

**Identifizierung neuer vegetal lokalisierter RNAs in der *Xenopus laevis* Oozyte und deren funktionelle Charakterisierung**

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

vorgelegt von  
**Katja Horvay**  
aus Lübz

Göttingen 2005

D7

Referent:

Prof. Dr. Pieler

Korreferent:

Prof. Dr. Wimmer

Tag der mündlichen Prüfung:

## **Inhaltsverzeichnis**

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	RNA Lokalisation als wichtiger posttranskriptioneller Mechanismus zur Etablierung asymmetrischer Zellteilung.....	1
1.2	Unterschiedliche Mechanismen der RNA Lokalisation .....	2
1.3	Die Lokalisation von mRNA Molekülen am vegetalen Pol der <i>Xenopus</i> Oozyte.	4
1.4	Elemente des signalvermittelten RNA Lokalisationmechanismus während der <i>Xenopus</i> Oogenese.....	8
1.4.1	RNA Lokalisationssignale.....	8
1.4.2	RNA assoziierte Faktoren.....	9
1.4.3	Elemente des Zytoskeletts .....	11
1.5	Die <i>Xenopus laevis</i> Oogenese .....	12
1.6	Das Keimplasma und die primordiale Keimzellentwicklung in <i>Xenopus</i> .....	14
1.7	Fragestellung der Arbeit .....	17
<b>2</b>	<b>Materialien, Methoden und Klonierungen.....</b>	<b>18</b>
2.1	Organismen.....	18
2.1.1	<i>Xenopus laevis</i> .....	18
2.1.2	<i>Escherichia coli</i> -Stämme.....	18
2.2	Chemikalien.....	18
2.3	Gebrauchswaren und Geräte.....	18
2.4	Computer-Software .....	19
2.5	Enzyme, Proteine, Nukleinsäuren und Reaktionssysteme (Kits) .....	19
2.5.1	Enzyme .....	19
2.5.2	Proteine.....	19
2.5.3	Nukleinsäuren.....	19
2.5.4	Reaktionssysteme (Kits).....	19
2.6	Molekulargewichtsstandards .....	20

## Inhaltsverzeichnis

---

2.7	Radioisotopen .....	20
2.8	Medien und Lösungen .....	20
2.8.1	Nährmedien: .....	20
2.8.2	Antibiotika zur Selektion von Bakterienklonen: .....	20
2.8.3	Puffer und Stammlösungen .....	21
2.9	Antikörper.....	21
2.10	Chromatographiematrizes.....	21
2.11	Plasmide und Vektoren.....	22
2.12	Oligonukleotide .....	22
2.12.1	Sequenzierungsprimer .....	22
2.12.2	(RT-)PCR-Oligonukleotide .....	23
2.12.2.1	Klon 22 cDNA.....	23
2.12.2.2	Klon 20 cDNA.....	23
2.12.2.3	H4 (Kontrolle) .....	23
2.13	Morpholino Oligonukleotide .....	23
2.14	Arbeiten mit Bakterien .....	24
2.14.1	Anzuchtbedingungen.....	24
2.14.2	Trübungsmessungen .....	24
2.14.3	Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen .....	24
2.14.4	Transformation von Bakterienzellen .....	24
2.14.5	Anlegen von Glycerol-Stammkulturen.....	25
2.15	DNA-Techniken .....	25
2.15.1	Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab.....	25
2.15.2	Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab.....	25
2.15.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	25
2.15.4	Restriktionsendonukleolytische Spaltung von Nukleinsäuren .....	26
2.15.5	Nicht denaturierende Agarose-Gelelektrophorese.....	26
2.15.6	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	26
2.15.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen .....	26
2.15.8	Polymerasekettenreaktionen (PCR) im analytischen und präparativen Maßstab .....	27
2.15.9	Aufreinigung von PCR-Produkten .....	28

2.15.10	Klonierung und Subklonierung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten .....	28
2.15.11	Ligation von DNA-Fragmenten .....	28
2.16	RNA-Techniken .....	29
2.16.1	Behandlung von Gefäßen und Lösungen.....	29
2.16.2	Isolierung von DNA-freier Gesamt-RNA aus <i>Xenopus</i> .....	29
2.16.2.1	Isolierung von total RNA aus Stadium VI <i>Xenopus</i> Oozyten .....	29
2.16.2.2	Isolation von Detergenzien unlöslicher bzw. löslicher RNA aus Stadium V und VI <i>Xenopus</i> Oozyten .....	30
2.16.2.3	Isolation von Total RNA aus Embryonalstadien.....	30
2.16.2.4	Adulte Gewebe und Organe .....	31
2.16.3	Semiquantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) .....	31
2.16.4	<i>In vitro</i> -Synthese von RNA .....	32
2.16.4.1	<i>In vitro</i> -Synthese von Monomethylguanodin-Cap-RNA zur Mikroinjektion in <i>Xenopus</i> Oozyten und Embryonen.....	32
2.16.4.2	<i>In vitro</i> -Synthese von Digoxigenin- und Fluorescein-markierten RNA-Sonden .....	32
2.16.4.3	<i>In vitro</i> -Synthese von <sup>32</sup> P-UTP-markierten RNAs .....	33
2.16.4.4	Aufreinigung von RNA-Transkripten und Abtrennung nichteingebauter Nukleotide mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen).....	33
2.16.4.5	Aufreinigung von RNA-Transkripten unter Verwendung von Sephadex G50-Säulen .....	33
2.16.5	Analyse von <i>in vitro</i> transkribierten RNAs durch native Agarose-Gelelektrophorese.....	34
2.16.6	Auftrennung radioaktiv markierter RNA durch denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Elektrophorese .....	34
2.16.7	Analyse von RNA durch denaturierende Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese .....	34
2.16.8	Northern-Transfer von RNA auf Nitrozellulose- oder Nylon-Membranen.	34
2.16.9	Nachweis von RNA auf Membranen durch Methyleneblau-Färbung .....	35
2.17	Proteintechniken .....	35
2.17.1	<i>In vitro</i> Translation .....	35
2.17.2	Quantifizierung von Proteinen nach Bradford.....	36

2.17.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	36
2.17.4	Anfärben von Proteinen mit Coomassie-Blue .....	37
2.17.5	Herstellung von <i>Xenopus</i> Oozyten S100-Extrakten .....	37
2.18	Methoden zur Identifizierung vegetal lokalisierter RNAs .....	38
2.18.1	Plattieren und Bestimmung des Phagentiters der $\lambda$ TrilEx2-Phagenbibliothek .....	38
2.18.2	Massenexzision der $\lambda$ TriplEx2-Phagenbibliothek in BM25.8-Zellen.....	38
2.18.3	Amplifikation von Einzelklon cDNA durch PCR.....	38
2.18.4	Macroarray Techniken.....	39
2.18.4.1	Macroarray Herstellung.....	39
2.18.4.2	Erststrang cDNA Synthese und Amplifikation der cDNA.....	39
2.18.4.3	Radioaktive Markierung der ds cDNA.....	39
2.18.4.4	Hybridisierung des Macroarrays .....	39
2.18.4.5	Waschen und Detektion.....	40
2.18.5	Microarray Techniken .....	40
2.18.5.1	Microarray Herstellung.....	40
2.18.5.2	Erststrang cDNA Synthese und Amplifikation der cDNA.....	40
2.18.5.3	Cy3; Cy5 Markierungsreaktion der ds cDNA.....	41
2.18.5.4	Hybridisierung des cDNA Microarrays.....	41
2.18.5.5	Waschen des cDNA Microarrays .....	41
2.18.5.6	Scannen des Microarrays.....	41
2.18.6	Suche nach vegetal lokalisierten Transkripten mittels whole mount <i>in situ</i> -Hybridisierung in großem Maßstab.....	41
2.19	Isolierung von cDNA-Fragmenten aus Phagen-Bibliotheken mittels nicht radioaktiver Hybridisierung.....	42
2.19.1	Plattieren und Kultivieren von Phagen.....	42
2.19.2	Phagenplattierung auf NZY-Agar-Platten.....	42
2.19.3	Plaque „lifting“ .....	43
2.19.4	Prähybridisierung .....	43
2.19.5	Markierung der Hybridisierungsprobe .....	43
2.19.6	Hybridisieren .....	43
2.19.7	Waschen .....	43
2.19.8	Detektion und Isolierung positiver Plaques.....	44
2.19.9	<i>In vivo</i> Exzision von Phagen-Inserts .....	44

2.20 Gewinnung von <i>Xenopus</i> Oozyten zur RNA-Präparation, für whole mount <i>in situ</i> - Studien und Injektionsexperimente .....	45
2.21 Präparation von <i>Xenopus</i> -Embryonalstadien .....	45
2.21.1 Präparation von <i>Xenopus</i> Testis .....	45
2.21.2 Stimulation der Eiablage .....	45
2.21.3 Befruchtung und Entwicklung von <i>Xenopus</i> Embryonen .....	45
2.22 Nachweis von RNA-Transkripten durch whole mount <i>in situ</i> -Hybridisierung von <i>Xenopus</i> Oozyten und Embryonen .....	46
2.22.1 Fixierung von <i>Xenopus</i> Oozyten und Embryonen.....	46
2.22.2 Rehydrieren der Oozyten und Embryonen .....	46
2.22.3 Permeabilisieren der Oozyten und Embryonen durch Proteinase K- Behandlung.....	47
2.22.4 Refixierung .....	47
2.22.5 Hybridisierung mit markierten antisense-Sonden .....	47
2.22.6 Waschen .....	48
2.22.7 Antikörper-Inkubation .....	48
2.22.8 Farbentwicklung .....	49
2.22.9 Abstoppen der Färbereaktion, Auswertung und Konservierung der Präparate .....	49
2.22.10 Vibratomschnitte .....	49
2.23 Isolierung von RNA-Lokalisationselementen in Mikroinjektionsexperimenten.	50
2.23.1 Kultivierung von <i>Xenopus</i> Oozyten (nach Kloc et al., 1999).....	50
2.23.2 Präparation von Vitellogenin aus Froschserum (nach Kloc et al., 1999)....	50
2.23.3 Injektion und Detektion von lacZ-RNA-Fusionen in <i>Xenopus</i> Oozyten.....	51
2.24 Analyse von RNA-Protein-Wechselwirkungen.....	52
2.24.1 UV-Quervernetzungsversuche.....	52
2.24.2 Koimmunopräzipitation von RNA .....	52
2.24.3 Herstellung von $\alpha$ -myc-Immunopellets .....	53
2.25 Mikroinjektion von <i>Xenopus</i> Embryonen .....	53
2.26 Klonierungen .....	53
2.26.1 Subklonierung von Fragmenten der XDead end (Klon 20) cDNA .....	54
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>56</b>

3.1	Identifizierung vegetal lokalisierter RNAs mittels differenzieller Hybridisierung von Macroarrays und anschließender whole mount <i>in situ</i> Hybridisierung.....	56
3.2	Durchmusterung der $\lambda$ TriplEx2 Phagenbibliothek im Großmaßstab zur Identifikation neuer vegetal lokalisierter Transkripte .....	59
3.3	Charakterisierung neu identifizierter vegetal lokalisierter RNAs .....	68
3.3.1	Die nach dem späten Verteilungsweg lokalisierte RNA Kl 22 kodiert für ein Protein mit möglicher Glycerolkinase Funktion .....	68
3.3.2	Expression des <i>XGlk</i> (Kl 22) Transkripts in Embryonalstadien und adulten Geweben .....	70
3.3.3	<i>XDead end</i> (Kl 20) ist eine spät lokalisierte RNA und kodiert für ein putatives RNA Bindeprotein .....	72
3.3.4	Expressionsanalyse von <i>XDead end</i> in verschiedenen Embryonalstadien und adulten Geweben .....	75
3.3.5	Das <i>Xenopus</i> Dead end Protein hat eine Funktion bei der Entwicklung der primordialen Keimzellen .....	77
3.4	Ein 251 Nukleotide umfassendes Fragment des 3'-UTRs der <i>XDead end</i> RNA vermittelt eine Anreicherung am vegetalen Kortex.....	81
3.5	Untersuchung der Proteinbindung des XDead end RNA-Lokalisations-elementes .	84
3.5.1	Das XDead end Lokalisations-element zeigt ein zum Vg1 Lokalisations-element ähnliches Proteinbindungsmuster.....	84
3.5.2	Das XDead end Lokalisations-element bindet Prrp im Koimmunopräzipitationsexperiment .....	87
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>89</b>
4.1	Die Identifikation neuer vegetal lokalisierter RNAs durch differenzielle Hybridisierung.....	89
4.2	Neu identifizierte lokalisierte maternale Faktoren kodieren für unterschiedliche hypothetische Proteinfunktionen .....	91
4.3	Die <i>XGlk</i> RNA kodiert für ein Protein mit hypothetischer Glycerolkinase Aktivität .....	93
4.4	Die spät lokalisierte <i>XDead end</i> RNA ist während der <i>Xenopus</i> Embryogenese Keimplasma-spezifisch exprimiert .....	95



4.5	Die XDead end Funktion in der primordialen Keimzellentwicklung ist evolutionär konserviert .....	96
4.6	Ein 251 Nukleotide umfassendes Fragment des <i>XDead end</i> 3`-UTRs vermittelt die Lokalisation der mRNA am vegetalen Pol .....	99
4.7	Das Proteinbindungsverhalten der <i>XDead end</i> RNA korreliert mit dem anderer spät lokalisierter RNAs .....	102
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>105</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>106</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>118</b>
7.1	Darstellung aller in der Suche nach vegetal lokalisierten Transkripten neu identifizierten RNAs.....	118
7.2	Nukleotid- und Aminosäuresequenz des XGlk (Kl 22) Klons.....	124
7.3	Nukleotid- und Aminosäuresequenz des XDead end (Kl 20) Klons.....	126

Danksagung

Lebenslauf

## Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1 Darstellung des frühen und späten vegetalen RNA Sortierungsweges in <i>Xenopus</i> Oozyten.....	5
Abb.1.2 Darstellung von <i>trans</i> -agierenden Faktoren, die an das Vg1-Lokalisationselement binden und somit vermutlich eine Rolle in der vegetalen Lokalisation von <i>Vg1</i> RNA inne haben.....	11
Abb.1.3 Die <i>Xenopus laevis</i> Oogenese ist in sechs unterschiedliche Stadien eingeteilt. ....	13
Abb.1.4 Histologische Schnitte verschiedener <i>Xenopus</i> Oozytenstadien. ....	14
Abb.1.5: Die Entwicklung der Keimzellen in <i>Xenopus laevis</i> . ....	17
Abb.3.1 Differentielle Hybridisierung von Macroarrays zur Vorauswahl potentiell vegetallokalisierter RNAs. ....	57
Abb.3.2 Verifikation der vegetalen Lokalisation in der whole mount <i>in situ</i> Hybridisierung. ....	58
Abb.3.3 Graphische Darstellung der berechneten Kontrastwerte und der dazugehörigen Signifikanzwerte im Scatterplot. ....	60
Abb.3.4 Darstellung der experimentellen Strategie zur Identifikation neuer vegetallokalisierter RNAs. ....	62
Abb.3.5 Graphische Darstellung der berechneten Kontrastwerte und der dazugehörigen Signifikanzwerte im Scatterplot nach erneuter Bildauswertung. ....	64
Abb.3.6 Experimentelle Strategie zur Analyse zusätzlicher Kandidatenklone. ....	65
Abb.3.7 Neu identifizierte vegetallokalisierte RNAs lassen sich in Gruppen mit verschiedenen Proteinfunktionen einteilen.....	67
Abb.3.8 Die Anreicherung der Kl 22 RNA erfolgt über den späten Lokalisationsweg.....	68
Abb.3.9 Schematische Darstellung der Kl 22 cDNA .....	69
Abb.3.10 Vergleich der Aminosäuresequenzen der <i>Xenopus</i> Glycerolkinase mit einem humanen Homolog. ....	70
Abb.3.11 Expression von <i>XGlk</i> in verschiedenen Embryonalstadien und adulten Geweben. ....	72
Abb.3.12 Die <i>XDead end</i> (Kl 20) RNA wird über den späten Lokalisationsweg verteilt... ..	72
Abb.3.13 Schematische Darstellung der <i>XDead end</i> cDNA.....	73
Abb.3.14 <i>XDead end</i> Aminosäuresequenzvergleich mit homologen Proteinen anderer Organismen.....	74
Abb.3.15 Expressionsanalyse der <i>XDead end</i> RNA in verschiedenen Embryonalstadien und Geweben. ....	76

Abb.3.16 XDead end Morpholino Oligonukleotid Injektion. ....	78
Abb.3.17 <i>Xpat</i> Expression in XDead end Morpholino Oligonukleotid injizierten Embryos. .....	79
Abb.3.18 XDead end Morpholino Oligonukleotid / <i>zDead end</i> RNA Ko-Injektion.....	81
Abb.3.19 Der 3'-UTR der XDead end RNA enthält ein 251 bp umfassendes Lokalisationssignal. ....	83
Abb.3.20 Das XDead end Lokalisationselement interagiert spezifisch mit Proteinen im UV-Quervernetzungsversuch. ....	85
Abb.3.21 Bindung des XDead end Lokalisationselements im Koimmunopräzipitations- experiment. ....	88
Abb.4.1 Übersicht der Lokalisationssignale vegetal lokalisierter RNA Moleküle .....	100
Abb.4.2 Schematische Darstellung des Vergleichs der Proteinbindung des XDead end, Vg1 und XNIF Lokalisationssignals. ....	104

## Abkürzungen

A	Adenin
AA	Acrylamid
ad	auf (auffüllen)
Amp	Ampicillin
antisense	Gegenstrang
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderseumalbumin (bovine serum albumine)
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
cpm	Zählimpulse pro Minute (counts per minute)
d	destilliert
Da	Dalton, relative Molekülmasse
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dpm	Zerfälle pro Minute (desintegrations per minute)
ds	doppelsträngig
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
fl	ganze Länge (full length)
G	Guanin

## Abkürzungen

---

HEPES	N-(2-Hydroxymethyl)piperazin,N'-3-propansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani
M	molar (mol/l)
mRNA	Boten („messenger“)-RNA
MT	wiederholtes myc-Epitop (tag)
NaAc	Natriumazetat
NP40	Nonidet P-40
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen („open reading frame“)
p.a.	zur Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
pfu	“plaque-forming units”
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rNTP	Ribonukleotidtriphosphat
RNP	Ribonukleoproteinpartikel
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
sense	kodierender DNA-Strang
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA- Elektrophoresepuffer

## Abkürzungen

---

TE	Tris-EDTA
template	Matrize
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethyldiamin
Tet	Tetracyclin
tRNA	Transfer-RNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UTP	Uridintriphosphat
UTR	nichttranslatierte Region
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	Verhältnis Volumen zu Volumen
whole mount	ganzes Präparat
w/v	Verhältnis Gewicht zu Volumen
X.l.	<i>Xenopus laevis</i>

## 1 Einleitung

Ein wichtiger Mechanismus zur Etablierung von Zellasymmetrien ist die zytoplasmatische Lokalisation von RNA Molekülen. Durch die asymmetrische Verteilung bestimmter mRNAs, die für wichtige Faktoren kodieren, können so nach einer Zellteilung zwei unterschiedliche Zelltypen entstehen. Die Lokalisation von RNAs ist auch ein äußerst effizienter Weg, Genprodukte in ganz bestimmte subzelluläre Bereiche einer Zelle zu bringen, und damit den Ort der Proteinsynthese zu regulieren. Der Mechanismus der differenziellen Lokalisation von RNA Molekülen ist evolutionär konserviert und in einzelligen Organismen wie Hefen, in Oozyten oder Embryonen und in verschiedenen somatischen Zellen von Tieren und Pflanzen beschrieben.

