bind either the 5S RNA gene or 5S RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 4170-4174.
- Pfaff, S.L., und Taylor, W.L. 1992. Characterization of a *Xenopus* oocyte factor that binds to a developmentally regulated cis-element in the TFIIIA gene. *Dev Biol* **151**: 306-316.
- Pfeiffer, D.C., und Gard, D.L. 1999. Microtubules in *Xenopus* oocytes are oriented with their minus-ends towards the cortex. *Cell Motil Cytoskeleton* **44**: 34-43.
- Picard, B., le Maire, M., Wegnez, M., und Denis, H. 1980. Biochemical Research on oogenesis. Composition of the 42-S storage particles of *Xenopus laevis* oocytes. *Eur J Biochem* **109**: 359-368.
- Pondel, M.D., und King, M.L. 1988. Localized maternal mRNA related to transforming growth factor beta mRNA is concentrated in a cyokeratin-enriched fraction from *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 7612-7616.
- Pring, M., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C., und Zigmond, S.H. 2003. Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments. *Biochemistry* **42**: 486-496.
- Püschel, M.R. 2007. Untersuchung der translationsinhibierenden Wirkung von Vg1RBP. In *Abt. für Entwicklungsbiochemie*. Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen.
- Qian, Y.W., Erikson, E., und Maller, J.L. 1998. Purification and cloning of a protein kinase that phosphorylates and activates the polo-like kinase Plx1. *Science* **282**: 1701-1704.

- Rand, K., und Yisraeli, J.K. 2007. Vg1 RNA localization in oocytes in the absence of xVICKZ3 RNA-binding activity. *Differentiation* **75**: 566-574.
- Reumann, S., Babujee, L., Ma, C., Wienkoop, S., Siemsen, T., Antonicelli, G.E., Rasche, N., Luder, F., Weckwerth, W., und Jahn, O. 2007. Proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms. *Plant Cell* **19**: 3170-3193.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., und Séraphin, B. 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotech* **17**: 1030-1032.
- Riis, B., Rattan, S.I., Clark, B.F., und Merrick, W.C. 1990. Eukaryotic protein elongation factors. *Trends Biochem Sci* **15**: 420-424.
- Rupp, R.A., Snider, L., und Weintraub, H. 1994. Xenopus embryos regulate the nuclear localization of XMyoD. *Genes Dev* **8**: 1311-1323.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., und Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Schwartz, S.P., Aisenthal, L., Elisha, Z., Oberman, F., und Yisraeli, J.K. 1992. A 69-kDa RNA-binding protein from Xenopus oocytes recognizes a common motif in two vegetally localized maternal mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 11895-11899.
- Shan, J., Munro, T.P., Barbarese, E., Carson, J.H., und Smith, R. 2003. A molecular mechanism for mRNA trafficking in neuronal dendrites. *J Neurosci* **23**: 8859-8866.
- Shastry, B.S., Honda, B.M., und Roeder, R.G. 1984. Altered levels of a 5 S gene-specific transcription factor (TFIIIA) during oogenesis and embryonic development of *Xenopus laevis*. *J Biol Chem* **259**: 11373-11382.

- Sive, H.L., Grainger, R.M., und Harland, R.M. 1998. *Early Development of Xenopus laevis. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, NY.
- Smith, L.D., Xu, W., und Varnold, R.L. 1991. Oogenesis and oocyte isolation. In *Methods Cell Biol.* Academic Press, San Diego.
- St Johnston, D., Beuchle, D., und Nusslein-Volhard, C. 1991. Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the Drosophila egg. *Cell* **66**: 51-63.
- Stennard, F., Carnac, G., und Gurdon, J.B. 1996. The Xenopus T-box gene, Antipodean, encodes a vegetally localised maternal mRNA and can trigger mesoderm formation. *Development* **122**: 4179-4188.
- Stohr, N., Lederer, M., Reinke, C., Meyer, S., Hatzfeld, M., Singer, R.H., und Huttelmaier, S. 2006. ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress. *J Cell Biol* **175**: 527-534.
- Sutoh, K., und Mabuchi, I. 1989. End-label fingerprintings show that an N-terminal segment of depactin participates in interaction with actin. *Biochemistry* **28**: 102-106.
- Tafari, S.R., und Wolffe, A.P. 1990. Xenopus Y-box transcription factors: molecular cloning, functional analysis and developmental regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 9028-9032.
- Takizawa, P.A., Sil, A., Swedlow, J.R., Herskowitz, I., und Vale, R.D. 1997. Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature* **389**: 90-93.
- Tanaka, K.J., Ogawa, K., Takagi, M., Imamoto, N., Matsumoto, K., und Tsujimoto, M. 2006. RAP55, a cytoplasmic mRNP component, represses translation in Xenopus oocytes. *J Biol Chem* **281**: 40096-40106.
- Tanaka, M., Kinoshita, M., Kobayashi, D., und Nagahama, Y. 2001. Establishment of medaka (*Oryzias latipes*) transgenic lines with the expression of green fluorescent protein fluorescence exclusively in germ cells: a useful model to monitor germ cells in a live vertebrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2544-2549.