### 1.1 RNA Lokalisation als wichtiger posttranskriptioneller Mechanismus zur Etablierung asymmetrischer Zellteilung

Die Lokalisation von RNAs in diversen Zelltypen und Organismen hat viele unterschiedliche Funktionen. Viele RNA Moleküle werden ungleich in Tochterzellen oder Blastomere des Embryos verteilt, um ein bestimmtes Zellschicksal festzulegen. So wird die *Ash1* RNA (Long et al., 1997; Takizawa et al., 1997), die für ein Repressorprotein kodiert, in der Tochterzelle der knospenden Hefezelle lokalisiert, um den „Mating“ Typ der Tochterzelle zu determinieren. Eine asymmetrische Zellteilung und damit ein unterschiedliches Zellschicksal der *Drosophila* Neuroglioblasten wird durch die Lokalisation der *gcm* RNA in nur einer Hälfte der Zelle während der Metaphase erreicht. Die *gcm* RNA erhaltene Tochterzelle entwickelt sich zu einer Gliazelle, während die andere neuronale Strukturen ausbildet (Akiyama-Oda et al., 1999; Bernardoni et al., 1999). RNA Lokalisation ermöglicht der Zelle außerdem eine lokalisierte „Proteinproduktion“. Im migrierenden Hühnerfibroblasten gewährleistet die gezielte Lokalisation der  $\beta$ -Aktin RNA an den Lammellipodien der Fibroblasten, daß genau dort Aktin gebildet und polymerisiert werden kann, wo es benötigt wird (Kislauskis et al., 1997). RNA Moleküle werden außerdem lokalisiert, um die Translation einer RNA auf ein bestimmtes subzelluläres Kompartiment zu beschränken. So ist es in sich entwickelnden Neuronen sehr wichtig, die extreme Polarität aufrecht zuhalten, in dem beispielsweise *Tau* mRNA (Aronov et al., 2001) nur in proximalen Bereichen des Axons lokalisiert wird, während *MAP2* mRNA

(Garner et al., 1988) ausschließlich in den Dendriten zu finden ist. Eine weitere wichtige Funktion der gezielten Lokalisation von mRNAs ist die Etablierung von Morphogengradienten während der frühen Musterbildung des Embryos. Die Bildung der primären anterioren/posterioren Achse in der *Drosophila* Entwicklung wird durch die Lokalisation von maternalen RNAs festgelegt. Während der *Drosophila* Oogenese wird die *bicoid* RNA (Berleth et al., 1988) am anterioren Pol der Oozyte lokalisiert. Unmittelbar nach der Befruchtung des Eis wird die *bicoid* RNA translatiert. Das Bicoid Protein diffundiert ausgehend vom anterioren Pol und bildet so einen anterior/posterioren Proteingradienten aus. Das Bicoid Protein ist ein Homeodomänen-Transkriptionsfaktor und aktiviert konzentrationsabhängig die zygotische Transkription von weiteren Faktoren. Auf diese Weise können Gene in der anterioren Region des sich entwickelnden Embryos angeschaltet werden, die dort die Spezifikation kopfbildender Muster ermöglichen (Driever et al., 1990). Auch die Ausbildung posteriorer Strukturen, wie das Abdomen oder das Polplasma, dem Ursprung der primordialen Keimzellen, wird durch die Lokalisation verschiedener RNA Moleküle gesteuert. Die korrekte *oskar* mRNA Lokalisation und spätere Translation am posterioren Pol der *Drosophila* Oozyte (Ephrussi et al., 1991) ermöglicht die Bildung der posterioren Polgranulae und des Polplasmas. Diese Strukturen sind wiederum wichtig für die Verankerung der später lokalisierten *nanos* mRNA (Lehmann and Nusslein-Volhard, 1991) und der daraus resultierenden Bildung eines Nanos Proteingradienten.

## 1.2 Unterschiedliche Mechanismen der RNA Lokalisation

Eine subzelluläre Lokalisation von mRNA kann auf grundsätzlich unterschiedlichen Wegen erfolgen. Die Lokalisation der *nanos* mRNA in der *Drosophila* Oozyte geschieht über ein gekoppeltes System der Diffusion der RNA im Zytoplasma und der Verankerung der RNA am posterioren Pol, abhängig von der zuvor korrekten Lokalisation und Translation von Oskar, Vasa und Tudor (Wang et al., 1994). Die Lokalisation von *Xcat2* in der mitochondrialen Wolke während der frühen *Xenopus* Oogenese ereignet sich möglicherweise auch durch eine Kombination aus Diffusion und „Einfangen“ der RNA in bestimmten Strukturen (Chang et al., 2004). *Nanos* und *Xcat2* sind somit Beispiele für einen Mechanismus gekoppelter Diffusion und Verankerung der RNA. Dagegen wird aber die *hsp83*, *hunchback* und *caudal* RNA durch eine lokalisierte Degradation bzw. Protektion der RNA subzellulär angereichert (Bashirullah et al., 1999; Ding et al., 1993).



In der befruchteten Eizelle ist die *hsp83* mRNA zunächst gleichmäßig verteilt, wird dann aber im Zuge der ersten Zellteilungen am posterioren Pol insbesondere in den Polzellen akkumuliert. Obwohl während der fortschreitenden Teilung der Zellen der Gehalt der *hsp83* RNA sehr stark sinkt, bleibt die *hsp83* mRNA Menge in den Polzellen konstant, da dort vermutlich die RNA vor Degradation geschützt ist.

Ein weit verbreiteter RNA Lokalisationsmechanismus ist der signalvermittelte und aktive Transport der RNAs vom Ort der Synthese zum Zielort in einem RNA-Protein Komplex assoziiert mit Motorproteinen und dem Zytoskelett. Obwohl die Zusammensetzung der RNA-Transportpartikel in den einzelnen Organismen und Zelltypen sehr unterschiedlich ist, so scheint das grundsätzliche Prinzip des Mechanismus trotzdem ähnlich zu sein. Im Zellkern bilden sich nach der Transkription der mRNA zunächst nukleäre hnRNPs. Diese enthalten RNA-Exportfaktoren, den Cap-Bindekomplex sowie Proteine, die spezifisch an Lokalisationssignale der RNA binden und damit den Lokalisationsprozeß initiieren (Jansen, 2001). Nach dem Export des RNA-Protein Komplexes in das Zytoplasma erfolgt ein Umbau. Während die Exportfaktoren in den Kern zurückgelangen, werden zusätzliche Proteine, wie zytoplasmatische hnRNPs, Proteine zur translationellen Reprimierung der RNA und Proteine, die als Adaptoren für Motorproteine dienen, in den RNA Transportkomplex geholt. Nach der Assoziation des Komplexes mit Motorproteinen und dem Zytoskelett kann so der Transport der RNA zum Zielort erfolgen. Am Ziel wird der Transportkomplex schließlich erneut umgewandelt. Die Motorproteine dissoziieren und Proteine binden an die RNA, um diese am Zellkortex zu verankern, oder die Translationsmaschinerie zu rekrutieren bzw. zu aktivieren (Wilhelm and Vale, 1993).

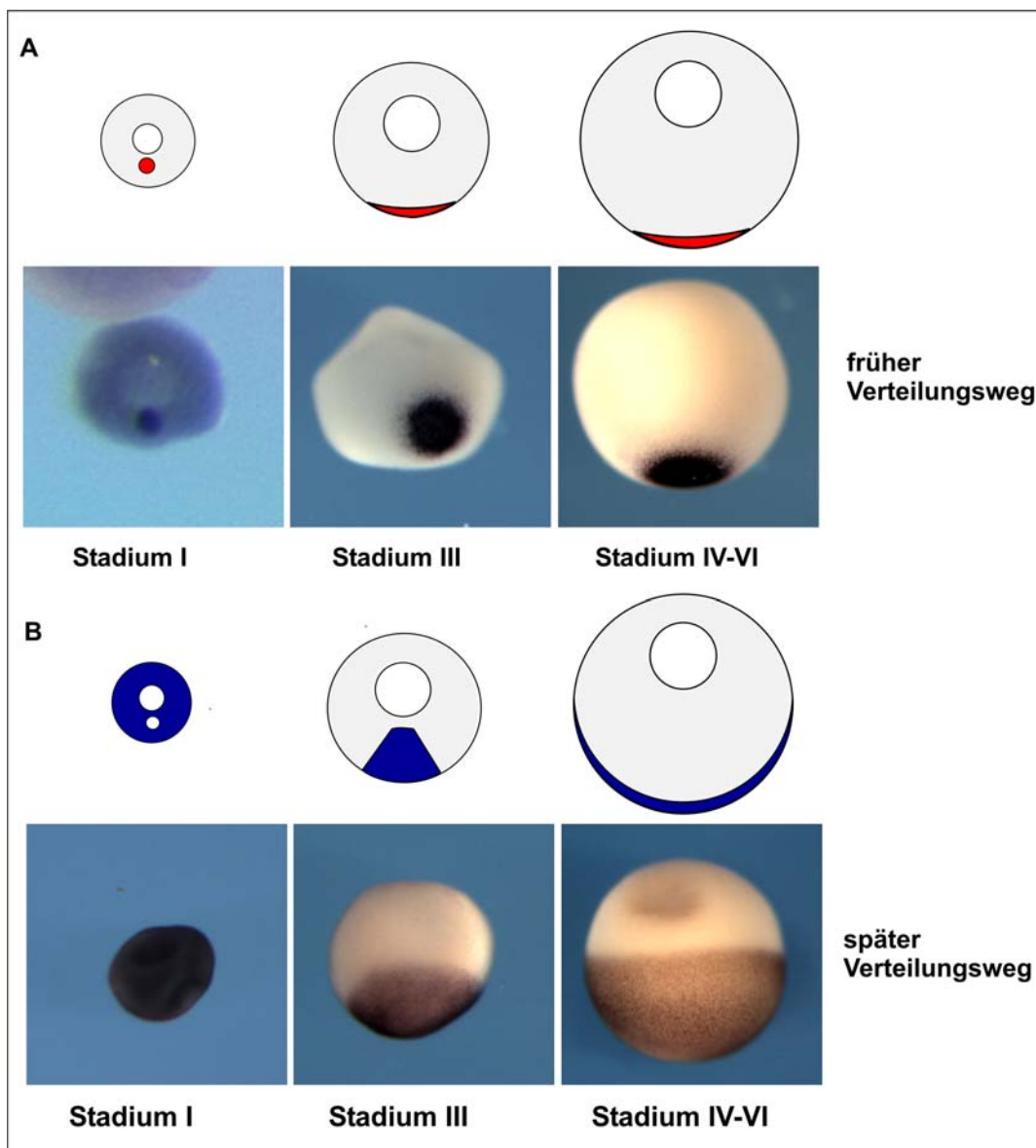
Ein mittlerweile sehr genau untersuchter Transportkomplex ist der *Ash 1* mRNA - Transportkomplex. Dieser Komplex, bestehend aus Loc1p und She2p, ist über ein Adaptorprotein, She3p, mit dem Myosin Motorprotein Myo4p/She1p verbunden, das den Transport über Aktinfilamente vermittelt (Bohl et al., 2000; Long et al., 2000; Takizawa et al., 1997; Takizawa and Vale, 2000). Auch die Assoziation anderer Motorproteine mit RNA Transportpartikeln ist mittlerweile beschrieben. Die apikale Lokalisation von *pair-rule* und *wingless* in der Peripherie des Nukleus im Blastoderm des *Drosophila* Embryos erfolgt über einen Komplex, der gebunden an ein Dynein Motorprotein, über Mikrotubuli transportiert wird (Wilkie and Davis, 2001). So wie die *pair-rule* Transkripte werden auch RNAs wie *oskar*, *bicoid* und *gurken* in einer mikrotubuliabhängigen Weise transportiert.

### 1.3 Die Lokalisation von mRNA Molekülen am vegetalen Pol der *Xenopus* Oozyte

Ähnlich wie in *Drosophila* spielen maternale und lokalisierte mRNAs eine wichtige Rolle in der Entwicklung des *Xenopus* Embryos. Die ersten identifizierten lokalisierten mRNA Moleküle in der *Xenopus* Oozyte waren die in der animalen Hemisphäre angereicherten mRNAs *An1*, *An2*, *An3* und die am vegetalen Pol lokalisierte mRNA *Vgl* (Rebagliati et al., 1985), die in einer Suche nach unterschiedlich verteilten Transkripten entlang der vegetal/animalen Achse im *Xenopus* Ei isoliert wurden. Im Gegensatz zu den in der animalen Hemisphäre angereicherten RNAs, die dort nur um das Vierfache stärker verteilt sind als in der vegetalen Hemisphäre, ist das Verteilungsmuster und der Lokalisationsmechanismus der am vegetalen Pol der *Xenopus* Oozyte lokalisierten RNA besser untersucht. In Anbetracht der differenzierten räumlichen und zeitlichen Verteilungsmuster und der unterschiedlichen Rolle des Zytoskeletts während der RNA Lokalisation, kann man die Population der vegetal lokalisierten RNA während der *Xenopus* Oogenese in zwei Hauptgruppen unterteilen (siehe Abb.1.1 und Tabelle 1.1), wobei es eine dritte kleinere Gruppe von RNAs gibt, deren Verteilungsmuster Aspekte beider Wege aufweist (siehe auch Übersichtsartikel Kloc et al., 2001; Rand and Yisraeli, 2001).

Eine Gruppe der am vegetalen Pol der *Xenopus* Oozyte lokalisierten RNAs ist nach dem frühen Lokalisationsweg oder sogenannten METRO-Lokalisationsweg verteilt. Diese mRNA Moleküle, wie beispielsweise *Xcat2* und *DEADSouth* (Elinson et al., 1993; MacArthur et al., 2000; Mosquera et al., 1993), werden im Stadium I der Oogenese in der Spitze der mitochondrialen Wolke durch eine Kombination von Diffusion und das Einbehalten in bestimmten Strukturen der sogenannten „METRO“ („message transport organizer“) Region (Chang et al., 2004; Kloc and Etkin, 1995) lokalisiert. RNA Moleküle wie *Xcat2* oder auch *Xdazl* sind in den Keimgranulae in der METRO Region präsent (Kloc et al., 2000; Kloc et al., 1998), während die *Xlsirt* und *Xwnt11* RNAs nicht im Keimgranulae, sondern in einer fibrillären Matrix zwischen den Mitochondrien in der „METRO“-Region akkumulieren. Im späten Stadium I und frühen Stadium II der Oogenese beginnt die Migration der RNAs mit der mitochondrialen Wolke in Richtung des vegetalen Pols. Schließlich werden diese mRNAs in einer Mikrotubuli unabhängigen Weise zur Spitze des vegetalen Pols transportiert und dort in einem kleinen Bereich des vegetalen Kortexes abhängig von intakten Mikrofilamenten verankert (Kloc and Etkin, 1995; Kloc et al., 1996). Aufgrund der Assoziation vieler früh lokalisierter mRNAs mit dem Keimplasma schon während der Oogenese und einer späteren Expression in den

primordialien Keimzellen wird für diese eine Funktion in der Spezifikation der Keimzellen postuliert (Houston et al., 1998).



**Abb.1.1 Darstellung des frühen und späten vegetalen RNA Sortierungsweges in *Xenopus* Oozyten.**

A. Abbildung des frühen RNA Verteilungsweges. RNAs wie *Xcat2* und *Xpat* sind in Stadium I Oozyten in der mitochondrialen Wolke lokalisiert und migrieren dann mit der „METRO“ Region zum vegetalen Pol der Oozyte. B. Schemata und whole mount *in situ* Hybridisierungsbilder, die den späten mRNA Verteilungsweg zeigen. In Stadium I der Oogenese sind die mRNAs, wie beispielsweise *Vgl1*, homogen in der Oozyte verteilt, jedoch in der mitochondrialen Wolke ausgespart. Mit Beginn des Stadiums III der Oogenese akkumulieren die mRNAs in einer keilförmigen Struktur zwischen Kern und vegetalem Pol und werden Mikrotubuli abhängig zu diesem transportiert und dort verankert. (Abbildung verändert nach King et al., 1999; Kloc et al., 2001.)

Im Gegensatz zu den Keimplasma assoziierten mRNAs des frühen Lokalisationsweges ist für mRNA Moleküle, die über den mikrotubuliabhängigen späten Verteilungsweg lokalisieren, bisher keine Verbindung mit Keimplasma beschrieben worden (Kloc et al., 2000; Kloc et al., 1998). Während des Stadium I der *Xenopus* Oogenese sind mRNAs wie *Vgl* oder *VegT* (Rebagliati et al., 1985; Zhang and King, 1996) gleichmäßig in der gesamten Oozyte, mit Ausnahme des Bereiches der mitochondrialen Wolke, verteilt. Im späten Stadium II bzw. frühen Stadium III der Oogenese akkumuliert die mRNA in einem Bereich zwischen dem Kern und dem vegetalen Pol, der stark mit Mitochondrien und Vesikeln des endoplasmatischen Retikulums angereichert ist. Die mRNA befindet sich in Stadium III der Oogenese in einer keilförmigen Struktur in Richtung des vegetalen Pols, in einem Bereich, der mit den migrierenden frühen RNAs überlappt. Ab dem Stadium IV der Oogenese wird schließlich die RNA am vegetalen Pol verankert. Zunächst lokalisiert die RNA in einem kleineren Bereich des vegetalen Pols und okkupiert schließlich aber den Kortex der gesamten vegetalen Hemisphäre.

Eine kleine Gruppe von vegetal lokalisierten mRNAs, zu denen die *fatvg* mRNA gehört, wird über einen Sortierungsweg lokalisiert, der Merkmale von beiden zuvor beschriebenen Wegen aufweist. Wie die mRNAs des späten Verteilungsweges ist die *fatvg* mRNA im Stadium I der Oogenese gleichmäßig verteilt, aber in der Region der mitochondrialen Wolke ausgespart. Allerdings ist im Stadium II eine Lokalisation der mRNA in der „METRO“-Region der mitochondrialen Wolke ähnlich der früh lokalisierten mRNAs zu beobachten. Später ist die RNA in der keilförmigen, Mitochondrien und ER reichen Region zwischen Kern und Oozytenkortex zu finden, die typisch ist für die spät lokalisierten mRNAs. Schließlich ist die *fatvg* mRNA auch in dem für späte mRNAs charakteristischen Verteilungsmuster in der gesamten vegetalen Hemisphäre verankert. Interessanterweise konnte für die *fatvg* mRNA eine Assoziation mit dem Keimplasma nachgewiesen werden, die bislang normalerweise nur für früh lokalisierte mRNAs gezeigt werden konnte (Chan et al., 2001; Kloc et al., 2001; Kloc et al., 2002).

**Tabelle 1.1 Auflistung der am vegetalen Pol der *Xenopus* Oozyte lokalisierten RNAs nach ihrem Verteilungsweg und einer möglichen Funktion**

***Früh lokalisierte RNAs***

<b>RNA</b>	<b>Struktur/Funktion</b>	<b>Referenz</b>
Xcat2	Zinkfinger RNA Bindeprotein	(Kloc and Etkin, 1995)
XNIF	NIF-Domänen Protein	(Claussen et al., 2004)
DEADSouth	RNA Helikase	(MacArthur et al., 2000)
Xlsirts	nichtkodierende RNAs	(Kloc et al., 1993)
Xpat	unbekannt	(Hudson and Woodland, 1998)
Xdazl	RNA Bindeprotein, Migration primordialier Keimzellen	(Houston et al., 1998)
Xwnt11	Wnt Signaltransduktion	(Ku and Melton, 1993b)
XFACS	Fettsäurestoffwechsel	(King et al., 1999)
Xotx1	Transkriptionsfaktor, Neuralentwicklung	(Pannese et al., 2000)
XPACE4	Mesoderminduktion	(Birsoy et al., 2005)
Germes	DNA Bindeprotein	(Berekelya et al., 2003)

***Spät lokalisierte RNAs***

<b>RNA</b>	<b>Struktur/Funktion</b>	<b>Referenz</b>
Vg1	TGF $\beta$ Signaltransduktion	(Rebagliati et al., 1985)
VegT	T-Box Transkriptionsfaktor, Endodermentwicklung, Mesoderminduktion	(Stennard, 1998; Zhang et al., 1998; Zhang and King, 1996)
XBicaudalC	RNA Bindeprotein, Endoderminduktion	(Wessely and De Robertis, 2000)
$\beta$ -TrCP-2, -3	unbekannt	(Hudson et al., 1996)
XVelol	unbekannt	(Claussen and Pieler, 2004)
C3H3	Zinkfinger Bindeprotein	(De et al., 1999)
XPTB/xARH	Phosphotyrosin Bindeprotein, Vitellogeninaufnahme	(Chen et al., 2003; King et al., 1999; Zhou et al., 2003)

***Intermediär lokalisierte RNAs***

<b>RNA</b>	<b>Struktur/ Funktion</b>	<b>Referenz</b>
Hermes	RNA Bindeprotein, Zellteilungsregulation der vegetalen Blastomere	(Gerber et al., 1999; Zearfoss et al., 2004)
fatvg	Adipophilin ähnlich	(Chan et al., 1999)
Xlerk	Eph Ligand	(Jones et al., 1998; Jones et al., 1997)

## 1.4 Elemente des signalvermittelten RNA Lokalisationmechanismus während der *Xenopus* Oogenese

### 1.4.1 RNA Lokalisationssignale

Der initiale Schritt für die Lokalisation der RNA nach der Transkription im Zellkern ist über *cis*-agierende Elemente der RNA festgelegt. Diese spezifizieren somit die subzelluläre Lokalisation und sind Bereiche, an die *trans*-agierende Faktoren binden, die wiederum den aktiven Transport entlang des Zytoskeletts, die Verankerung oder eine differenzierte Regulation der mRNA Stabilität und der translationalen Kontrolle vermitteln. Bis auf einige Ausnahmen, beispielsweise die in der *Xenopus* Oozyte früh lokalisierte *XNIF* mRNA (Claussen et al., 2004), oder auch der *Ash1* mRNA, die in der knospenden Hefetochterzelle lokalisiert (Chartrand et al., 1999), wurden die meisten *cis*-agierenden Sequenzen im 3'-untranslatierbaren Bereich der mRNA identifiziert. In *Xenopus* konnten mittlerweile Sequenzen, die eine Lokalisation am vegetalen Pol der Oozyte vermitteln, für neun vegetal lokalisierte RNAs identifiziert werden. Die Analyse des Lokalisationselementes der über den frühen Verteilungsweg lokalisierten mRNA *Xcat2* ergab die Identifikation von zwei unabhängigen Lokalisationssignalen. Eines der Elemente am Anfang des 3'-UTRs ist notwendig für die Lokalisation in der mitochondrialen Wolke und die Lokalisation am vegetalen Pol der Oozyte (Zhou and King, 1996a; Zhou and King, 1996b). Dieses Lokalisationssignal kann nach Injektion der RNA in spätere Oozytenstadien auch eine Verteilung nach dem Muster der spät lokalisierten RNAs vermitteln. Ein weiteres Lokalisationssignal, das GGLE („germinal granule“ Lokalisationselement), wurde am Ende des 3'-UTRs identifiziert. Dieses ist für die Lokalisation der *Xcat2* mRNA in den Keimgranulae der mitochondrialen Wolke essentiell (Kloc et al., 2000).

Eine der ersten identifizierten und genau untersuchten *cis*-agierenden Sequenzen in *Xenopus* war das *Vg1* mRNA Lokalisationselement (Vg1-LE) (Mowry and Melton, 1992). Mit Hilfe von Injektionsexperimenten konnte demonstriert werden, daß die vegetale Lokalisation der *Vg1* RNA über ein 340 Nukleotide umfassendes Fragment des 3'-UTRs vermittelt wird. Der Versuch dieses Lokalisationselement genauer einzugrenzen und zu charakterisieren, zeigte eine komplexe Struktur (Gautreau et al., 1997). So können kleine Deletionen innerhalb der Sequenz die Lokalisation der *Vg1* mRNA nicht unterbinden. Weiterhin zeigte sich, daß das 340 Nukleotide umfassende Fragment aus zwei

Subelementen besteht und schon die Verdopplung des 5'-liegenden Subelementes ausreichend für eine vegetale Lokalisation ist. Das Vg1-LE enthält außerdem einige redundante kurze Elemente wie das E2-Element (UUCAC) und das VM1-Element (UUUCUA), sowie ähnliche, die vermutlich kritisch für eine vegetale Lokalisation der RNA sind. Mutationen dieser repetitiven Elemente führen zu einer Unterbindung der vegetalen Lokalisation der *Vg1* mRNA (Deshler et al., 1998).

*Cis*-agierende Sequenzen weisen somit häufig eine große Komplexität auf. Außerdem wurde gezeigt, daß das redundante Auftreten repetitiver kurzer Motive in dem für die subzelluläre Lokalisation verantwortlichen Teil der RNA Sequenz einen bedeutenden Einfluß auf die Lokalisation der mRNA hat, bzw. die Clusterbildung dieser Motive nur charakteristisch für lokalisierte RNAs ist (Betley et al., 2002).

Andererseits können RNA Moleküle anders als DNA Moleküle komplexe Sekundär- und Tertiärstrukturen ausbilden, die schließlich für die Bindung an Proteine verantwortlich sein könnten. Die möglicherweise wichtige Funktion der RNA Sekundär bzw.-Tertiärstruktur für eine Lokalisation der RNA, konnte bisher experimentell nur für sehr wenige Beispiele gezeigt werden. Die am anterioren Pol der *Drosophila* Oozyte lokalisierte mRNA *bicoid* ist ein Beispiel für die Existenz komplexer Sekundärstrukturen ausbildender *cis*-agierender Sequenzen. Die 3'- untranslatierbare Region der *bicoid* RNA läßt sich in fünf charakteristische und unabhängige Domänen mit unterschiedlicher Funktion für die Lokalisation, die translationelle Regulation und für die zeitabhängige Degradation des Transkripts unterteilen (Brunel and Ehresmann, 2004; Ferrandon et al., 1997; Macdonald and Kerr, 1997; Macdonald and Kerr, 1998; Wagner et al., 2001). Haarnadelstrukturen ausbildende Bereiche der Domäne IV und V sind essentiell für den Transport während der Oogenese. Außerdem konnte gezeigt werden, daß durch die intramolekulare Interaktion zwischen den Stämmen A und B der Domäne III eine dreidimensionale Struktur ausgebildet wird, die wichtig für die Bindung des *Drosophila* Staufen Proteins, einem *trans*-agierenden Faktors, ist.

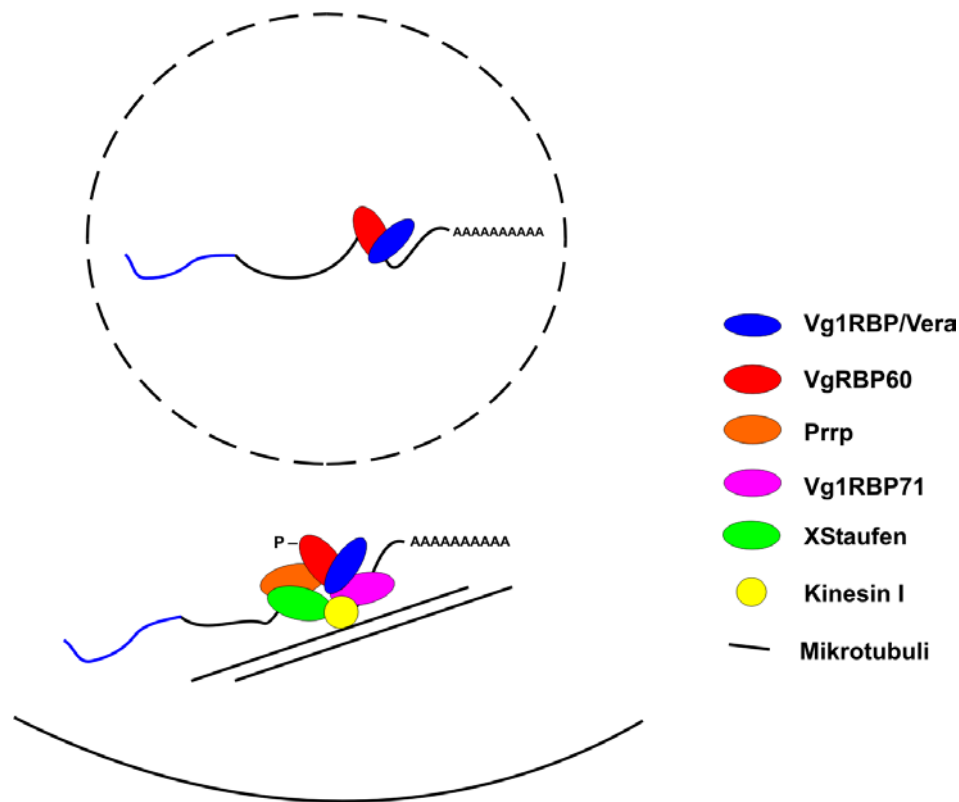
#### 1.4.2 RNA assoziierte Faktoren

Die erfolgreiche Lokalisation von mRNAs benötigt Faktoren, die an Bereiche der Lokalisationssignale binden. Einer der ersten *trans*-agierenden Faktoren, für den eine Funktion in der RNA Lokalisation nachgewiesen werden konnte, ist das RNA Bindeprotein Staufen mit einer evolutionär konservierten Funktion in der RNA Lokalisation. Mittlerweile ist bekannt, daß *Drosophila* Staufen in den Transport der *bicoid*

und *oskar* mRNA während der Oogenese und der *prospero* mRNA im Neuroblasten involviert ist (Broadus and Doe, 1997; Broadus et al., 1998; Schupbach and Wieschaus, 1986; St Johnston et al., 1991). In Säuger hippocampalen Neuronen ist Staufen als Bestandteil granulärer RNA Transportpartikel identifiziert worden (Kiebler et al., 1999; Kohrmann et al., 1999). Erst kürzlich konnte außerdem gezeigt werden, daß das *Xenopus* Staufen Protein an das Vg1-Lokalisationselement bindet und essentiell für die korrekte Lokalisation von *Vg1* mRNA ist (Yoon and Mowry, 2004). Während *cis*-agierende Sequenzen für eine beträchtliche Anzahl vegetal lokalisierter RNAs in *Xenopus* identifiziert werden konnten, sind die mit diesen interagierenden Proteine nur in einigen Fällen isoliert worden. So konnten sechs Proteine identifiziert werden, die spezifisch mit dem Vg1-Lokalisationselement interagieren und vermutlich eine Rolle in der Lokalisation der mRNA spielen (Abb.1.2). Vg1RBP oder Vera war das erste an das Vg1-LE bindende Protein, das isoliert wurde (Deshler et al., 1997; Havin et al., 1998; Schwartz et al., 1992). Auch ist das Vg1RBP/Vera Protein strukturell und funktionell konserviert. Das zu 78 % identische Protein ZBP-1 ist an der Mikrofilament-abhängigen Lokalisation von  $\beta$ -Aktin in Hühnerfibroblasten beteiligt (Ross et al., 1997). Ein weiteres an *Vg1* mRNA bindendes Protein ist das *Xenopus* Homolog des hnRNP I oder PTB Proteins („polymyridine tract-binding protein“), das VgRBP60 Protein (Cote et al., 1999). Ein *Vg1* RNA bindendes Protein, das möglicherweise eine Assoziation der *Vg1* RNA mit den Mikrofilamenten der *Xenopus* Oozyte durch Bindung mit Profilin erzeugt, ist das Prrp Protein („proline rich protein“) (Zhao et al., 2001). Ein weiteres *Vg1* RNA bindendes Protein, VgRBP71 (Kolev and Huber, 2003; Kroll et al., 2002), spielt vermutlich eine Rolle in der translationellen Derepression der *Vg1* mRNA durch die Stimulierung der Abtrennung des translationellen Repressorelementes. Wie oben bereits erwähnt, wurde kürzlich das *Xenopus* Staufen Protein als *Vg1* interagierendes Protein und Bestandteil des Vg1- Transportpartikels identifiziert (Yoon and Mowry, 2004). Außerdem konnte gezeigt werden, daß *Xenopus* Staufen mit Kinesin I assoziiert ist und somit vermutlich als Adaptor zwischen Motorprotein und RNA dienen könnte. Erst kürzlich wurde einem hetero-trimerem Kinesin II (Betley et al., 2004) eine wichtige Rolle im Transport der *Vg1* mRNA zugewiesen. Während nach Injektion einer dominant-negativen Variante des Kinesins II eine Mislokalisierung der *Vg1* mRNA beobachtet werden konnte, blieb aber die Frage offen, wie dieses Kinesin II mit der *Vg1* mRNA assoziiert ist. Durch eine Reihe von UV-Quervernetzungs experimenten mit RNA Lokalisationssignalen des frühen und des späten Verteilungsweges konnten weitere für beide Verteilungswege identische und für den



frühen Weg zusätzliche Proteine identifiziert werden, deren molekulare Identität aber noch nicht ermittelt wurde (Claussen et al., 2004; Mowry, 1996).



**Abb.1.2 Darstellung von *trans*-agierenden Faktoren, die an das Vg1-Lokalisationselement binden und somit vermutlich eine Rolle in der vegetalen Lokalisation von *Vg1* RNA inne haben.**

Zunächst assoziieren Vg1RBP/Vera und VgRBP60 (RNA unabhängig) im Zellkern der *Xenopus* Oozyte und binden an die *Vg1* mRNA. Nach dem Export des Komplexes in das Zytoplasma assoziiert das Prrp Protein in RNA abhängiger Weise mit dem *Vg1*/Vg1RBP/VgRBP60 Komplex. Weitere Proteine wie VgRBP71 und XStaufen binden an die *Vg1* RNA. Um den Transport des Komplexes zum vegetalen Pol entlang von Mikrotubuli zu ermöglichen, assoziiert ein konventionelles Kinesin Protein mit dem Komplex über eine Bindung an XStaufen. (Abbildung nach Kress et al., 2004; Kroll et al., 2002; Yoon and Mowry, 2004).

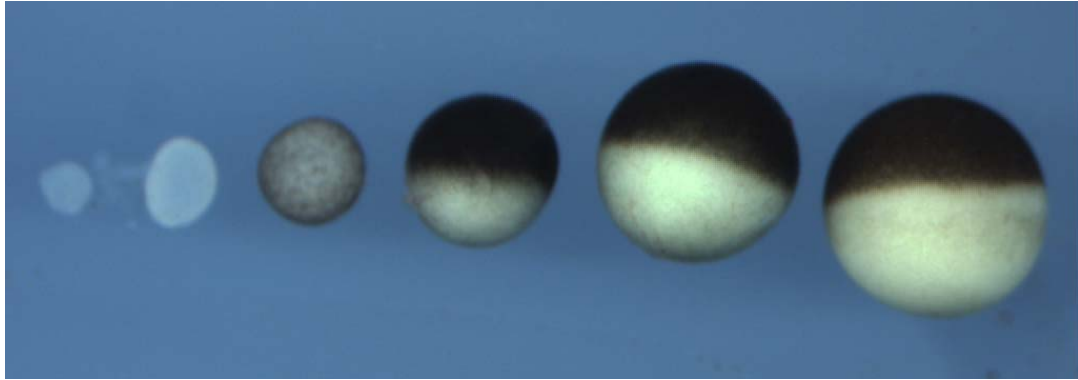
### 1.4.3 Elemente des Zytoskeletts

Eine weitere wichtige Komponente der RNA Lokalisationsmaschinerie scheint das Zytoskelett der *Xenopus* Oozyte zu sein, wobei direkte experimentelle Beweise bislang nur selten erbracht werden konnten. Die *Xenopus* Oozyte weist ein komplexes Zytoskelett bestehend aus Mikrotubuli, Aktinfilamenten und Keratinfilamenten auf, deren Organisation voneinander abhängig ist. So benötigt die Ausbildung des kortikalen

Aktinskeletts vermutlich die Verankerung mit dem Mikrotubuli- und Keratinnetzwerk (Gard et al., 1997). Eine Rolle des Zytoskeletts bei der vegetalen Lokalisation von RNAs konnte für die Lokalisation der *Vg1* RNA gezeigt werden. Durch die Verwendung von Inhibitoren wurde die Rolle der Mikrotubuli und Aktinfilamente in der mRNA Lokalisation getestet (Yisraeli et al., 1990). Die Zerstörung der Mikrotubuli verhindert die korrekte Lokalisation der *Vg1* mRNA und liefert somit einen Hinweis darauf, daß die Verteilung der *Vg1* mRNA über den späten Verteilungsweg Mikrotubuli abhängig ist. Die Behandlung von Oozyten mit Cytochalasin B, welches die Mikrofilamente zerstört, zeigte die Abhängigkeit der Verankerung vegetal lokalisierter mRNAs von einem intakten Aktinnetzwerk. Eine mögliche Funktion von Mikrotubuli im Transport von spät lokalisierten RNAs und die Verankerung der RNAs über Mikrofilamente korreliert außerdem mit der jeweiligen Lokalisation der Zytoskelettelemente in der Oozyte. So sind in Stadium III Oozyten, zum Zeitpunkt der Lokalisation der RNAs des späten Verteilungsweges, die Mikrotubuli radial vom Keimbläschen in Richtung des Kortex ausgerichtet, und Mikrofilamente befinden sich fast ausschließlich am Kortex der Oozyte (Gard, 1991; Gard, 1994; Yisraeli et al., 1990). Auch RNAs, die über den sogenannten „METRO“ oder frühen Lokalisationsweg zum vegetalen Pol der Oozyte gelangen, werden vermutlich über Mikrofilamente am vegetalen Kortex verankert (Kloc and Etkin, 1995). So konnte auch für die früh lokalisierende *Xcat2* mRNA eine Anreicherung in einer Detergenzien unlöslichen RNA Fraktion nachgewiesen werden. Dieses deutet wiederum darauf hin, daß *Xcat2* mit dem kortikalen Zytosklett, den Aktinfilamenten, verbunden ist. Allerdings kann die Lokalisation der frühen RNAs nicht durch die Zerstörung der Mikrotubuli unterbunden werden (Kloc et al., 1996).

### **1.5 Die *Xenopus laevis* Oogenese**

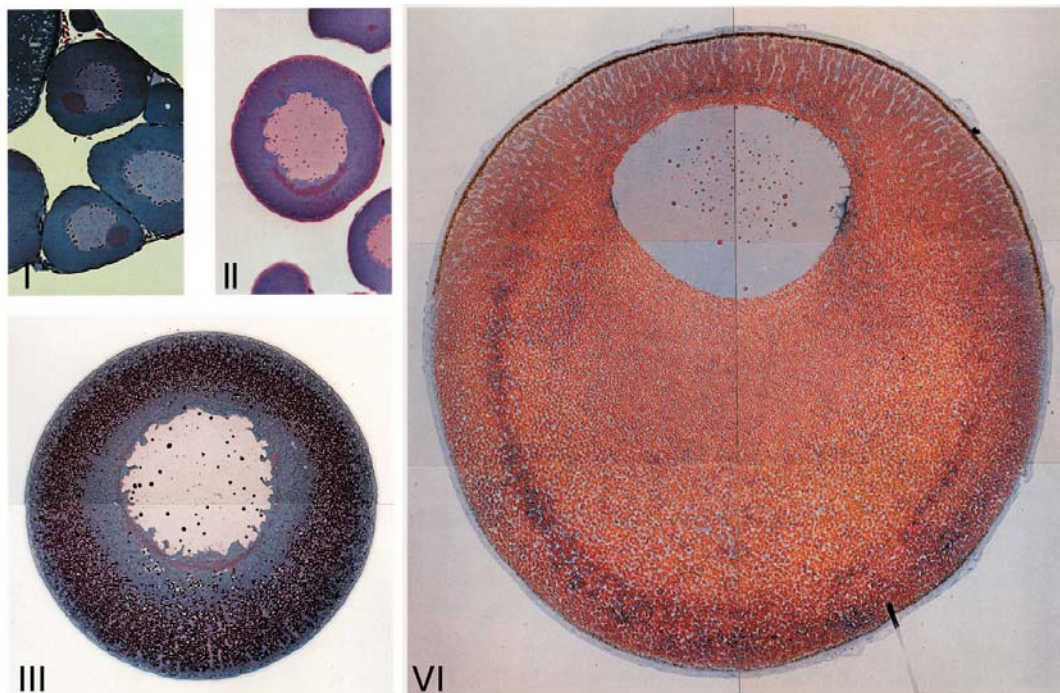
Abhängig von der Größe der Oozyte und deren Erscheinungsbild läßt sich die *Xenopus* Oogenese in sechs unterschiedliche Stadien aufteilen (Dumont, 1972)(Abb 1.3). Im Verlauf der Oogenese bildet sich eine primäre Asymmetrie aus, die durch die unterschiedliche Pigmentierung der animalen und vegetalen Hälfte, durch die Lage des Kerns in der animalen Hälfte und durch die ungleiche Verteilung bestimmter maternaler Faktoren gekennzeichnet ist.



**Abb.1.3 Die *Xenopus laevis* Oogenese ist in sechs unterschiedliche Stadien eingeteilt.**

Stadium I Oozyten (50-300  $\mu\text{m}$ ) zeigen eine deutliche Transparenz des Zytoplasmas. In der sich entwickelnden Oozyte wird zunehmend Vitellogenin in den Dotterschollen eingelagert. Außerdem wird während der Oogenese der animal/vegetale Pigmentgradient ausgebildet. Stadium VI Oozyten (1200-1300  $\mu\text{m}$ ) weisen die Ausbildung eines charakteristischen unpigmentierten äquatorialen Ringes auf.

Stadium I Oozyten sind durch ihr transparentes Zytoplasma gekennzeichnet und haben einen Durchmesser von 50-300  $\mu\text{m}$ . In diesem Stadium ist der Zellkern und die mitochondriale Wolke sehr gut sichtbar (Abb.1.3 und 1.4). Im Stadium II (300 –450  $\mu\text{m}$ ) der Oogenese wird die mitochondriale Wolke fragmentiert und Teile davon gelangen zum vegetalen Pol. Mit dem Stadium III (450-600  $\mu\text{m}$ ) der Oogenese beginnt die zunächst gleichmäßige Pigmentierung der Oozyten. Außerdem wird ab diesem Zeitpunkt durch Pinozytose das Speicherprotein Vitellogenin aufgenommen und teilweise als Phosphitin und Lipovitellin in den Dotterschollen gespeichert. Stadium IV Oozyten weisen schon eine deutlich stärkere Verteilung der Pigmentgranulae in der animalen Hälfte der Oozyte auf. Im Stadium V der Oogenese haben die Oozyten eine Größe von 1000-1200  $\mu\text{m}$  erreicht. Die Dotterschollen sind asymmetrisch verteilt und der Zellkern ist nun deutlich in der animalen Hemisphäre positioniert (Abb. 1.4). Charakteristisch für Stadium VI Oozyten, die ihre endgültige Größe von 1300  $\mu\text{m}$  erreicht haben, ist ein zwischen der sehr stark pigmentierten animalen Hälfte und der schwach pigmentierten vegetalen Hälfte gelegener unpigmentierter schmaler Bereich am Äquator der Oozyte.