- Tannahill, D., und Melton, D.A. 1989. Localized synthesis of the Vg1 protein during early *Xenopus* development. *Development* **106**: 775-785.
- Tarbashevich, K., Koebernick, K., und Pieler, T. 2007. XGRIP2.1 is encoded by a vegetally localizing, maternal mRNA and functions in germ cell development and anteroposterior PGC positioning in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* **311**: 554-565.
- Tekotte, H., und Davis, I. 2002. Intracellular mRNA localization: motors move messages. *Trends Genet* **18**: 636-642.
- Thermes, V., Grabher, C., Ristoratore, F., Bourrat, F., Choulika, A., Wittbrodt, J., und Joly, J.S. 2002. I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. *Mech Dev* **118**: 91-98.
- Thomsen, G.H., und Melton, D.A. 1993. Processed Vg1 protein is an axial mesoderm inducer in *Xenopus*. *Cell* **74**: 433-441.
- Towbin, H., Staehelin, T., und Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4354.
- Tsui, S., Dai, T., Roettger, S., Schempp, W., Salido, E.C., und Yen, P.H. 2000. Identification of two novel proteins that interact with germ-cell-specific RNA-binding proteins DAZ and DAZL1. *Genomics* **65**: 266-273.
- Voeltz, G.K., Ongkasuwan, J., Standart, N., und Steitz, J.A. 2001. A novel embryonic poly(A) binding protein, ePAB, regulates mRNA deadenylation in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev* **15**: 774-788.
- Wang, C., und Lehmann, R. 1991. Nanos is the localized posterior determinant in *Drosophila*. *Cell* **66**: 637-647.
- Watanabe, T., Takeda, A., Mise, K., Okuno, T., Suzuki, T., Minami, N., und Imai, H. 2005. Stage-specific expression of microRNAs during *Xenopus* development. *FEBS Lett* **579**: 318-324.
- Weeks, D.L., Rebagliati, M.R., Harvey, R.P., und Melton, D.A. 1985. Localized maternal mRNAs in *Xenopus laevis* eggs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **50**: 21-30.
- Wehner, R., und Gehring, W. 1995. *Zoologie*, 23 ed. Springer Verlag, Stuttgart.

- Werner, H.B., Kuhlmann, K., Shen, S., Uecker, M., Schardt, A., Dimova, K., Orfaniotou, F., Dhaunchak, A., Brinkmann, B.G., Mobius, W., *et al.* 2007. Proteolipid protein is required for transport of sirtuin 2 into CNS myelin. *J Neurosci* **27**: 7717-7730.
- Wessely, O., und De Robertis, E.M. 2000. The *Xenopus* homologue of Bicaudal-C is a localized maternal mRNA that can induce endoderm formation. *Development* **127**: 2053-2062.
- Wilkie, G.S., Gautier, P., Lawson, D., und Gray, N.K. 2005. Embryonic poly(A)-binding protein stimulates translation in germ cells. *Mol Cell Biol* **25**: 2060-2071.
- Wylie, C., Kofron, M., Payne, C., Anderson, R., Hosobuchi, M., Joseph, E., und Heasman, J. 1996. Maternal beta-catenin establishes a 'dorsal signal' in early *Xenopus* embryos. *Development* **122**: 2987-2996.
- Xie, S., Wu, H., Wang, Q., Cogswell, J.P., Husain, I., Conn, C., Stambrook, P., Jhanwar-Uniyal, M., und Dai, W. 2001. Plk3 functionally links DNA damage to cell cycle arrest and apoptosis at least in part via the p53 pathway. *J Biol Chem* **276**: 43305-43312.
- Yang, F., Demma, M., Warren, V., Dharmawardhane, S., und Condeelis, J. 1990. Identification of an actin-binding protein from *Dictyostelium* as elongation factor 1a. *Nature* **347**: 494-496.
- Yisraeli, J.K., und Melton, D.A. 1988. The maternal mRNA Vg1 is correctly localized following injection into *Xenopus* oocytes. *Nature* **336**: 592-595.
- Yisraeli, J.K., Sokol, S., und Melton, D.A. 1990. A two-step model for the localization of maternal mRNA in *Xenopus* oocytes: involvement of microtubules and microfilaments in the translocation and anchoring of Vg1 mRNA. *Development* **108**: 289-298.
- Yoon, Y.J., und Mowry, K.L. 2004. *Xenopus* Staufen is a component of a ribonucleoprotein complex containing Vg1 RNA and kinesin. *Development* **131**: 3035-3045.
- Zearfoss, N.R., Chan, A.P., Wu, C.F., Kloc, M., und Etkin, L.D. 2004. Hermes is a localized factor regulating cleavage of vegetal blastomeres in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* **267**: 60-71.