**Abb.1.4 Histologische Schnitte verschiedener *Xenopus* Oozytenstadien.**

Der animale Pol ist in den Abbildungen (Stadien II, III und VI) nach oben ausgerichtet. In Stadium I Oozyten ist die mitochondriale Wolke unterhalb des Keimbläschens sichtbar. Die Abbildung der Stadium III Oozyten zeigt die in granulären Strukturen sichtbare Ansammlung der Dotterschollen. In der Stadium VI Oozyte sind die eingelagerten Pigmentgranulae der animalen Hemisphäre zu erkennen. (Abbildung entnommen aus Hausen und Riebesell, 1991)

## 1.6 Das Keimplasma und die primordiale Keimzellentwicklung in *Xenopus*

Trotz großer Diversität verläuft der Prozeß der Keimzellenspezifikation in Eizellen und Spermien in vielen Organismen nach ähnlichen Mustern ab. Außerhalb der Gonaden werden früh in der Embryogenese die Keimzellvorläuferzellen gebildet, die später in die Gonaden einwandern und nach Proliferation und Differenzierung sich zu funktionellen Gameten entwickeln. In *Xenopus* ist für die Ausbildung der Keimzellvorläuferzellen oder auch primordialen Keimzellen die asymmetrische Verteilung maternaler Keimzell-determinanten, lokalisiert in einem zytologisch einzigartigem Bereich des Zytoplasmas, im sogenannten Keimplasma, charakteristisch (siehe auch Kapitel 1.3).

Bislang ist eine kleine Gruppe maternaler RNAs identifiziert worden, die spezifisch im Keimplasma lokalisiert sind (Tab 1.2). Bislang ist allerdings die Funktion dieser Faktoren ungeklärt. Nur für das *Xenopus* Dazl konnte eine Funktion während der Keimzellenentwicklung gezeigt werden (Houston and King, 2000a).

**Tabelle 1.2 Liste der im *Xenopus* Keimplasma lokalisierten Moleküle**

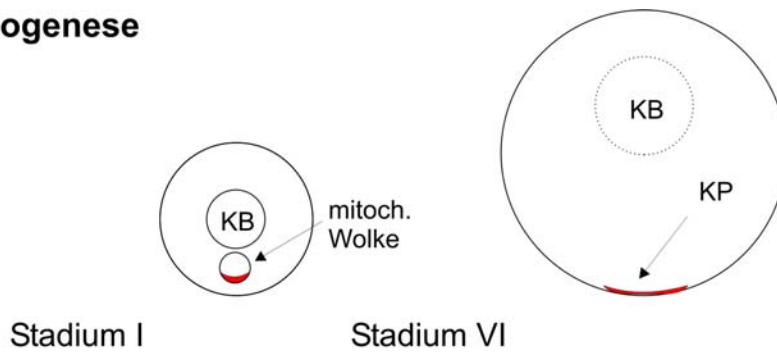
<i>RNA/Protein</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Referenz</i>
Xcat2	Zinkfingerprotein exprimiert im Keimplasma des Gastrulationsstadiums	(Kloc et al., 1998; Mosquera et al., 1993)
mtlrRNA	Keimplasma und Keimgranulae	(Kobayashi et al., 1998)
Xlsirts	nicht kodierende RNAs	(Kloc et al., 1998; Kloc et al., 1993)
Xwnt11	sezerniertes Signalprotein	(Kloc et al., 1998; Ku and Melton, 1993a)
DEADSouth	RNA Helikase	(MacArthur et al., 2000)
Xpat	unbekannt	(Hudson and Woodland, 1998)
Xdazl	RNA Bindeprotein, involviert in Keimzellentwicklung	(Houston and King, 2000a; Houston et al., 1998)
germes	Leucin-zipper Protein	(Berekelya et al., 2003)

Die Struktur des Keimplasmas in Amphibien, die erstmalig 1939 von Bounoure und später detaillierter von (Whittington and Dixon, 1975) beschrieben wurde, ist ein Mitochondrien reiches, mit elektrotronendichten Komponenten angereichertes und Keimgranulae enthaltendes spezielles Zytoplasma. In Stadium I Oozyten befindet sich das sogenannte Keimplasma an der vegetalen Spitze der mitochondrialen Wolke (Abb1.5). In den Stadien II und III der Oogenese wird das Keimplasma in den inselartigen Fragmenten der mitochondrialen Wolke zum vegetalen Pol der Oozyte gebracht. Nach der Fertilisation des Eis fusionieren die einzelnen Keimplasmainseln zu größeren Aggregaten, die durch die nachfolgenden Zellteilungen auf die vegetalen Blastomere aufgeteilt werden (Abb.1.5). Die Aggregation des Keimplasmas ist vermutlich abhängig von Mikrotubuli (Ressom and Dixon, 1988) und von der Aktivität eines Kinesin ähnlichen Proteins, Xklp-1 (Robb et al., 1996). Ab diesem Zeitpunkt ist das Keimplasma mit der Zellmembran assoziiert (Abb 1.5). Während der Gastrulation ändert sich die Position des Keimplasmas innerhalb der Keimplasma enthaltenden Zellen. Durch eine perinukleäre Lokalisation wird das Keimplasma nun gleichmäßig bei der Zellteilung an die Tochterzellen verteilt und eine stabile Population primordialer Keimzellen wird etabliert. In Gastrula- und Neurulastadien folgen die primordialen Keimzellen der normalen morphogenetischen Bewegung des Endoderms und akkumulieren schließlich im posterioren Endoderm (Abb.1.5).

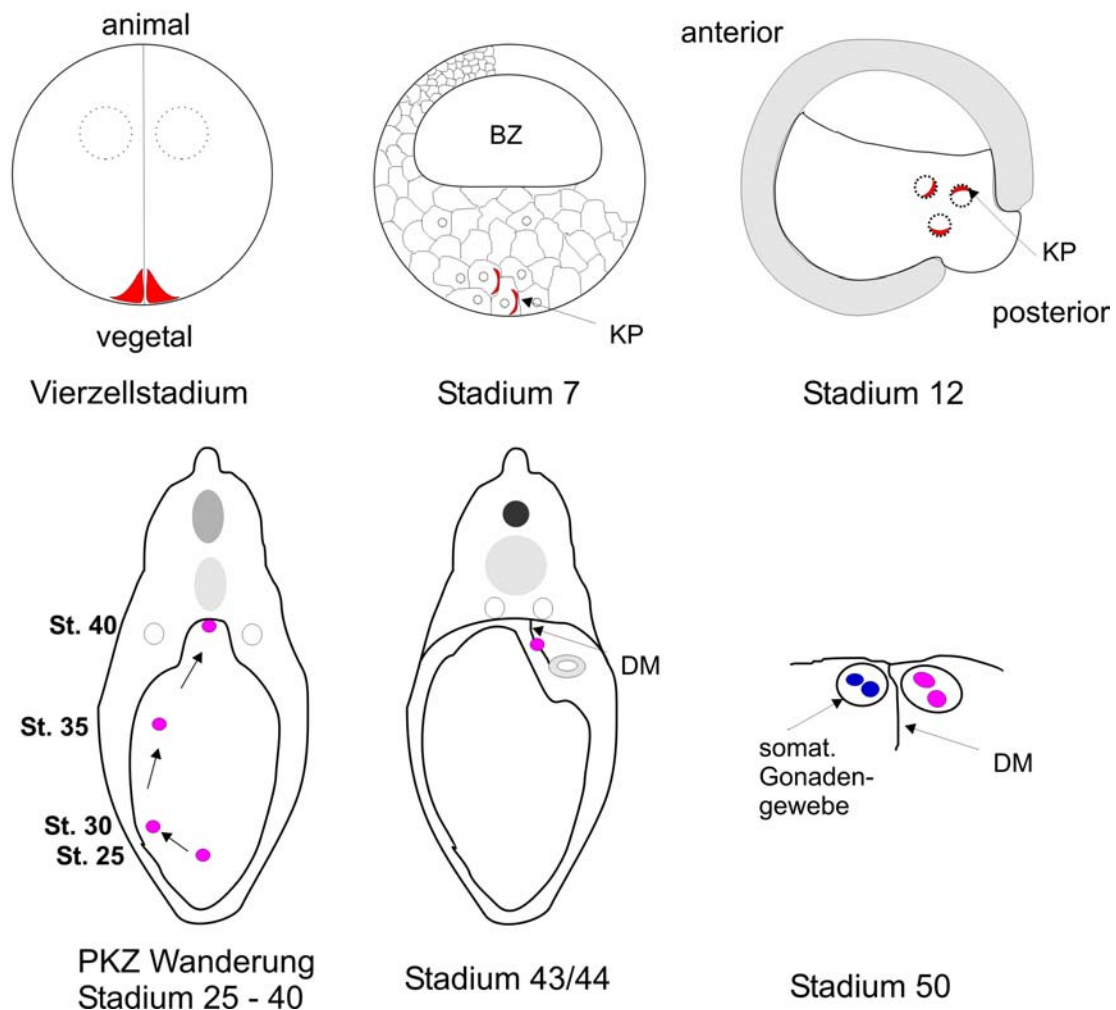
Während der Stadien 17 bis 25 der Embryogenese werden die primordialen Keimzellen in einem oder zwei Zellclustern im Endoderm unter der Höhle des Archenteron positioniert. Ab dem Stadium 28 scheint eine aktive Migration der primordialen Keimzellen im

Endoderm in Richtung des dorsalen Kamms einzusetzen. Im Stadium 43 verlassen die primordialen Keimzellen das Endoderm und erreichen das dorsale Mesenterium. Schließlich bewegen sie sich in lateraler Richtung und assoziieren mit den Vorläufern der somatischen Gonadenzellen und bilden die Gonaden aus (Stadium 50) (Wylie and Heasman, 1976) (Abb.1.5).

### Oogenese



### Embryogenese



**Abb.1.5: Die Entwicklung der Keimzellen in *Xenopus laevis*.**

Das Keimplasma (KP) akkumuliert zunächst in der mitochondrialen Wolke in Stadium I Oozyten und ist später am vegetalen Kortex der Oozyte lokalisiert. Während der ersten Zellteilungen nach der Befruchtung des Eis ist das Keimplasma in inselförmigen Strukturen am vegetalen Pol der Blastomere konzentriert. Im Blastulastadium bleibt das Keimplasma zunächst assoziiert mit der Plasmamembran der vegetalen Blastomere. Während der Gastrulation lokalisiert das Keimplasma perinukleär und die Gastrulationsbewegung positioniert die primordialen Keimzellen (PKZ) im posterioren Endoderm. Die PKZ verbleiben in der Region bis die Migration im Schwanzknospenstadium einsetzt. Mit dem Stadium 25 der Embryogenese beginnen die primordialen Keimzellen zunächst in lateraler Richtung und dann dorsal zu migrieren, bis sie im Stadium 40 den dorsalen Kamm des Endoderms erreichen. Mit dem Stadium 43/44 verlassen die primordialen Keimzellen das Endoderm und wandern entlang des dorsalen Mesenteriums zur dorsalen „Körperwand“. Anschließend wandern sie in lateraler Richtung und assoziieren mit den somatischen Gonadenvorläuferzellen und formen schließlich die Keimdrüsen. KB, Keimbläschen; KP, Keimplasma (rot); Blastozoele, BZ; PKZ, primordiale Keimzellen (magenta); DM, dorsales Mesenterium (Abbildung nach Houston and King, 2000b).

**1.7 Fragestellung der Arbeit**

Am vegetalen Pol der *Xenopus* Oozyte lokalisierte RNA Moleküle stellen maternale Faktoren dar, die essentiell für die Entwicklung des Embryos sind. Mit dem Ziel, eine möglichst große Zahl dieser wichtigen Transkripte zu isolieren, sollte eine mit vegetalkortikal lokalisierten Transkripten angereicherte *Xenopus* Oozyten cDNA Bibliothek im großen Maßstab basierend auf der differenziellen Hybridisierung von Macro- bzw. Microarrays und einer sich anschließenden whole mount *in situ* Hybridisierung durchsucht werden. Einzelne auf diese Weise identifizierte neue vegetal lokalisierte Transkripte sollten im Hinblick auf eine mögliche Funktion in der Entwicklung des *Xenopus* Embryos untersucht werden. Um mehr Erkenntnisse über den Transportmechanismus vegetal lokalisierter RNAs zu gewinnen, sollte außerdem der für eine vegetale Lokalisation notwendige Bereich der RNA identifiziert werden, und die an diesen Bereich bindenden Proteine, die möglicherweise am Transport der RNA beteiligt sind, analysiert werden.

## 2 Materialien, Methoden und Klonierungen

### 2.1 Organismen

#### 2.1.1 *Xenopus laevis*

Der Afrikanische Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) gehört zu der Familie der zungenlosen Froschlurche (*Pipidae*) der Ordnung *Anura*. Pigmentierte und Albino-Frösche wurden von Dipl.-Ing. Horst Kähler (Hamburg) und der Firma Nasco (Ft. Atkinson, USA) erworben. Die Tiere wurden gemäß den Tierschutzbestimmungen gehalten und behandelt. Die Bestimmung der Embryonalstadien erfolgte nach (Nieuwkoop and Faber, 1967).

#### 2.1.2 *Escherichia coli*-Stämme

Es wurden *Escherichia coli*-Stämme der folgenden Genotypen verwendet (Stratagene GmbH, Heidelberg; New England Biolabs, Schwalbach/Taunus):

**XL1-Blue:** *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F' proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15, Tn10(Tet<sup>r</sup>)]<sup>c</sup>*

**XL1-Blue MRF':** *Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1 lac[F' proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15, Tn10(Tet<sup>r</sup>)]<sup>c</sup>*

**XLOLR:** *Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, thi-1, recA1, gyrA96, relA1 lac[F' proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15, Tn10(Tet<sup>r</sup>)]<sup>c</sup>, Su<sup>-</sup> (nonsuppressing), λ<sup>r</sup> (lambda resistant)*

**BM25.8:** *supE44, thi Δ(lac-proAB) [F' traD36, proAB<sup>+</sup>, lacI<sup>q</sup>Z ΔM15] limm434 (kan<sup>R</sup>)P1 (cam<sup>R</sup>) hsdR (r<sub>k12</sub>-m<sub>k12</sub>-)*

### 2.2 Chemikalien

Biochemische Feinchemikalien wurden von den Firmen, Sigma, Roth, Serva und Biomol bezogen. Alle anderen Chemikalien stammten von den Firmen Sigma, Baker oder Merck und wiesen den höchsten Reinheitsgrad (p.A.) auf.

### 2.3 Gebrauchswaren und Geräte

Gebrauchswaren und Geräte wurden, soweit nicht anders erwähnt, von den folgenden Firmen bezogen: Abimed (Hannover), Eppendorf (Hamburg), Falcon (Heidelberg), Schütt (Göttingen), Greiner (Frickhausen), Kranich (Göttingen), Qiagen (Hilden), Sarstedt (Langenhagen), Siemens (Hannover).

Microinjector 5242 (Eppendorf, Hamburg), Nadelzieher (Leitz, Wetzlar), UNOII Thermoblock (Biometra, Göttingen), TRIO Thermoblock (Biometra, Göttingen), Stereomikroskop (Stemi SV6, Zeiss, Oberkochen), Kameraaufsatz (MC80, Zeiss, Oberkochen), Fotomikroskop (Axioskop, Zeiss, Oberkochen), Vibratom (Typ 1000, Pelco International, Redding, California, USA), Mikrotom (Leica Instruments GmbH, Nussloch), Phosphoimager (Amersham Biosciences, Freiburg).



## 2.4 Computer-Software

Bild- und Graphikbearbeitung: Adobe Photoshop Version 7 (Adobe Systems Europe Ltd., Edinburgh, Schottland); Macromedia Freehand Version 9 (Macromedia Inc., San Francisco, USA); Corel Draw Version 11 (Corel Corporation); ImageQuant Version 5.2 (Amersham Biosciences); Nukleotid- und Aminosäuresequenzbearbeitung: Lasergene-Softwarepaket (DNASTAR Inc., Madison, USA); BLAST-Datenbanksuchsystem (Altschul et al., 1990); Textverarbeitung: Microsoft Office 2000

## 2.5 Enzyme, Proteine, Nukleinsäuren und Reaktionssysteme (Kits)

### 2.5.1 Enzyme

Shrimps alkalische Phosphatase (1 U/ $\mu$ l): Roche, Mannheim  
Restriktionsendonukleasen: New England Biolabs GmbH, Schwalbach, Boehringer Mannheim, Mannheim  
RNAsin (40 U/ $\mu$ l): Promega Deutschland GmbH, Mannheim  
RNase A: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen  
RNase T1: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen  
Proteinase K: Merck KGaA, Darmstadt  
SP6 RNA-Polymerase (50 U/ $\mu$ l): Stratagene GmbH, Heidelberg  
T3 RNA-Polymerase (50 U/ $\mu$ l): Stratagene GmbH, Heidelberg  
T7 RNA-Polymerase (50 U/ $\mu$ l): Stratagene GmbH, Heidelberg  
*Taq* DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l): Qbiogene GmbH,  
*Pfu* DNA-Polymerase (2.5 U/ $\mu$ l): Stratagene GmbH, Heidelberg  
T4 DNA-Ligase (1 U/ $\mu$ l): New England Biolabs GmbH, Schwalbach  
Dnase I: Roche, Mannheim

### 2.5.2 Proteine

BSA: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

### 2.5.3 Nukleinsäuren

*E. coli* tRNAs: Roche, Mannheim

### 2.5.4 Reaktionssysteme (Kits)

PCR purification Kit: Qiagen GmbH, Hilden  
QIAEX Gel Extraction Kit: Qiagen GmbH, Hilden  
RNeasy Mini Kit: Qiagen GmbH, Hilden  
SP6, T3 und T7 mMACHINE mMACHINE Kits: Ambion Inc., Austin, USA  
pGEM-T Kit: Promega Deutschland GmbH, Mannheim

T<sub>N</sub>T-Coupled Reticulocyte Lysate System: Promega Deutschland GmbH, Mannheim

RNA *in vitro* Transcription Kit: Stratagene GmbH, Heidelberg

Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt

BD Atlas SMART™ Fluorescent Probe Amplification Kit, BD Bioscience Clontech, Palo Alto

Labelstar, Qiagen GmbH, Hilden

SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit, Qiagen, Hilden

High Prime, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

ECL Direct Nucleic Acid Labelling And Detection System, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

## 2.6 Molekulargewichtsstandards

1kb DNA ladder: Invitrogen, Karlsruhe

Broad-range Proteinmolekulargewichtsstandard, BioRad, München

Prestained Proteinmolekulargewichtstandart, BioRad, München

## 2.7 Radioisotopen

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP, Ci/mmol, mCi/ml, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-rUTP, 800 Ci/mmol, 20 mCi/ml, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

[<sup>14</sup>C]-methylierter Proteinstandard 5  $\mu$ Ci/ml, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

## 2.8 Medien und Lösungen

Alle nicht gesondert aufgeführten Medien und Pufferlösungen wurden nach {Sambrook, 1998 #812 hergestellt. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Lösungen mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt und durch Autoklavieren für 20 min bei 121°C sterilisiert. Hitzelabile Substanzen wurden durch Membranfilter (Porendurchmesser 0.2  $\mu$ m, Sartorius) sterilfiltriert. Nährmedien wurden nach dem Autoklavieren auf ca. 50°C abgekühlt und anschließend mit den entsprechenden Selektivantibiotika versetzt.

### 2.8.1 Nährmedien:

Luria-Bertani (LB)-Medium:

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

NZY-Medium:

NZY-Agar: 1.5% (w/v) Agar in NZY-Flüssigmedium

NZY-Top-Agar: 0.7% (w/v) Agar in NZY-Flüssigmedium

### 2.8.2 Antibiotika zur Selektion von Bakterienklonen:

Ampicillin: 50 mg/ml in dH<sub>2</sub>O, Verdünnung 1:1.000 (Endkonzentration: 50  $\mu$ g/ml)

Tetracyclin: 5 mg/ml in Ethanol, Verdünnung 1: 400 (Endkonzentration: 12.5 µg/ml)

Kanamycin: 10 mg/ml in dH<sub>2</sub>O, Verdünnung 1: 200 (Endkonzentration: 50 µg/ml)

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

### 2.8.3 Puffer und Stammlösungen

**TE Puffer (10x):** 100 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM EDTA

**Tris-HCl-Puffer (pH 7.5 - 9.5):** 1 M Tris-HCl, pH 7.5 - 9.5

**TBE (10 x):** 0.9 M Tris Base, 0.9 M Borsäure, 0.02 M EDTA

**PBS (10 x):** 8 % (w/v) NaCl, 2 % (w/v) KCl, 65 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O, 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2-7.4

**SSC (20 x):** 3 M NaCl, 0.3 M Na-Citrat, pH 7.2-7.4

**MgCl<sub>2</sub>-Lösung:** 1 M MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O

**MgSO<sub>4</sub>-Lösung:** 1 M MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O

**LiCl-Lösung:** 4 M bzw. 8 M LiCl

**NaCl-Lösung:** 5 M NaCl

**KCl-Lösung:** 1 M KCl

**Natrium-Azetat-Lösung:** 3 M NaCH<sub>3</sub>COO

**Natriumdihydrogenphosphat-Lösung:** 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 1 H<sub>2</sub>O

**Di-Natriumhydrogenphosphat-Lösung:** 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O

**Ethidiumbromid-Lösung:** 10 mg/ml Ethidiumbromid

**Ficoll:** 10 % (w/v) Ficoll, sterilfiltriert

**EDTA:** 0.5 M EDTA, pH 8.0

**Maltose-Lösung:** 20 % Maltose · H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert

**SDS-Lösung:** 10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat

**Tween-20-Lösung:** 20 % (v/v) Tween-20

**Denhardt's (100 x):** 2 % (w/v) BSA, 2 % (w/v) PVP, 2 % (w/v) Ficoll

### 2.9 Antikörper

**anti-Digoxigenin/AP (Roche, Mannheim):** Fab-Fragmente von Digoxigenin-spezifischen Antikörpern (aus Ziege), konjugiert mit alkalischer Phosphatase

**anti-Fluorescein/AP (Roche, Mannheim):** Fab-Fragmente von Fluorescein-spezifischen Antikörpern (aus Ziege), konjugiert mit alkalischer Phosphatase

**anti-c-Myc (9E10; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA):** Monoklonaler Antikörper (Maus), welcher spezifisch das Myc-Epitop von Fusionsproteinen bindet

### 2.10 Chromatographiematrizes

**Protein-G-Sepharose:** Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

## 2.11 Plasmide und Vektoren

**pBK-CMV:** Stratagene, GmbH, Heidelberg

**pTriplEx2:** Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg

**pGEM-T:** Promega Deutschland GmbH, Mannheim

**pCS2+MT:** {Rupp, 1994 #287}

**Xpat:** (Hudson and Woodland, 1998) 2kb des Xpat 3'-UTR im pBluescript Vektor; wurde nach Linearisierung mit *EcoRI* in einer T7-Promoter-vermittelten *in vitro* Transkriptionsreaktion zur Erstellung von *in situ*-Hybridisierungs antisense-Sonden benutzt.

**pMT-21:** (Zhao et al., 2001) Prrp cDNA wurde in die *BamHI*-Schnittstelle des pCS2+MT-Vektors eingefügt. Dieses im Retikulocytenlysat-System *in vitro* translatierbare Fusionsprotein besitzt am C-Terminus wiederholte myc-Epitope und wurde in Koimmunopräzipitationsanalysen verwendet.

**Vg1-RBP-his in pET-21a(+):** (Havin et al., 1998) cDNA des Vg1-RBPs; wurde zur Subklonierung in den pCS2+MT-Vektor verwendet.

**fl-L5 in pCS2+MT:** (Claussen et al., 1999) enthält die cDNA des ribosomalen Proteins L5 aus *Xenopus* in *in vitro* translatierbarer Form. Dieses Protein wurde als Negativkontrolle in den Koimmunopräzipitationsanalysen eingesetzt.

## 2.12 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg) und Sigma - Genosys bezogen. Die Sequenzen sind jeweils in 5' → 3'-Richtung angegeben. Üblicherweise wurden die Oligonukleotide im Synthesemaßstab 0,025 µmol und salzfrei angefordert.

### 2.12.1 Sequenzierungsprimer

Angegeben sind Sequenzierungsoligonukleotide, die zur Sequenzierung verschiedener Plasmide verwendet wurden.

T7-primer:	GTAATACGACTCACTATAGGGC
T3-primer:	AATTAACCCCTCACTAAAGGG
SP6-primer:	TTAGGTGACACTATAGAATAC
5'λTriplEx2Seq:	CTCCGAGATCTGGACGAGC
3'λTriplEx2Seq:	TAATACGACTCACTATAGGGC
5'λTriplEx2-LD:	CTCGGGAAGCGCGCCATTGTGTTGGT
3'λTriplEx2-LD:	ATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGCC
20-2:	GATGTTGTATTGTGGTCTGTCCG
20-3:	AGATAGGTCTTTGGTCTGCTGC
5'20-1:	TGGATTTCGATTTTGGTACCAAGT
5'20-2:	GTTAGTGCCACCATATGTGTGCG
5'22-1:	CTGCTTCTCTGTCCAGTAATC

22-2: CATTATGGCCGGGGGAAAAAGG  
 22-3: TGGCGACAAGTGTTGCACAGGA

### 2.12.2 (RT-)PCR-Oligonukleotide

Die angegebenen Oligonukleotide wurden zur Expressionsanalyse in Embryonalstadien und adulten Geweben sowie zur PCR-vermittelten Durchmusterung der Stadium V/VI Oozyten cDNA-Bibliothek benutzt. Die generellen Bedingungen der PCR-Reaktionen sind unter 2.15.8 angegeben. Oligonukleotidspezifische Bedingungen bezüglich der Anlagerungstemperatur, Amplifikationszyklenzahl und die resultierende Produktlänge sind unten angegeben.

#### 2.12.2.1 Klon 22 cDNA

22-2: CATTATGGCCGGGGGAAAAAGG  
 22-3: TGGCGACAAGTGTTGCACAGGA  
 Annealing-Temp.: 62°C  
 Zyklenzahl: 30  
 Produktlänge: 330 bp

#### 2.12.2.2 Klon 20 cDNA

20-F: AAAGAGACCCTGCTAAGTGCTGTC  
 20-R: CTTGCAGTGACGTCTCCAGTGAG  
 Annealing-Temp.: 63°C  
 Zyklenzahl: 28  
 Produktlänge: 300 bp

#### 2.12.2.3 H4 (Kontrolle)

H4-F: CGGGATAACATTCAGGGTATCACT  
 H4-R: ATCCATGGCGGTAAGTGTCTTCCT  
 Annealing-Temp.: 56°C  
 Zyklenzahl: 24  
 Produktlänge: 200 bp

### 2.13 Morpholino Oligonukleotide

Morpholino Oligonukleotide wurden von der Firma Genetools (Philomath) bezogen. Die Sequenzen sind jeweils in 5' → 3'-Richtung angegeben.

XDead end MO: CTGCTCGTCTGACAGCTTCATTTTC  
 Kontroll MO: CTTCTTACCTCAGTTACAATTTATA

## 2.14 Arbeiten mit Bakterien

### 2.14.1 Anzuchtbedingungen

Aerobe Anzuchten erfolgten in Erlenmeyerkolben bis 2000 ml Volumen (Schott, Mainz), die mit 10-15 % des Nennvolumens mit Nährmedium gefüllt wurden. Die Inkubation der Kulturen erfolgte je nach Bakterienstamm bei 30-37°C im Rundsüttelinkubator (New Brunswick Scientific, Edison, NY, USA). In 12 ml PPN-Röhrchen wurden 3 ml des entsprechenden Anzuchtmediums mit einer Einzelkolonie bzw. einer Stammkultur inokuliert. 100 µl der Vorkultur dienten als Inokulum der Hauptkultur.

### 2.14.2 Trübungsmessungen

Der Wachstumsverlauf von Bakterienkulturen wurde durch Bestimmung der optischen Dichte der Zellsuspension bei einer Wellenlänge von 600 nm im Extinktionsbereich 0-1 gegen einen Leerwert mit unbeimpften Nährmedium in einem Spektralphotometer (Amersham Biosciences) verfolgt. Es wurden Einmal-Halbmikroküvetten (1 ml) mit einer Schichtdicke von  $d = 1$  cm verwendet.

### 2.14.3 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen

Zunächst wurden 5 ml LB Flüssigmedium mit einer Einzelkolonie beimpft. Nach Wachstum über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator wurden mit dieser Vorkultur 300 ml LB in einem 2 l Kolben beimpft. Das Wachstum der Bakterien erfolgte bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,3. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Kultur bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,4 bis 0,5 bei 18°C geschüttelt. Anschließend wurde die Kultur auf 50 ml Falconröhrchen verteilt und 5 min bei 4000 rpm (4°C) zentrifugiert. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis ausgeführt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 15 ml vorgekühlten Transformationspuffer resuspendiert. Nach 15 minütiger Inkubation wurden die Suspensionen von jeweils drei Röhrchen vereinigt und wieder 5 min bei 4000 rpm (4°C) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun erneut in 15 ml Transformationspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 525 µl DMSO unter leichtem Vortexen und 5 min Inkubation auf Eis und wiederholter Zugabe von 525 µl DMSO und 5 minütiger Inkubation wurde die Suspension in jeweils 200 µl Aliquots in vorgekühlte Eppendorfgefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

**Transformationspuffer:** 10 mM PIPES (pH 6,7 mit KOH einstellen), 15mM  $CaCl_2$ , 250 mM KCl, 55 mM  $MnCl_2$  ( $MnCl_2$  erst nach dem Autoklavieren dazugeben)

### 2.14.4 Transformation von Bakterienzellen

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Zu 200 µl kompetenten Zellen wurden jeweils bis zu 20 µl eines Ligationsansatzes gegeben und die Zellen für mindestens 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 90 s 42°C ausgesetzt und erneut für 3 min auf Eis inkubiert. Zu den Ansätzen wurde dann jeweils 800 µl LB Medium gegeben und die Zellen für 45

min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 200 µl bzw. das resuspendierte Zellpellet auf LB-Platten, welche das entsprechende Antibiotikum zur Selektion enthielten, plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Konnte zur Kontrolle der Insertion eines DNA-Fragmentes in das Plasmid eine Blau/Weiß-Selektion durchgeführt werden, wurden die LB-Agarplatten vor dem Ausplattieren der Zellen mit IPTG und X-Gal versetzt.

### **2.14.5 Anlegen von Glycerol-Stammkulturen**

Zur Stammhaltung wurden die Bakterien in Flüssigmedium kultiviert und nach Wachstum über Nacht mit 1/3 Volumen Glycerol versetzt und bei -70°C eingefroren. Die Bakterienstämme wurden zur Anzucht aus Stammkulturen auf entsprechenden Agarplatten ausplattiert und eine Einzelkolonie hiervon zum Beimpfen einer Flüssigkultur verwandt.

## **2.15 DNA-Techniken**

### **2.15.1 Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab**

Zur Überprüfung möglich positiver Bakterienklone wurde Plasmid-DNA wie folgt präpariert, die anschließend restriktionsendonukleolytisch gespalten wurde.

Zunächst wurden 3 ml Bakterienkultur im Eppendorfgeläß pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 150 µl TELT Lösung gelöst und 15 µl Lysozym (10 mg/ml) wurden dazugegeben. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gemisch 2 min bei 90°C und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Nach 15 min Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei Maximalgeschwindigkeit wurden die Proteine und Zelltrümmer mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Zum Überstand wurden dann 100 µl Isopropanol gegeben, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und 10 min zentrifugiert. Das DNA Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen. Schließlich wurde das luftgetrocknete Pellet in 25 µl Puffer P1 (Qiagen) gelöst. Üblicherweise wurden 5 µl für eine Testspaltung eingesetzt.

**Telltösung:** 50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 62,5 mM EDTA; 2,5 M LiCl; 0,4% (v/v) Triton X-100

### **2.15.2 Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab**

Zur Präparation großer Mengen von Plasmid-DNA für Klonierungen oder präparative restriktionsendonukleolytische Spaltungen wurde das Reaktionssystem "Plasmid Midi Kit" (Qiagen, Hilden) eingesetzt und die Präparation laut Herstellerangaben durchgeführt.

### **2.15.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Nukleinsäure-Konzentrationen wurden in einem Spektralphotometer bei 260 nm gegen einen Leerwert bestimmt. Die Konzentration wurde aus der  $OD_{260\text{ nm}}$  wie folgt errechnet:

-  $OD_{260} = 1$  entspricht 50 µg dsDNA

- OD<sub>260</sub> = 1 entspricht 40 µg RNA
- OD<sub>260</sub> = 1 entspricht 33 µg Oligonukleotid

Um die Reinheit (Proteinfreiheit) einer Nucleinsäure-Präparation abzuschätzen, wurde außerdem die Extinktion bei 280 nm gemessen. Der Quotient OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>280 nm</sub> beträgt bei proteinfreier DNA bzw. RNA 1.8-2. In den meisten Fällen wurde das automatische Programm des Photometers zur Bestimmung von DNA- bzw. RNA-Konzentrationen verwendet.

#### 2.15.4 Restriktionsendonukleolytische Spaltung von Nucleinsäuren

Zur analytischen und präparativen Spaltung von DNA wurde diese mit 2 bis 10 U einer Restriktionsendonuklease pro 1 µg DNA  $\frac{1}{2}$  bis 24 h bei 25, 30 bzw. 37 °C im entsprechenden Restriktionspuffer inkubiert.

#### 2.15.5 Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophoresen wurden in 50-100 ml Gelvolumen fassenden, horizontalen Elektrophoresekammern durchgeführt (hauseigene Werkstatt). Die eingesetzten Agarose-Konzentrationen lagen zwischen 0,5-2 % (w/v) in 1×TBE-Puffer, der mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt wurde.

**5×TBE-Puffer:** 445 mM Tris; 445 mM Borsäure; 10 mM EDTA/NaOH (pH 8,0)

Die aufzutrennende DNA wurde vor dem Auftrag mit 1/5 Vol. einer Farbstoffschwerelösung versetzt. Die Elektrophoresen wurden je nach Kammergröße und Laufpuffervolumen bei 80-150 V konstant durchgeführt.

**DNA-Farbstoff-Schwerelösung:** 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylenecyanol; 15 % (w/v) Ficoll (Type 400) in dH<sub>2</sub>O.

Nach erfolgter Auftrennung wurden die Nucleinsäure-Banden auf einem UV-Transilluminator (Biorad) sichtbar gemacht. Zur Dokumentation wurde ein Videosystem (Biorad) verwendet. Durch paralleles Auftrennen eines Molekulargewichts-Standards konnte die Größe der DNA-Fragmente abgeschätzt werden.

#### 2.15.6 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um bei geschnittenen Vektoren mit kompatiblen Enden eine Religation zu verhindern, wurden diese an ihren 5'-Enden dephosphoryliert. Hierzu wurde die zu dephosphorylierende DNA mit 2-10 U Shrimps Alkaline Phosphatase (SAP) in 1×SAP-Inkubationspuffer bei 37°C für 1 h inkubiert. Anschließend wurde das Enzym bei 70°C für 15 min hitzeinaktiviert und die DNA durch Elution aus dem Agarosegel aufgereinigt und in die Ligation eingesetzt.

#### 2.15.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur präparativen Isolierung einzelner DNA-Fragmente aus restriktionsendonukleolytischen Spaltungen wurden diese zunächst im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die



gewünschte DNA-Bande auf einem UV-Transilluminator mit einer Skalpellklinge ausgeschnitten, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und ausgewogen. Zur Aufreinigung wurde dann das QIAEX Gel Extraction Kit der Firma Qiagen laut Herstelleranweisung verwendet.

### **2.15.8 Polymerasekettenreaktionen (PCR) im analytischen und präparativen Maßstab**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Segmente. Hierzu wurden Oligonukleotide einer Länge von 18-30 Nukleotiden aus geeigneten flankierenden Bereichen der zu amplifizierenden Sequenz ausgewählt und von verschiedenen Herstellern synthetisiert. Als Matrize (template) dienten gereinigte Plasmid-DNA, einzelne Bakterienkolonien, oder Flüssigkultur-Aliquots von Phagen oder Bakterien. Ein Reaktionsansatz war wie folgt zusammengesetzt:

- 1×PCR-Puffer (Qbiogene)
- je 0.2 mM dNTPs
- je 0.15 - 1.5 µM sense- und antisense-Oligonukleotid
- 0.5-1 U/20 µl *Taq*-Polymerase (Qbiogene)
- 1-100 ng DNA-"template"

Das Reaktionsvolumen betrug 20-100 µl.

Die Abfolge der einzelnen Schritte der PCR wurde durch Variation der Inkubationstemperatur im PCR-Gerät gesteuert; das Denaturieren der DNA-Matrize erfolgte bei 94 °C, das Anlagern der Oligonukleotide je nach Spezifität und Schmelzpunkt der Oligonukleotide bei 40-60°C und der Elongationsschritt bei 72°C. Ein Standardprotokoll für die Synthese eines bis zu 1.000 bp großen DNA-Segmentes bestand aus 30-40 Zyklen von je 1 min Denaturierung bei 94°C, 1 min Anlagerung der Oligonukleotide bei 50-60°C und 1 min Polymerisierung bei 72 °C. Diesem Programm wurde ein Denaturierungsschritt von 2-3 min bei 94°C vorgeschaltet und nach Beendigung der Zyklen ein zusätzlicher Elongationsschritt von 10 min bei 72°C durchgeführt.

Um die Fehlerfrequenz bei der DNA-Amplifikation zu reduzieren, wurde zur Synthese von DNA-Fragmenten, die für Umklonierungen verwendet werden sollten, *Pfu*-Polymerase (Stratagene) mit 3' → 5' Exonuklease ("proofreading")-Aktivität verwendet.

Um Bakterienklone zu identifizieren, die nach Ligation und Transformation das gewünschte Insert enthielten, wurde neben der Analyse durch Präparation von Plasmid-DNA mit anschließender restriktionsendonukleolytischer Spaltung, häufig auch eine analytische PCR direkt mit Koloniematerial durchgeführt ("colony-PCR"). In die "colony-PCR" wurde in den meisten Fällen eine Kombination von zwei gegenläufigen Oligonukleotiden eingesetzt, von denen das eine komplementär zu Vektorsequenzen und das andere komplementär zu Insertsequenzen war. Das resultierende Produkt konnte somit nur bei erfolgreicher, gerichteter Integration des Inserts gebildet

werden. Die Insertion von DNA-Fragmenten, deren Sequenz nicht bekannt war, konnte durch Verwendung zweier gegenläufiger vektorspezifischer Oligonukleotide überprüft werden, wobei die Integration des DNA-Fragmentes an der Produktgröße der PCR-Reaktion zu erkennen ist. Hierzu wurde zunächst eine Einzelkolonie mit einer „Kristall“-Pipettenspitze aufgenommen und in einem einfachen Ansatz der "colony-PCR" (20 µl Gesamtvolumen) ausgewaschen. Mit derselben Pipettenspitze wurde danach ein Austrich auf einer Agarplatte mit Selektionsantibiotikum durchgeführt. Konnten so mittels der PCR-Reaktion Bakterienklone identifiziert werden, die das gewünschte Insert trugen, wurden zur Plasmidisolierung im präparativen Maßstab entsprechende Bakterienausstriche zum Beimpfen einer Flüssigkultur verwandt.

### **2.15.9 Aufreinigung von PCR-Produkten**

Um Produkte aus präparativen PCR-Ansätzen oder linearisierte Vektor-DNA aufzureinigen, wurde das "PCR Purification Kit" (Qiagen) verwendet.

### **2.15.10 Klonierung und Subklonierung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten**

Die aus der PCR hervorgehenden DNA-Fragmente besitzen zu einem großen Teil Adenin-Überhänge an ihren 3'-Enden, die am Ende des Elongationsschrittes von der *Taq*-Polymerase angefügt werden. Dieser Umstand wird ausgenutzt, um die PCR-Produkte direkt und ungerichtet in Vektoren ligieren zu können, welche zuvor glatt ("blunt") geschnitten und an ihren 5'-DNA-Enden mit entsprechenden Thymidin-Überhängen versehen wurden. Aufgereinigte PCR-Produkte wie Aliquots von PCR-Reaktionen konnten in Ligationen mit dem so präparierten Vektor pGEM-T (Promega) eingesetzt werden. Ein Ligationsansatz des pGEM-T Kits war wie folgt zusammengesetzt: 1 µl T4-Ligase Puffer (10 x) oder 5 µl "Rapid ligation buffer" (2 x), 1 µl pGEM-T Vektor (50 ng/ µl), x µl PCR-Produkt (in dH<sub>2</sub>O), 1 µl T4-Ligase, dH<sub>2</sub>O ad 10 µl.

Zur gerichteten Klonierung von DNA-Fragmenten (Inserts) in Vektoren, wurden falls möglich zwei verschiedene Restriktionsendonukleasen gewählt, die inkompatible, überhängende DNA-Enden generieren. Der Vektor und das zu inserierende DNA-Fragment wurden mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen gespalten, gelelektrophoretisch isoliert und in die Ligation eingesetzt. Vektoren, die glatte oder kompatible DNA-Enden aufwiesen, wurden vor der Auftrennung dephosphoryliert um eine Religation des Vektors zu vermeiden. Beim Fehlen geeigneter Restriktionsschnittstellen in den zu klonierenden DNA-Segmenten konnten diese in der PCR angefügt werden, indem Oligonukleotide verwendet wurden, die an ihrem 5'-Ende um das entsprechende Restriktionsmotiv sowie zusätzliche überhängende Nukleotide verlängert waren.

### **2.15.11 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Ligation kompatibler DNA-Enden wurde unter Verwendung von T4-DNA-Ligase (NEB) in einem 15 µl Reaktionsansatz unter Verwendung des vom Hersteller mitgelieferten 5× bzw. 10×

Puffers durchgeführt. Vektor und zu inserierendes Fragment wurden dabei im üblicherweise im Mengenverhältnis 1:3 eingesetzt. Die Ligation wurde bei RT oder 16°C für 2 bis 12 h durchgeführt.