- 
- Zhang, H.L., Singer, R.H., und Bassell, G.J. 1999a. Neurotrophin regulation of beta-actin mRNA and protein localization within growth cones. *J Cell Biol* **147**: 59-70.
- Zhang, J., Houston, D.W., King, M.L., Payne, C., Wylie, C., und Heasman, J. 1998. The role of maternal VegT in establishing the primary germ layers in *Xenopus* embryos. *Cell* **94**: 515-524.
- Zhang, J., und King, M.L. 1996. *Xenopus* VegT RNA is localized to the vegetal cortex during oogenesis and encodes a novel T-box transcription factor involved in mesodermal patterning. *Development* **122**: 4119-4129.
- Zhang, Q., Yaniv, K., Oberman, F., Wolke, U., Git, A., Fromer, M., Taylor, W.L., Meyer, D., Standart, N., Raz, E., *et al.* 1999b. Vg1 RBP intracellular distribution and evolutionarily conserved expression at multiple stages during development. *Mech Dev* **88**: 101-106.
- Zhao, W.M., Jiang, C., Kroll, T.T., und Huber, P.W. 2001. A proline-rich protein binds to the localization element of *Xenopus* Vg1 mRNA and to ligands involved in actin polymerization. *Embo J* **20**: 2315-2325.
- Zhou, Y., und King, M.L. 1996. Localization of Xcat-2 RNA, a putative germ plasm component, to the mitochondrial cloud in *Xenopus* stage I oocytes. *Development* **122**: 2947-2953.

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt *Prof. Dr. Tomas Pieler* sowohl für die interessante Themenstellung und die Betreuung der Arbeit, als auch für das entgegengebrachte Vertrauen und die gewährte experimentelle Freiheit.

Bei *Prof. Dr. Ernst Wimmer* bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ein großes Dankeschön an *Dr. Olaf Jahn* und die *Abt. Proteomics* des MPI für Experimentelle Medizin für die massenspektrometrische Analyse meiner Proteine.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei der gesamten *Abt. für Entwicklungsbiochemie* für die herzliche Aufnahme und die gute Arbeitsatmosphäre bedanken.

Mein besonderer Dank gilt *Ines Eckhardt, Gudrun Kracht* und *Andreas Nolte* für ihre hervorragende technische Unterstützung und der gesamten Transportgruppe, *Patrick K. Arthur, Dr. Katsiaryna Tarbashevich, Dr. Susanne Koch, Dr. Katja Horvay, Dr. Maike Claussen, Dr. Katja Koebernick* und *Stefanie Oswald* für ihre stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Special thanks go to *Patrick K. Arthur* for inspiring scientific and private discussions during long days in the lab.

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bei meiner gesamten Familie, besonders meinen Eltern, Großeltern, meiner Schwester und bei *Jochen Sieber* für ihre unverzichtbare Unterstützung, Geduld und ihr Verständnis bedanken.



## Lebenslauf

Name: Jana Löber  
Geburtsdatum: 12. März 1979  
Geburtsort: Gera

### Schulische Ausbildung

1985 – 1991 Polytechnische Oberschule Königshofen  
1991 – 1997 Friedrich-Schiller-Gymnasium, Eisenberg  
1997 Abitur

### Universitäre Ausbildung

1997 - 2002 Universität Leipzig, Studium der Biochemie (Diplom)  
1999 - 2000 University of Glasgow, 3rd year Honours Biochemistry  
2002 Universität Leipzig, Diplom (Biochemie)  
seit 2003 Universität Göttingen,  
Promotionsarbeit am Göttinger Zentrum für  
Molekularbiologie und Biochemie,  
Abteilung Entwicklungsbiochemie

Göttingen, den 18.03. 2008