## 2.16 RNA-Techniken

### 2.16.1 Behandlung von Gefäßen und Lösungen

Zur Inaktivierung von RNasen wurden die zum Arbeiten mit RNA bestimmten Gefäße mit 0,5 M NaOH für mindestens 10 min behandelt und anschließend sorgfältig mit DEPC-behandeltem dH<sub>2</sub>O gespült. Kunststoffgefäße wurden fabrikneu und unbehandelt verwendet. Hitze labile Substanzen wurden in DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O gelöst. Bei Arbeiten mit RNA wurden stets filtergestopfte Pipettenspitzen verwendet.

### 2.16.2 Isolierung von DNA-freier Gesamt-RNA aus *Xenopus*

#### 2.16.2.1 Isolierung von total RNA aus Stadium VI *Xenopus* Oozyten

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus *Xenopus* Oozyten wurden ca. 0,5 ml kollagenisierte Stadium V-VI-Oozyten mit 2 ml 2× Extraktionspuffer, 2 ml DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O und 500 µl Proteinase K (Merck) versetzt und unter Verwendung von 5 ml Spritzen mit Kanülen unterschiedlicher Größe (Durchmesser 0,8-0,2 mm) homogenisiert und anschließend unter mehrmaligem Durchmischen bei 45°C für 1 h im Heizblock inkubiert. Anschließend wurden die Proteinbestandteile durch mehrmalige Extraktionsschritte mit ungepuffertem Phenol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol sowie Chloroform/Isoamylalkohol entfernt. Zur Fällung der RNA wurde das gleiche Volumen 8 M LiCl zugesetzt und für 2 h bei -20°C belassen. Das nach Zentrifugation erhaltene Pellet wurde dann in 2 ml DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O gelöst und die RNA durch Zufügen von 1/10 Vol. 10 M Ammoniumazetat und 2,5 Vol. 100 % Ethanol erneut gefällt. Das erhaltene RNA-Pellet wurde in 80% Ethanol gewaschen, getrocknet, in 1 ml DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O aufgenommen und anschließend zur Entfernung von genomischer und mitochondrialer DNA mit DNase behandelt. Dazu wurden folgende Reagenzien zugefügt:

125 µl 10×DNase-Puffer

62,5 µl 20 mM DTT

25 µl RNAsin (Promega)

60 µl DNase I (Roche)

und das Reaktionsgemisch bei 37°C für 1 h inkubiert. Zur Entfernung von Proteinbestandteilen wurde die RNA erneut mit Phenol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol sowie Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und mit Ammoniumazetat/Ethanol ausgefällt. Die erhaltene RNA wurde in 500 µl DEPC-Wasser aufgenommen und zur Messung im Photometer 1:50 verdünnt eingesetzt. Üblicherweise konnten so aus 0,5 ml Oozyten 0,7-1,2 mg Gesamt-RNA gewonnen werden.

**Extraktionspuffer (1 x):** 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA (pH 8), 40 mM NaCl, 0.5% SDS in DEPC-dH<sub>2</sub>O

**DNase-Puffer (10 x):** 400 mM Tris-HCl (pH 8.0), 60 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> in DEPC-dH<sub>2</sub>O

### 2.16.2.2 Isolation von Detergenzien unlöslicher bzw. löslicher RNA aus Stadium V und VI *Xenopus* Oozyten

Zur Isolierung Detergenzien unlöslicher und löslicher RNA aus *Xenopus* Oozyten wurden ca. 1 ml kollagenisierte Stadium V und VI Oozyten in 10 ml Extraktionspuffer A 20 min auf Eis mit Kanülen unterschiedlicher Größe (Durchmesser 0,8-0,2 mm) homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat bei 12000 rpm für 15 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die gelbe Lipidschicht durch Pipettieren entfernt. Der Überstand (lösliche RNA) wurde in ein vorgekühltes Plastikgefäß überführt. Das Pellet (unlösliche RNA Fraktion) wurde vorsichtig mit Extraktionspuffer B gewaschen und danach in 1 ml 1x Proteinase K Puffer mit 200 µg/ml Proteinase K resuspendiert und bei 55°C inkubiert. 1 ml des Überstands wurde mit 1 ml 2x Proteinase K Puffer mit 400 µg/ml Proteinase K gemischt und auch bei 55°C für 2 Stunden inkubiert. Die Proteinbestandteile wurden anschließend durch mehrmalige Extraktion mit ungepuffertem Phenol und Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol entfernt. Nachfolgend wurde die RNA, wie im vorhergehenden Kapitel 1.15.2.1. beschrieben, gefällt und mit DNase behandelt. Nach der erneuten Phenolextraktion und Fällung wurde die RNA Konzentration bestimmt und die Qualität der gewonnen RNA mittels denaturierender Agarosegel-elektrophorese überprüft.

**Extraktionspuffer A:** 1 % Triton X-100, 0,5 M KCl, 10 mM Piperazine-N,N'-bis [2-ethanesulfonsäure] (Pipes) (pH 6,8), 5 mM Magnesiumacetat, 1 mM EGTA (pH 8,0), 300 mM Saccharose, 200 µg/ml Heparin (dazugegeben unmittelbar vor Gebrauch)

**Extraktionspuffer B:** siehe Extraktionspuffer A ohne Triton X-100, Saccharose und Heparin

**Proteinase K Puffer (2x) :** 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 M EDTA, 2 % SDS, 8 M Harnstoff

### 2.16.2.3 Isolation von Total RNA aus Embryonalstadien

Um Gesamt-RNA aus *Xenopus*-Embryonen zu extrahieren, wurde in einem 1.5 ml-Eppendorfreaktionsgefäß pro Ansatz je 0.4 ml Extraktionspuffer in einem Thermoblock (Gesellschaft für Laborgeräte, Wertheim/Main) auf 45°C vorgewärmt. Zu dem Puffer wurden 20 µl einer Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) gegeben und diese Mischung sofort auf die gefrorenen Embryonen (je 10 pro Präparation) pipettiert. Durch achtfaches Auf- und Absaugen der Probe in einer 1 ml Einmalspritze mit G30-Kanüle wurden die Embryonen homogenisiert und die DNA geschert. Das Homogenat wurde bei 45°C für 45 min inkubiert und anschließend wie folgt extrahiert: 1 × 1 Vol. Phenol, 1 × 1 Vol. Phenol/Chloroform, 1 × 1 Vol. Chloroform). Die RNA

wurde durch Zugabe von 0.1 Vol. 10 M Ammoniumazetat und 2.5 Vol. Ethanol durch Zentrifugation in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (14000 rpm, 30 min, RT) gefällt und in 40 µl DEPC-dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Um evt. im Ansatz enthaltene genomische DNA zu entfernen, wurde die RNA-Lösung nach Zugabe von 2 µl RNase-freier DNase (20 U/µl, Roche), 5 µl 10×DNase-Puffer, 2 µl 20 mM Dithiothreitol und 1 ml RNasin (40 U/µl, Promega) 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA über RNeasy-Säulen aufgereinigt und die Konzentration photometrisch bestimmt.

**Extraktionspuffer (1 x):** 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA (pH 8), 40 mM NaCl, 0.5 % SDS in DEPC-dH<sub>2</sub>O

**DNase-Puffer (10 x):** 400 mM Tris-HCl (pH 8.0), 60 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> in DEPC-dH<sub>2</sub>O

#### 2.16.2.4 Adulte Gewebe und Organe

Dem Tier entnommene Gewebe und Organe wurden mit 1×MBSH gewaschen, in Flüssigstickstoff eingefroren und mit einem in Flüssigstickstoff gekühlten Mörser pulverisiert. Das Pulver wurde in vorgekühlten 1.5 ml Eppendorfreaktionsgefäßen in 50 µl-Aliquots aufgeteilt und bis zur Extraktion bei -70°C gelagert. Die RNA-Extraktion wurde wie vorangehend beschrieben durchgeführt.

#### 2.16.3 Semiquantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die reverse Transkription von RNA wurde in einem Ansatz des RT-PCR Kits (Perkin Elmer) durchgeführt, der wie folgt zusammengesetzt war:

2 µl 10×PCR-Puffer II

4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>

je 2 µl dATP, dCTP, dGTP, dTTP-Lösung (10 mM)

1 µl RNase Inhibitor (20 U/µl)

1 µl Random Hexamers (50 µM)

1 µl Reverse Transkriptase (50 U/µl)

bis zu 3 µl DNA-freie Gesamt-RNA (bis zu 1 µg)

RNase-freies dH<sub>2</sub>O ad 20 µl

Der Ansatz wurde gemischt, und in einem PCR-Gerät (Trio, Biometra) durchlief er das folgende Temperaturprofil:

10 min RT (Anlagerung der Oligonukleotide), 30 min 42°C (reverse Transkription), 5 min 99°C (Inaktivierung der Reversen Transkriptase), Abkühlen auf 4°C

Die so erhaltene cDNA wurde anschließend in eine PCR-Reaktion eingesetzt, wofür jedem Ansatz folgende Komponenten hinzugefügt wurden:

- 8 µl 10×PCR-Puffer II

- 2 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Endkonzentration 1.5 mM)

- 1 µl je 15 µM sense- und antisense-Oligonukleotid-Lösung
- 0.5 µl *Taq*-Polymerase (5U/µl, Qbiogene)
- ad dH<sub>2</sub>O auf 80 µl (Gesamtvolumen der Reaktion: 20 µl)

Die PCR wurde wie unter 2.15.8 beschrieben durchgeführt. Zur Kontrolle auf DNA-Verunreinigungen der eingesetzten RNA-Präparationen, wurden zusätzlich Kontrollreaktionen angesetzt, die keine Reverse Transkriptase enthielten.

#### **2.16.4 *In vitro*-Synthese von RNA**

##### **2.16.4.1 *In vitro*-Synthese von Monomethylguanosa-Cap-RNA zur Mikroinjektion in *Xenopus* Oozyten und Embryonen**

Synthetische mRNA für Mikroinjektionen in *Xenopus* Embryonen oder Nuklei von Oozyten wurde unter Verwendung von mMESSAGING mMACHINE Kits (Ambion) hergestellt. Bei der *in vitro* Synthese mit SP6-, T7- oder T3-Polymerasen wurde dabei am 5'-Ende der Transkripte eine 7-Monomethylguanosa-Cap-Struktur angefügt, die für effizienten Export der injizierten Transkripte aus dem Zellkern sowie zur Translationsinitiation benötigt wird. Ein Reaktionsansatz enthielt dabei folgende Komponenten:

- 2 µl 10×Reaktionspuffer
- 10 µl 2×rNTP/Cap-Mix
- 5 µl linearisierte template DNA (0,2 µg/µl in RNase-freiem dH<sub>2</sub>O)
- 2 µl Enzym-Mix
- ad RNase freies dH<sub>2</sub>O auf 20 µl

Der Ansatz wurde für 2-3 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit 1 µl DNase I versetzt und weitere 15 min bei 37°C inkubiert, um die Matrizen DNA aus dem Transkriptionsansatz zu entfernen.

##### **2.16.4.2 *In vitro*-Synthese von Digoxigenin- und Fluorescein-markierten RNA-Sonden**

Zur Synthese von markierten antisense-RNA-Sonden für *in situ*-Hybridisierungen wurden *in vitro* Transkriptionen in Anwesenheit von Digoxigenin- bzw. Fluorescein-markiertem rUTP durchgeführt. Als Matrize für die RNA-Polymerase wurde linearisierte Plasmid-DNA eingesetzt, die nach präparativer restriktionsendonukleolytischer Spaltung mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt worden war. Es wurde der *in vitro* RNA-Transkriptions-Kit von Stratagene verwendet, wobei sich ein einfacher Transkriptionsansatz wie folgt zusammensetzte:

- 5 µl 5×Transkriptionspuffer
- 1 µl 10 mM rATP
- 1 µl 10 mM rCTP
- 1 µl 10 mM rGTP
- 0.64 µl 10 mM rUTP

0.36 µl 10 mM Digoxigenin-bzw Fluorescin-rUTP (Roche)

1 µl 0.75 M DTT

1 µl RNasin (40 U/µl)

5 µl linearisierte "template"-DNA (0.2 µg/µl, in RNase-freiem dH<sub>2</sub>O)

1 µl T3, T7 oder SP6-RNA-Polymerase (10 U/µl)

ad RNase-freies dH<sub>2</sub>O auf 25 µl

Der Ansatz wurde bei 37°C für 2 h inkubiert und das DNA-template anschließend durch Zugabe von 1 µl RNase-freier DNase I 15 min bei 37°C entfernt. Nicht eingebaute Nukleotide sowie Salze des Reaktionspuffers wurden mit Hilfe des „RNeasy Mini Kits“ (Qiagen) entfernt.

#### **2.16.4.3 *In vitro*-Synthese von <sup>32</sup>P-UTP-markierten RNAs**

Zur *in vitro*-Synthese radioaktiv markierter RNAs wurde ebenfalls der *in vitro*-Transkriptions-Kit der Firma Stratagene verwendet. Der Ansatz wurde dabei insofern modifiziert, als daß diesem anstelle des nicht radioaktiv markierten rUTPs, 5 µl [ $\alpha$ 32P]-rUTP (kalibriert auf 20 µCi/µl) hinzugefügt wurden. Die Aufreinigung radioaktiv markierter RNAs erfolgte je nach Anwendung mit dem „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) oder über Sephadex G50-Säulen (Amersham Biosciences). Die Aktivität der Probe wurde durch Messung der cpm oder dpm im „Quick-Counter“ (Bioscan, Washington DC, USA) bestimmt.

#### **2.16.4.4 Aufreinigung von RNA-Transkripten und Abtrennung nichteingebauter Nukleotide mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen)**

Um synthetische RNA von Salzen, Enzymen und Nukleotiden abzutrennen wurden die Ansätze mit Hilfe des „RNeasy Mini Kits“ (Qiagen) laut Herstellerangaben aufgereinigt und anschließend ein Aliquot durch Gelelektrophorese überprüft.

#### **2.16.4.5 Aufreinigung von RNA-Transkripten unter Verwendung von Sephadex G50-Säulen**

Zur Abtrennung von nicht inkorporierten radioaktiv markierten Nukleotiden aus einem *in vitro* Transkriptionsansatz kann die Methode der Gelfiltration unter Verwendung von Sephadex MicroSpin™ G-50 Säulen (Amersham Biosciences) angewendet werden. Dabei werden die kleineren nicht inkorporierten Nukleotide in der Gelmatrix zurückgehalten, während größere Moleküle wie die zu reinigenden RNAs eluiert werden können. Die Chromatographiematrix der Säule wurde dazu durch vortexen gut durchmischt und der Suspensionspuffer durch einmaliges Zentrifugieren bei 735 ×g (3000 rpm) für 1 min in der Eppendorf Tischzentrifuge abgetrennt. Danach wurde die RNA-Probe in einem Volumen von 50 µl auf die Säule aufgebracht und ebenfalls bei 735×g für 2 min zentrifugiert. Anfolgend wurde die Aktivität der Probe im Quick-Counter bestimmt, sowie ein Aliquot auf einem denaturierenden Harnstoff PA-Gel analysiert.

### **2.16.5 Analyse von *in vitro* transkribierten RNAs durch native Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Kontrolle von *in vitro* transkribierten RNAs zur Injektion in *Xenopus* Oozyten oder Sonden für die *in situ* Hybridisierung, wurden diese nach der Aufreinigung über RNeasy-Säulen auf einem nicht denaturierenden Agarosegel mit Ethidiumbromid analysiert.

### **2.16.6 Auftrennung radioaktiv markierter RNA durch denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Elektrophorese**

Üblicherweise wurden für die Auftrennung radioaktiv markierter RNAs 6-10 %ige Harnstoff-Acrylamidgele (7 M Harnstoff; 38:2 Acrylamid/Bisacrylamidlösung in 1×TBE) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte dabei in 1×TBE in einer vertikalen Gelelektrophoresekammer bei 250-300V konstant. Die mit Harnstoff-RNA-Auftragspuffer versetzten Proben wurden vor dem Auftrag für 3 min bei 95°C hitzedenaturiert. Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder in Methanol/Essigsäure (jeweils 10 % in H<sub>2</sub>O) fixiert, getrocknet und exponiert oder in Frischhaltefolie eingeschlagen und direkt auf einem Phosphoimager Screen exponiert.

### **2.16.7 Analyse von RNA durch denaturierende Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese**

Um RNAs vor dem Transfer auf Nitrozellulose ihrer molekularen Größe nach aufzutrennen, wurde eine denaturierende Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Für ein 100 ml Agarosegel wurden dazu zunächst 1 g Agarose in 60 ml DEPC-behandeltem Wasser durch Erhitzen gelöst. Danach wurden 20 ml eines 5×MOPS-FA-RNA-Gellaufpuffers zugefügt und erst kurz vor dem Gießen des Geles 22 ml einer 37 %igen Formaldehydlösung. Sowohl das Gießen des Gels als auch der Gellauf selbst wurden stets unter dem Abzug durchgeführt. Bei Bedarf wurde ebenfalls ein Molekulargewichtsstandard „RNA-Ladder“ (NEB) aufgetragen.

**5×MOPS-FA-RNA-Gellaufpuffer:** 0,1 M MOPS, pH 7,0; 40 mM Natriumazetat; 5 mM EDTA

### **2.16.8 Northern-Transfer von RNA auf Nitrozellulose- oder Nylon-Membranen**

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der RNA-Moleküle wurde das Gel für 15 min in destilliertem Wasser gespült, um Formaldehyd und Salze des Puffers zu entfernen. Danach wurde das Wasser entfernt, durch 10×SSC ersetzt und erneut für 15 min inkubiert. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt bevor der Transfer auf Nitrozellulose- oder Nylon-Membranen erfolgte. Dazu wurden zunächst sechs Whatmanpapiere (Schleicher und Schüll; Dassel) in Größe des Geles sowie ein größeres Stück als „Pufferbrücke“ ausgeschnitten und in 10× SSC getränkt. Dann wurde eine Glasplatte über ein mit 10×SSC-gefülltes Pufferreservoir gelegt und die Pufferbrücke sowie drei der kleineren Whatmanpapiere luftblasenfrei daraufgelegt. Dann wurden das Agarosegel und die Nitrozellulose- oder Nylonmembran (Hybond, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)



aufgelegt. Der Aufbau wurde dann mit wiederum drei Whatmanpapieren sowie einem ca. 10 cm Stapel Einmalhandtüchern bedeckt und mit einem ca. 1 kg schwerem Gewicht beschwert. Üblicherweise wurden Northern-Transfere über Nacht durchgeführt. Zur irreversiblen Fixierung der Nukleinsäuren auf der Zellulose- oder Nylonmatrix, wurde die Membran im Stratalinker der Firma Stratagene unter Verwendung des „Autocrosslink“-Programms quervernetzt.

### **2.16.9 Nachweis von RNA auf Membranen durch Methylenblau-Färbung**

Ribonukleinsäuren können nach dem Transfer auf eine Membrane durch Anfärben in Methylenblau-Lösung sichtbar gemacht werden. Nach dem Quervernetzen wurde die Membran dazu in eine Plastikfärbeschale gelegt und mit Methylenblau-Lösung vollständig bedeckt und unter Schütteln angefärbt. Nach ca. 10 min kann die unspezifisch an die Membran gebundene Färbelösung in destilliertem Wasser abgewaschen werden und nur die RNA ist in spezifisch angefärbten Banden sichtbar.

**Methylenblau-Färbelösung:** 0,04 % Methylenblau in 0,5 M Natriumacetat, pH 5,2

## **2.17 Proteintechniken**

### **2.17.1 *In vitro* Translation**

Das T<sub>N</sub>T Coupled Reticulozyte Lysate System (Promega) eignet sich dazu, von einer Plasmid-DNA in einem einzigen Ansatz die Synthese von mRNA (Transkription) und die Umsetzung der RNA-Sequenz in die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins (Translation) durchzuführen. Das System wurde zur Kontrolle der Proteingröße eines subklonierten Konstruktes sowie für den Nachweis von RNA-Proteininteraktionen mittels der Koimmunopräzipitation eingesetzt.

*in vitro* T<sub>N</sub>T-Ansatz:

0,5 µg Plasmid-DNA

0,5 µl T<sub>N</sub>T-Puffer

0,25 µl Aminosäure-Mix ohne Methionin

0,125 µl RNasin

6,75 µl T<sub>N</sub>T Retikulozytenlysat

1 µl 35S-Methionin (10 µCi/µl; 1000 Ci/mmol)

0,25 µl SP6, T3 oder T7 RNA-Polymerase (10 U/µl)

ad RNase-freies H<sub>2</sub>O auf 12,5 µl

Der Ansatz wurde für 1,5 h bei 30°C inkubiert und anschließend 1 µl Aliquot auf ein SDS-Gel aufgetragen oder für Koimmunopräzipitationsexperimente mit dem entsprechenden Interaktionspartner versetzt. Für die Koimmunopräzipitationsexperimente erfolgte die Translation in Abwesenheit radioaktiv markierten Methionins. In diesem Fall wurde dann ein Aminosäuremix zugegeben, der alle Aminosäuren enthält.

### 2.17.2 Quantifizierung von Proteinen nach Bradford

Das Prinzip der quantitativen Proteinbestimmung basiert auf der Änderung der Absorptionseigenschaften des Coomassie-R-250-Farbstoffes nach Anlagerung an Proteinmoleküle über hydrophobe Wechselwirkungen. Die durch Anwesenheit von Proteinen erhöhte Extinktion der Coomassie-Lösung bei 600 nm ist dabei direkt proportional zum Proteingehalt der Lösung. Durch Verwendung einer Eichlösung kann so die Proteinkonzentration einer Probe bestimmt werden. Für das Erstellen der Eichgerade wurde eine Verdünnungsreihe aus einer BSA-Stammlösung (1 mg/ml in H<sub>2</sub>O) in einem Volumen von 800 µl in H<sub>2</sub>O angesetzt. Parallel wurden ebenfalls verschiedene Verdünnungen der Lösung unbekannter Proteinkonzentration erstellt und ebenfalls in 800 µl H<sub>2</sub>O verdünnt. Zu diesen Ansätzen und einem H<sub>2</sub>O-Leerwert wurden 200 µl der Bradford-Reagenzlösung gegeben und durchmischt. Nach 15 min Inkubation wurden die Absorption der Probe bei 600 nm im Photometer bestimmt und die Proteinkonzentration der zu bestimmenden Lösung durch Extrapolation mit den Werten der Eichgerade ermittelt.

**Bradford-Reagenz:** 5× konzentrierte Lösung von Coomassie Brilliant Blue R250 in Phosphorsäure/Methanol

### 2.17.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der Methode der SDS-PAGE werden Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend in einem vertikalen, denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Dazu wird die Proteinprobe mit einem reduzierenden Agens (β-Mercaptoethanol) und SDS versetzt (SDS-Probenpuffer). SDS verleiht Proteinen eine negative Gesamtladung, die proportional zur Masse des Proteins ist. Die Komplexe aus SDS und denaturierten Proteinen lassen sich so beim Lauf durch ein Polyacrylamidgel durch Ladung und Siebeffekt der Matrix auftrennen. Durch die Verwendung zweier aufeinander folgenden Gelsysteme (Sammelgel und Trenngel) mit unterschiedlichen pH-Bedingungen wird der Trenneffekt durch eine erhöhte Auflösung verstärkt.

**Trenngel:** 10-15 % (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

**2×SDS-Probenpuffer:** 62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8); 10 % (v/v) Propantriol; 2 % (w/v) SDS; 700 mM β-Mercaptoethanol; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau

Zwei Glasplatten wurden mit 70 % Ethanol gesäubert, zusammengesetzt und mit Gewebeklebeband abgedichtet. Die Trenngellösung wurde mit 10 % APS und TEMED, als Radikalbildner und Radikalstarter, versetzt und zwischen die Glasplatten bis ca 2,5 cm unter den Rand gegossen und sofort mit 0,1 % (w/v) SDS überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel gegossen und ein Taschenformer zwischen die Glasplatten

geschoben. Anschließend wurden Gewebeklebeband und Taschenformer entfernt und das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer mit Laufpuffer eingespannt (hauseigene Werkstatt). Die Proteinproben wurden mit einem entsprechenden Volumen 2×SDS-Probenpuffer versehen, für 3 min bei 95°C hitzedenaturiert und in die Taschen des Gels aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 35 mA konstant für 2,5-3,5 h durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine konnten anschließend durch Anfärbung mit Coomassie blue sichtbar gemacht werden. Handelte es sich um radioaktiv markierte Proteine, so wurde das Gel in 10 % (v/v) Essigsäure und 10 % (v/v) Methanol fixiert (3×10 min), gewässert und auf einem Whatman-Papier unter Vakuum getrocknet und auf dem Phosphoimagerscreen exponiert.

#### 2.17.4 Anfärben von Proteinen mit Coomassie-Blue

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurden SDS-Polyacrylamidgele hierzu für ca. 1 h oder über Nacht unter leichtem Schwenken bei RT in der Coomassie-Färbelösung angefärbt. Anschließend wurde die Färbelösung entfernt, das Gel 2× in dH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend gegen Entfärberlösung ausgetauscht. Durch mehrmaliges Wechseln dieser Lösung konnte die Hintergrundfärbung entfernt werden und die angefärbten Proteinbanden wurden sichtbar. Anschließend wurden die Gele zwischen zwei Zellophanfolien im Luftstrom oder auf Whatmanpapier unter Vakuum getrocknet und zur Dokumentation am Computer eingescannt.

**Coomassie-Färbelösung:** 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250; 45 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure

**Entfärberlösung:** 30 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure

#### 2.17.5 Herstellung von *Xenopus* Oozyten S100-Extrakten

Kollagenisierte *Xenopus* Oozyten wurden hierzu mit 1 Vol. S100-Puffer versetzt und auf Eis mit 5 ml-Spritzen mit Injektionsnadeln unterschiedlicher Größe homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend für 15 min bei 1900×g und 4°C in der Sorvall-Zentrifuge (SS34-Rotor) zentrifugiert um grobe Zellbestandteile, Pigment- und Dotterproteine abzutrennen. Membranöse Bestandteile wurden dann durch 2 h Zentrifugation bei 100000×g und 4°C in einer Beckmann Ultrazentrifuge (52000 rpm im TLA100.2-Rotor) abgetrennt. Die Extrakte wurden nach der Zentrifugation den Zentrifugenröhrchen vorsichtig entnommen und die Proteinkonzentration mit der Bradford-Methode ermittelt. Danach wurden diese aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum weiteren Gebrauch bei -70°C gelagert. Üblicherweise wiesen die so gewonnenen S100-Extrakte eine Konzentration von 10-20 mg/ml Gesamt-Protein auf. Zur qualitativen Einschätzung der Proteinpräparation wurde auch eine Auftrennung der Extrakte im SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-blue-Färbung durchgeführt.

**S100-Puffer:** 50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 50 mM KCl; 0,1 M EDTA; 25 % (v/v) Propantriol; Proteaseinhibitor-Cocktail (Complete, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

## 2.18 Methoden zur Identifizierung vegetal lokalisierter RNAs

### 2.18.1 Plattieren und Bestimmung des Phagentiters der $\lambda$ TriplEx2-Phagenbibliothek (Claussen, Dissertation, 2002)

Mit einer *E.coli* XL1-blue MRF'-Einzelkolonie wurde eine Übernachtskultur von 10 ml LB-Flüssigmedium mit Tetracyclin, 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,2 % Maltose, inokuliert und diese zum Animpfen einer 50 ml Tageskultur verwendet. Nach ca 4-6 h Wachstum (OD<sub>600</sub> ca. 1) wurden die Zellen bei 500 xg für 10 min pelletiert und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 in sterilem 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und verdünnt. Anschließend wurden jeweils 200 µl dieser Bakteriensuspension mit 1 µl der Verpackungsreaktion bzw. 1:10 und 1:100 Verdünnungen derselben versetzt, bei 37°C für 15 min mit den Phagen infiziert und anschließend mit 3 ml flüssigem NZY-Topagar, 15 µl 0,5 M IPTG (Roth, Karlsruhe) und 50 µl X-Gal (GibcoBRL) (250 mg/ml in DMF) versetzt und sofort auf NZY-Agar ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht konnte dann der Phagentiter anhand der Phagenplaques sowie die Rekombinationsrate über das Mengenverhältnis von blauen (Hintergrund) und weißen (Rekombinante) Phagenplaques bestimmt werden.

### 2.18.2 Massenexzision der $\lambda$ TriplEx2-Phagenbibliothek in BM25.8-Zellen

Zunächst wurde ein Einzelkoloniaustrich des Wirtsbakteriums *E.coli* BM25.8 auf LB Kanamycin/Chloramphenicol-Agarplatten angefertigt. Dann wurden 10 ml LB-Flüssigmedium mit einer Einzelkolonie inokuliert und bei 31°C über Nacht inkubiert. 1 ml dieser Primärkultur wurden dann verwendet um 10 ml LB-Flüssigmedium zu beimpfen. Nach dem Erreichen einer Zelldichte von ca. OD<sub>600</sub> 1,2 wurden der Kultur 10 mM MgSO<sub>4</sub> hinzugefügt. 200 µl dieser Zellsuspension wurden dann mit ca. 60000-90000 pfu der primären Phagenbibliothek versetzt und für 1 h bei 31°C infiziert. Anschließend wurden dem Ansatz 500 µl LB-Flüssigmedium hinzugefügt und nach einer einstündigen Inkubation bei 31°C und 190 rpm jeweils 10 und 100 µl auf 150 mm LB-Carbenicillin-Platten ausgestrichen. Nach Übernachtsinkubation konnten dann Bakterienklone zur Durchmusterung gepickt werden.

### 2.18.3 Amplifikation von Einzelklon cDNA durch PCR

Bakterienklone wurden in 100 µl LB-Medium (Carbenicillin) in 96-Loch Mikrotiterplatten angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator inkubiert. Jeweils 1-2,5 µl der Bakteriensuspension wurden dann in 96-Loch PCR-Reaktionsgefäße überführt und die inserierten Fragmente unter Verwendung der 5'  $\lambda$ TriplEx2-LD- und 3'  $\lambda$ TriplEx2-LD Oligonukleotide wie folgt amplifiziert:

- 5 µl 10x PCR Puffer mit MgCl<sub>2</sub>
- 0,5 µl dNTPs (25 mM jeweils)
- jeweils 0,35 µl Primer (20 mM)
- 0,25 µl *Taq*-Polymerase (5U/µl)

43,55 µl H<sub>2</sub>O

Das Denaturieren der DNA-Matrize erfolgte bei 95 °C für 45 s, das Anlagern der Oligonukleotide bei 55°C für 45 s und der Elongationsschritt bei 72°C für 2 min. Dem Programm wurde ein Denaturierungsschritt von 2 min bei 95°C vorgeschaltet und nach Beendigung von 35 Zyklen ein zusätzlicher Elongationsschritt von 10 min bei 72°C durchgeführt.

## **2.18.4 Macroarray Techniken**

### **2.18.4.1 Macroarray Herstellung**

Zunächst wurden 15 µl der durch PCR amplifizierten cDNA mit 15 µl 0,6 M NaOH denaturiert. Mit einer 8 Kanalpipette wurden 20 µl cDNA auf eine Hybond<sup>TM</sup> N+ Nylonmembran (Amersham Biosciences) pipettiert, die in einem 96 Loch Format „Dotblot“-Apparat eingespannt wurde. Anschließend wurde die Membran erst mit 0,5 M Tris-HCl pH 7.5 und dann mit Wasser gewaschen bevor die DNA auf der Membran im Stratalinker mit UV Licht quervernetzt wurde.

### **2.18.4.2 Erststrang cDNA Synthese und Amplifikation der cDNA**

Mit Hilfe des „SMART<sup>TM</sup> PCR cDNA Synthesis Kit“ (Qiagen) wurde laut Herstelleranweisung je 1 µg RNA in einer reversen Transkription in Erststrang cDNA umgeschrieben. Die Erststrang cDNA wurde in 40 µl TE Puffer aufgenommen. Jeweils 1 µl der Erststrang cDNA wurde als Ausgangsmaterial in der PCR zur Amplifikation eingesetzt. Um die Amplifikationsreaktion zu optimieren, wurden jeweils Proben nach 15 bis 20 Amplifikationszyklen durch Agarosegelelektrophorese untersucht.

Die optimal amplifizierte doppelsträngigen cDNA wurde mit Hilfe des „PCR Purification Kit“, (Qiagen) aufgereinigt und schließlich die Konzentration bestimmt.

### **2.18.4.3 Radioaktive Markierung der ds cDNA**

Die Herstellung der radioaktiv markierten ds cDNA erfolgte mit Hilfe des „High Prime“ Kits (Roche). Ausgehend von Primern mit einer zufälligen Sequenz erfolgte die Gegenstrangsynthese an der Matrize durch die Klenow DNA Polymerase. Dabei wurden ungefähr 50 ng ds cDNA zur Markierung mit [<sup>32</sup>P]-dCTP eingesetzt. Die Reaktion wurde nach Herstelleranweisungen durchgeführt. Anschließend wurden nicht inkorporierte Nukleotide durch G-50 Sephadex Filtration abgetrennt.

### **2.18.4.4 Hybridisierung des Macroarrays**

Die Filter wurden zunächst mit 2x SSC angefeuchtet und in Hybridisierungsröhren überführt. In die Röhre wurde 20 ml Hybridisierungslösung gegeben. Für 30 min bei 65°C wurden die Filter im Hybridisierungsofen prähybridisiert. Die Prähybridisierungslösung wurde abgeschüttet, die vorher denaturierte radioaktiv markierte Probe wurde in 10 ml Hybridisierungslösung verdünnt und zu den

Filtern gegeben. Die Filter wurden anschließend über Nacht bei 65 °C rotierend im Hybridisierungssofen inkubiert.

**Hybridisierungslösung:** 0,5 M NaHPO<sub>4</sub> pH 7.2, 1 mM EDTA, 7 % SDS

#### **2.18.4.5 Waschen und Detektion**

Die Hybridisierungslösung wurde abgeschüttet und die Filter wurden standardmäßig jeweils 2x mit 2x SSC, 0,5 % SDS Waschlösung für 10 min bei 65°C gewaschen, wobei nach jedem Waschschrift die Reststrahlung des Filters kontrolliert wurde. War die Strahlung auf ungefähr 50 cpm abgeklungen, wurde das Waschprotokoll beendet. Die Filter wurden noch feucht in Folie eingeschweißt, in einer Expositionskassette plaziert und ein Phosphoimagerscreen aufgelegt, der nach über Nacht Exposition im Phosphoimager eingescannt werden konnte.

### **2.18.5 Microarray Techniken**

#### **2.18.5.1 Microarray Herstellung**

Die PCR amplifizierte cDNA Klone wurden mit dem Biomac<sup>TM</sup> Pipettierroboter (Beckmann) mit Millipore Filterplatten auf einer Millipore Vakuum Station aufgereinigt. Anschließend wurden die PCR Produkte mit gleichen Volumen 2x QMT Spotting Lösung I (Quantifoil) versetzt. Die so vorbereiteten PCR Produkte wurden anschließend mit Hilfe des Chipwriter Pro Roboters (Biorad) auf QMT Epoxy Slides (Quantifoil) gebracht. Die Microarrays wurden danach für 5 min in 0,1 % Triton X-100, dann zweimal für 2 min in verdünnter HCl-Lösung (100 µl 37% HCl auf 1 l H<sub>2</sub>O), 10 min in 100 mM KCl Lösung, 3 min in kochendem Wasser, 1 min in dH<sub>2</sub>O, 15 min in 1x QMT Blocking Lösung (Quantifoil) bei 50°C und schließlich 10 min in dH<sub>2</sub>O gewaschen bzw. inkubiert.

#### **2.18.5.2 Erststrang cDNA Synthese und Amplifikation der cDNA**

Mit Hilfe des „SMART cDNA Fluorescent Probe Amplification Kit“ (Clontech) wurde laut Herstelleranweisung je 1 µg RNA in einer reversen Transkription in Erststrang cDNA umgeschrieben. Nach Aufreinigung der Erststrang cDNA mit dem „PCR Purification Kit“ (Qiagen) und Elution der cDNA in 85 µl dH<sub>2</sub>O wurde die cDNA Konzentration gemessen.

Jeweils 200 ng der Erststrang cDNA wurde als Ausgangsmaterial in der PCR zur Amplifikation der cDNA eingesetzt. Um die Amplifikationsreaktion zu optimieren, wurden jeweils Proben nach 15 bis 20 Amplifikationszyklen durch Agarosegelelektrophorese untersucht.

Die optimal amplifizierte doppelsträngige cDNA wurde mit Hilfe des „PCR Purification Kit“, (Qiagen) aufgereinigt und schließlich die Konzentration bestimmt.

### 2.18.5.3 Cy3; Cy5 Markierungsreaktion der ds cDNA

Zur direkten Inkorporation von Cyanine 3-dCTP bzw. Cyanine 5-dCTP wurden 500 ng ds cDNA erneut in einer reversen Transkription mit Hilfe des „LabelStar Array Kits“ (Qiagen) umgeschrieben. Die Reaktion wurden nach Herstelleranweisung durchgeführt und anschließend mit dem „PCR Purification Kit“ (Qiagen) aufgereinigt.

### 2.18.5.4 Hybridisierung des cDNA Microarrays

Zunächst wurden die jeweiligen Cy3- und Cy5 markierten Proben vereinigt und in der Speedvac einkonzentriert, bevor die cDNA in 33 µl Hybridisierungspuffer resuspendiert wurde. Nach 3 min denaturieren bei 95°C wurde die Probe kurz auf Eis abgekühlt. Schließlich wurde die markierte cDNA auf ein Deckgläschen pipettiert und auf den Microarray gebracht. Dieser wurde in einer Hybridisierungskammer fest eingeschlossen und über Nacht bei 42°C im Wasserbad inkubiert.

**Hybridisierungspuffer:** 50 % Formamid, 5x SSC, 0,1 % SDS, 5x Denhardt's; vor Gebrauch dazugeben: 0,5 mg/ml Maus Cot-1 DNA, 0,125 mg/ml poly (d)A

### 2.18.5.5 Waschen des cDNA Microarrays

Der Microarray wurde zum Waschen in ein Färbeschälchen platziert. Zunächst wurde für 10 min mit 2x SSC, 0,2 % SDS, dann in 2x SSC für 10 min und schließlich in 0,2x SSC für 10 min gewaschen. Anschließend wurde der Microarray mittels komprimierter Luft getrocknet.

### 2.18.5.6 Scannen des Microarray

Die Microarrays wurden nacheinander im Cy3 und Cy5 Kanal mit gleicher Laser- und Verstärkerleistung (PMT) im Microarrayscanner (Affymetrix) eingelesen.

## 2.18.6 Suche nach vegetal lokalisierten Transkripten mittels whole mount *in situ*-Hybridisierung in großem Maßstab

Einzelne Bakterienklone wurden in 100 µl LB-Medium (Carbenicillin) in 96-Loch Mikrotiterplatten angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator inkubiert. Jeweils 1-2,5 µl der Bakteriensuspension wurden dann in 96-Loch PCR-Reaktionsgefäße überführt und die inserierten Fragmente unter Verwendung der 5'λTriplex2-LD- und 3'λTriplex2-LD Oligonukleotide amplifiziert. Jeweils 5 µl in der PCR amplifizierte cDNA Inserts dienten als Matrize bei der T7-Polymerase vermittelten Generierung von antisense *in situ*-Hybridisierungssonden in der *in vitro* Transkriptionsreaktion (beschrieben unter 2.16.4.2). Unter Verwendung von Fluorescin-rUTP wurden die Sonden dabei markiert und ein Aliquot derselben konnte so nach Auftrennung in der Agarosegelelektrophorese auch ohne Zugabe von Ethidiumbromid visualisiert werden. Die so hergestellten Transkripte dienten dann als antisense-Sonden in der whole mount *in situ*-Hybridisierung.

Zur groß angelegten Suche nach lokalisierten RNAs mittels der whole mount *in situ*-Hybridisierung wurde die unter 2.22 beschriebene Methode der whole mount *in situ*-Hybridisierung wie folgt modifiziert: Alle Schritte der Prozedur bis zur Prähybridisierung der Oozyten wurden in einem gemeinsamen Ansatz in einem Volumen von 50 ml durchgeführt. Nach Entfernen der Prähybridisierungslösung wurden die Oozyten dann auf die Vertiefungen von 24 Loch-Zellkulturplatten aufgeteilt und mit der entsprechenden spezifischen Fluorescein-markierten RNA antisense-Sonde versetzt. Alle weiteren Behandlungen und Waschschrte der Oozyten wurden ebenfalls in diesen Zellkulturplatten durchgeführt. Zur Detektion der Sonden wurden in diesem Falle Fab-Fragmente von Fluorescein-spezifischen Antikörpern (aus Ziege), konjugiert mit alkalischer Phosphatase verwendet. Vor der Färbereaktion wurden die Oozyten in neue Platten überführt, und dann mit dem NBT/BCIP-haltigem APB versetzt. Die Färbereaktion wurde für eine Stunde bis über Nacht durchgeführt und anschließend mit MEMFA gestoppt. Eventuell erfolgte dann ebenfalls eine Entfärbung der Oozyten in einer absteigenden Methanolreihe.

## **2.19 Isolierung von cDNA-Fragmenten aus Phagen-Bibliotheken mittels nicht radioaktiver Hybridisierung**

Um einen Phagen zu isolieren, der die gesuchte cDNA enthielt, wurde eine fraktionierte *Xenopus* Stadium V/VI Oozyten-cDNA-Phagenbibliothek (Claussen, Dissertation, 2002) mit Hilfe der PCR unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide durchmustert. Durch Plattieren der Phagen einer positiven Fraktion, und Identifizierung des positiven Phagen mit Hilfe des „ECL Direct<sup>TM</sup> Nucleic Acid labeling and Detection System“ (Amersham Biosciences) wurde ein reiner Phagenklon isoliert. Der isolierte Einzelphage wurde schließlich mittels eines Helferphagen in ein zirkuläres Phagemid konvertiert, das im weiteren als Plasmid in Bakterien vermehrt werden konnte. Die nicht radioaktive DNA Markierung wurde durch kovalente Kopplung von Meerrettichperoxidase die Einzelstrang DNA erreicht. Die Detektion wird über die Lichtentwicklung durch die durch Meerrettichperoxidase katalysierte Oxidation von Luminol erzielt.

### **2.19.1 Plattieren und Kultivieren von Phagen**

Zunächst wurde ein Einzelkoloniausstrich des Bakterienstammes *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>'</sup> auf tetracyclinhaltigen LB-Agarplatten angefertigt. Mit einer MRF<sup>'</sup>-Einzelkolonie wurde eine Tageskultur in 50 ml LB-Flüssigmedium mit Tetracyclin, 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,2 % Maltose angeimpft. Nach ca. 5 h Wachstum wurden die Zellen bei 4.000 Upm für 10 min in einem GSA-Rotor pelletiert und in 10 mM MgSO<sub>4</sub> zu einer OD<sub>600</sub> von 0.5 resuspendiert.

### **2.19.2 Phagenplattierung auf NZY-Agar-Platten**

Das Präadsorptionsgemisch aus Bakterien und Phagen wurde zu je 3 ml flüssigem NZY-Top-Agar in 12 ml-PPN-Röhrchen pipettiert, welche in einem Heizblock auf genau 48°C vorgewärmt worden waren. Nach der Zugabe wurden die Röhrchen zum Durchmischen kurz zwischen den Handflächen



gerollt und der Inhalt auf vorgewärmten NZY-Agarplatten (d=9.5 cm) verteilt. Nach 1 h Inkubation bei RT, bis zum vollständigen Erstarren des Top-Agars, wurden die Platten invertiert bei 37°C über Nacht inkubiert.

### 2.19.3 Plaque „lifting“

Die Agarplatten wurden für 1 Stunde bei 4°C vorgekühlt. Die Phagenplaques wurden auf vorher markierte Hybond<sup>TM</sup>-N+ Nylonmembran (Amersham Biosciences) durch 2 minütiges Auflegen auf den Top-Agar transferiert. Für ein Duplikat wurde die Transferzeit auf 4 min erhöht. Mit wasserfester Tinte in einer Kanüle wurden gleichzeitig die Membran und der Agar durchstochen, um die Orientierung der Membran auf der Agarplatte zu dokumentieren. Die Membranen wurden 2 min in 0,5 M NaOH zum Denaturieren inkubiert und dann 2x in 5x SSC für 1 min gewaschen. Anschließend wurden die Membranen auf Whatmanpapier kurz getrocknet, bevor im Stratalinker (Stratagene) die DNA auf den Membranen UV-quervernetzt wurde.

### 2.19.4 Prähybridisierung

ECL<sup>TM</sup> Gold Hybridisierungspuffer mit 5 % (w/v) Blocking Reagenz und 0,5 M NaCl wurde hergestellt und auf 42°C vorgewärmt. Die Membranen wurden in ein verschließbares Plastikgefäß mit der DNA Seite nach oben gestapelt, mit Hybridisierungspuffer überschichtet und 1 h bei 42°C auf einer Wippe inkubiert.

### 2.19.5 Markierung der Hybridisierungsprobe

Ein PCR amplifiziertes Fragment von ca. 500 bp Länge wurde nach dem Aufreinigen mit dem „PCR Purification Kit“ (Qiagen) zunächst mit H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 10 ng/μl verdünnt, dann bei 95°C für 5 min denaturiert, bevor zum Markieren jeweils gleiche Volumina Labeling Reagenz und Glutaraldehyd dazugefügt wurden. Die Markierungsreaktion wurde für 10 min bei 37°C inkubiert.

### 2.19.6 Hybridisierung

Der Hybridisierungspuffer wurde gesammelt und 5 ng markierte Probe pro ml Hybridisierungslösung dazu gemischt. Die Membranen wurden mit dem Hybridisierungspuffer überschichtet und für 4 h bei 42°C auf der Wippe inkubiert.

### 2.19.7 Waschen

Nach Entfernen des Hybridisierungspuffers wurden die Membranen 2x für 10 min in 55°C vorgeheiztem Waschpuffer gewaschen, bevor sie in 2x SSC überführt wurden.

**Waschpuffer:** 0,2x SSC, 0,4 % SDS

### 2.19.8 Detektion und Isolierung positiver Plaques

Gleiche Mengen der Detektionsreagenzien 1 und 2 wurden gemischt und auf die Membranen gegeben, so daß diese gleichmäßig benetzt waren. Nach 1 minütiger Inkubation wurden die Membranen in lichtdurchlässige Plastiktaschen verpackt. In der Dunkelkammer wurden die Membranen in Filmkassetten transferiert und ein Hyperfilm™ –ECL™ Film (Amersham Biosciences) wurde 20 min exponiert. Anschließend wurde der Film in einer automatischen Filmentwicklungsmaschine (Optimax, MS–Laborgeräte) entwickelt.

Nur die Plaques, die auch auf dem Duplikat ein Signal ergaben, wurden mit Hilfe eines Skalpell aus dem Topagar herausgeschnitten und in 1 ml SM Puffer mit 20 µl Chloroform gegeben. Nach 90 min Schütteln bei Raumtemperatur konnte diese Lösung für eine zweite Durchmusterung benutzt werden, um einen Einzelphagen zu isolieren.

**SM-Puffer:** 10 mM Tris/HCl (pH 7.5); 8 mM MgSO<sub>4</sub>; 100 mM NaCl; 0,01 % Gelatine; sterilfiltriert

### 2.19.9 *In vivo* Exzision von Phagen-Inserts

Zur Vorbereitung der Exzision wurden Über-Nacht-Kulturen der *E. coli* Stämme XL1-Blue MRF<sup>'</sup> und XLOLR angeimpft, aus welchen Tageskulturen inokuliert wurden. Die XLOLR-Zellen wurden bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub>=1.0 kultiviert. Die OD<sub>600</sub> der MRF<sup>'</sup>-Zellen wurde in 10 mM MgSO<sub>4</sub> auf 1.0 eingestellt. In einem 12 ml-PPN-Röhrchen wurden 200 µl der MRF<sup>'</sup>-Zellsuspension zusammen mit 250 µl der hochkonzentrierten Einzelphagensuspension und 1 µl ExAssist-Helferphage 15 min bei 37°C unter Schwenken inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml LB-Flüssigmedium wurde 2.5 h bei 37°C geschüttelt. Hierbei wurde ein definierter Bereich des Phagen, welcher die inserierte cDNA enthielt, vom Helferphagen einzelsträngig amplifiziert, zirkularisiert und als Phagemid verpackt aus dem Wirtbakterium ausgeschleust. Zum Abtöten des Wirtsbakteriums wurde der Ansatz anschließend für 15 min auf 70°C erhitzt, die Bakterien abzentrifugiert und der Phagemid-Überstand in ein neues 12 ml-PPN-Röhrchen überführt. Um den *E. coli* Stamm XLOLR mit dem Phagemid zu infizieren, wurden in 1.5 ml Eppendorfgefäßen je 10 µl oder 100 µl Phagemid-Überstand mit 200 µl frischen XLOLR-Zellen (OD<sub>600</sub>=1.0) 15 min bei 37°C geschwenkt. Nach Zugabe von 300 µl LB-Medium wurde für weitere 45 min unter Schwenken bei 37°C inkubiert. Aus jedem Ansatz wurden 2×200 µl auf LB-Agarplatten mit Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit den entstandenen Einzelkolonien konnten im Anschluß Flüssigkulturen angeimpft und das isolierte Plasmid mit der gesuchten cDNA amplifiziert werden.

## 2.20 Gewinnung von *Xenopus* Oozyten zur RNA-Präparation, für whole mount *in situ*-Studien und Injektionsexperimente

Zur Entnahme von Ovarialgewebe wurden weibliche, adulte *Xenopus laevis* Albinos für 20 min in 0,25 % 3-Aminobenzoesäureethylester anästhesiert. Nach erfolgter Betäubung des Tieres wurde mit einer Skalpellklinge ein kleiner Einschnitt in die obere Bauchhaut sowie das darunterbefindliche Muskelgewebe eingeführt. Danach konnten mit zwei Pinzetten Ovariallobi der gewünschten Menge entnommen werden. Die Einschnitte wurden anschließend desinfiziert und mit resorbierbarem Nahtmaterial (Ethicon, Norderstedt) verschlossen. Zur Vereinzelung der Oozyten und Entfernung von Bindegewebe und Follikelzellen wurden die Oozyten für zwei bis drei Stunden in Kollagenase-Puffer mit 1 mg/ml Kollagenase (Sigma) inkubiert. Nach Vereinzelung der Oozyten wurden diese intensiv in 1×MBSH gewaschen und über Nacht bei 18°C belassen. Die Bestimmung der Oozyten-Stadien erfolgte nach Dumont, 1972. Die Größensortierung der Oozyten erfolgte entweder manuell oder unter Zuhilfenahme von Sieben aus Nylongewebe unterschiedlicher Maschengröße.

**1×MBSH (modified Barth solution/HEPES):** 80 mM NaCl; 1 mM KCl; 2,4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 20 mM HEPES (pH 7,5); 0,82 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,33 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 0,41 mM CaCl<sub>2</sub>

**Kollagenase-Puffer:** 82,5 mM NaCl; 2 mM KCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM HEPES (pH 7,5)

## 2.21 Präparation von *Xenopus*-Embryonalstadien

### 2.21.1 Präparation von *Xenopus* Testis

Zur Präparation von Testis wurde ein adultes *Xenopus* Männchen zunächst betäubt, dekapitiert und ventral aufgeschnitten. Nach Öffnen der Bauchhöhle wurden dem Tier die Hoden entnommen und in eiskalten 1× MBSH-Puffer überführt. Nach Zugabe von Penicillin/Streptomycin konnten sie bei 4°C bis zu einer Woche gelagert werden.

Penicillin/Streptomycin: 10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin (Sigma), Verdünnung 1:1.000

### 2.21.2 Stimulation der Eiablage

Um die Eiablage für den folgenden Morgen zu stimulieren, wurden einem Weibchen nachmittags 50-100 U humanes Gonadotropin (500 U/ml) und um 22 Uhr je nach Größe des Weibchens 300-600 U (1.000 U/ml) mit einer 1 ml-Spritze mit G27-Kanüle in die dorsalen Lymphsäcke injiziert. Zur meist spontanen Eiablage wurden die Weibchen über eine leere Petrischale gehalten.

### 2.21.3 Befruchtung und Entwicklung von *Xenopus* Embryonen

Die Gelege wurden mit Spermien aus frisch präparierten Hoden befruchtet. Um die Spermien freizusetzen, wurde ca. 1/5 eines Hodens mit einer Mikroschere in 100 µl 1 × MBSH mazeriert.

Unmittelbar vor der Befruchtung wurden die in 1×MBSH inaktiven Spermien mit 1/10 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt. Durch die so erreichte Verringerung der Ionenkonzentration erlangten die Spermien ihre volle Motilität. Mit einer abgeschnittenen gelben Pipettenspitze wurden die Spermien anschließend auf den Gelegen verteilt. Nach dem Ausbreiten der Gelege zu einer Einzelschicht wurden sie 2 Minuten inkubiert und dann mit 1×MBSH überschichtet. 1 h nach der Befruchtung wurden die Embryonen durch 3-5 minütige Inkubation in 2 % Cystein (pH 7.8) unter Schütteln von ihrer Gallerthülle befreit und fünfmal mit 0.1× MBSH gespült. Die Embryonen wurden auf einer Temperierplatte bei 14-20°C bis zu den gewünschten Stadien herangezogen. Um die Feinstrukturen von Albinoembryonen besser erkennen zu können, wurden diese mit dem Vitalfarbstoff Nilblau angefärbt.

**2% Cystein-HCl:** 2 % (w/v) L-Cystein-HCl, pH mit NaOH auf 7.8 einstellen

**Nilblau-Färbelösung:** 0.01% (w/v) Nilblau in 0.1×MBSH, vor Gebrauch filtrieren

## 2.22 Nachweis von RNA-Transkripten durch whole mount *in situ*-Hybridisierung von *Xenopus* Oozyten und Embryonen

Um die räumliche und zeitliche Expression von Genen zu analysieren, bzw. um die Verteilung einer RNA in *Xenopus* Oozyten zu analysieren, wurde die endogene RNA *in situ* mit komplementären, Digoxigenin- oder Fluorescein-markierten antisense RNA-Sonden hybridisiert und in einer antikörpervermittelten Färbereaktion detektiert. Zur Kontrolle der Spezifität können markierte sense RNA-Sonden eingesetzt werden.

### 2.22.1 Fixierung von *Xenopus* Oozyten und Embryonen

Waren die Oozyten oder Embryonen für whole mount *in situ*-Färbungen bestimmt, wurden sie in 5 ml Schraubdeckelglasröhrchen auf einer Wippe für eine Stunde in 1×MEMFA fixiert und anschließend in 100 % Ethanol bei -20°C gelagert.

**MEM (10 ×):** 1 M MOPS, 20 mM EGTA, 10 mM MgSO<sub>4</sub>

**MEMFA (1×):** 1×MEM, 3,7 % Formaldehydlösung

### 2.22.2 Rehydrieren der Oozyten und Embryonen

Soweit nicht anders erwähnt, wurde bei jedem Schritt 5 ml Lösung verwendet. Pro 5 ml-Schraubdeckelröhrchen wurden nicht mehr als 20 Embryonen gleichzeitig behandelt.

	Ethanol (%)	Puffer (%)	Dauer (min)	Anzahl
1.	Ethanol 100 %		5	1×@
2.	Ethanol 75 %	dH <sub>2</sub> O 25%	5	1×@
3.	Ethanol 50%	dH <sub>2</sub> O 50%	5	1×@
4.	Ethanol 25 %	PTw 75 %	5	1×@
5.		PTw 100%	5	4×@

@=kopfüber (Drehrad)

**PTw:** 1×PBS; 0,1 % (v/v) Tween-20

### 2.22.3 Permeabilisieren der Oozyten und Embryonen durch Proteinase K-Behandlung

Um die Oozyten und Embryonen durchlässiger für die RNA-Hybridisierungssonden zu machen, wurden sie abhängig von Stadium bis zu 25 min bei RT in 1 ml PTw-Puffer inkubiert, dem 0.5 µl Proteinase K-Lösung (Merck, 20 mg/ml) zugegeben wurde (Endkonzentration 10 µg/ml).

### 2.22.4 Refixierung

Die durch Proteinase K-Behandlung fragilen Oozyten und Embryonen wurden durch Azetylierung und Inkubation in PTw/Formaldehydlösung refixiert. Die Embryonen wurden in 0.1 M Triethanolamin-Lösung (pH 7.5) umgepuffert, durch zweimalige Zugabe von Azetanhydrid azetyliert und anschließend in PTw + 4 % FA refixiert.

	Puffer	Zugabe von	Dauer (min)	Anzahl
1.	0.1 M Triethanolamin		5	2×@
2.	0.1 M Triethanolamin	12.5 µl Azetanhydrid	5	1×@
3.		12.5 µl Azetanhydrid	5	1×@
4.	PTw		5	2×@
5.	PTw + 4% FA		20	1×@
6.	PTw		5	5×@

Anschließend wurde der PTw-Puffer bis auf 1 ml entfernt und 250 µl Hybridisierungs-Lösung zugegeben. Nach dem Absinken der Oozyten und Embryonen in die Hybridisierungslösung wurde der Überstand abgenommen, durch 500 µl Hybridisierungslösung ersetzt und 10 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert.

**Hybridisierungslösung:** 50 % (v/v) Formamid; 5×SSC; 1 mg/ml Torula RNA (Sigma); 100 µg/ml Heparin (Sigma); 1×Denhard's; 0,1 % (v/v) Tween-20; 0,1 % (w/v) CHAPS (Sigma)

**100×Denhards:** 2 % (w/v) BSA (Serva, Fraktion V); 2 % (w/v) Polyvinyl Pyrrolidone (Sigma); 2 % (w/v); 2 % (w/v) Ficoll 400 in DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O

### 2.22.5 Hybridisierung mit markierten antisense-Sonden

Die Hybridisierungslösung wurde erneut ausgetauscht und die Oozyten und Embryonen für mindestens 6 h bei 60°C prähybridisiert. Nach dem Abnehmen des Überstands und Zugabe der Digoxigenin- oder Fluorescein- markierten RNA-Sonde (Endkonzentration ca. 1 µg/ml) in 500 µl Hybridisierungslösung wurde über Nacht unter leichtem Schütteln bei 60°C hybridisiert.

### 2.22.6 Waschen

Um nicht gebundene, einzelsträngig vorliegende Sonden-RNA zu entfernen, wurden die Oozyten und Embryonen unter stringenten Bedingungen gewaschen und mit 10 µg/ml RNase A und 10 U/ml RNase T1 behandelt. Die Sonden-RNA konnte bei -20°C gelagert und mehrfach verwendet werden.

	Puffer	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Anzahl
1.	Hybridisierungspuffer (500 µl)	60	10	1 x
2.	2×SSC	60	20	3×
3.	2×SSC mit RNasen	37	30	2×
4.	2×SSC	RT	10	1×
5.	0.2×SSC	60	30	2×
6.	MAB	RT	15	2×

**RNasen:** 10 µg/ml RNase A, 10 U/ml RNase T1

**MAB (Maleinsäure-Puffer):** 100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; pH 7,5

### 2.22.7 Antikörper-Inkubation

Die Hybride aus Digoxigenin- bzw. Fluorescein-markierter Sonden-RNA und endogener mRNA konnten mit einem Digoxigenin- bzw. Fluoreszin-spezifischen Antikörper, an den alkalische Phosphatase gekoppelt war, nachgewiesen werden. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die Oozyten und Embryonen vor Zugabe des Detektions-Antikörpers in 2 % Boehringer Mannheim Blockierungs-Reagenz und 20 % hitzeinaktiviertem Pferdeserum (Invitrogen, Berlin) inkubiert.

	Puffer	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Anzahl
1.	MAB + 2 % BMB	RT	60	1×—
2.	MAB + 2 % BMB 20 % Serum	RT	60	1×—
3.	MAB + 2 % BMB 20 % Serum + AK (1 : 5.000)	RT	240	1×—
4.	MAB (Waschen)	RT	30	2×—
5.	MAB (Waschen)	4	über Nacht	1×—

— = horizontale Wippe

### 2.22.8 Farbentwicklung

Alkalische Phosphatase setzt die Substrate NBT/BCIP zu einem dunkelvioletten Farbstoff um. Die Färbereaktion wurde im Dunkeln durchgeführt bis der gewünschte Kontrast einer hohen Signalintensität bei schwacher Hintergrundfärbung erreicht wurde.

	Puffer	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Anzahl
1.	MAB	RT	60	1 x
2.	APB	RT	5	2 x
3.	APB + NBT/BCIP	RT	5 min - 24 h	1 x

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

**Färbelösung NBT/BCIP:** Pro ml APB wurden 1.75 µl NBT (Roche, 100 mg/ml in 70% Dimethylformamid) und 3.5 µl BCIP (Roche, 50 mg/ml in 100% Dimethylformamid) eingesetzt.

### 2.22.9 Abstoppen der Färbereaktion, Auswertung und Konservierung der Präparate

Nach dem Erreichen der gewünschten Farbintensität wurde die Färbereaktion durch Spülen mit dH<sub>2</sub>O abgestoppt. Durch Inkubation in Methanol konnte die Hintergrundfärbung unter optischer Kontrolle reduziert werden. Anschließend wurden die Oozyten und Embryonen in einer absteigenden Methanolreihe rehydriert und in 1×MEMFA fixiert. In 1×MEM-Puffer konnten sie bei 4°C gelagert werden.

	Lösung	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Anzahl
1.	dH <sub>2</sub> O	RT	1	1 x
2.	Methanol 100 %	RT	1-5	1 x
3.	Methanol 75 %	RT	1	1 x
4.	Methanol 50 %	RT	1	1 x
5.	Methanol 25 %	RT	1	1 x
6.	dH <sub>2</sub> O	RT	1	1 x
7.	MEMFA	RT	über Nacht	1 x

Nach der Fixierung wurden die Embryonen nach Bedarf geklärt. Dazu wurden sie erneut in 100 % Methanol dehydriert und zur Klärung in 2:1 (v/v) Benzylbenzoat/Benzylalkohollösung überführt.

### 2.22.10 Vibratomschnitte

Der Embryo wurde zunächst in Gelatine/Albumin Einbettungsmedium ca. 10 min äquilibriert. In einem Wägeschälchen wurde auf Eis 2 ml Einbettungsmedium mit 150 µl 25 % Glutaraldehyd-Lösung (Sigma) vermischt und möglichst luftblasenfrei in eine Silikonform gegossen. Nach dem Verfestigen wurden die Oozyten auf diesen Sockel gebettet und wie gewünscht positioniert. Erneut

wurden 2 ml Einbettungsmedium und 150 µl 25 % Glutaraldehyd-Lösung gemischt und die Oozyten sofort mit der Mischung überschichtet. Nach 10 min wurde der verfestigte Block aus der Form gelöst und mit einer Rasierklinge getrimmt. Das Objekt wurde mit Sekundenkleber in der entsprechenden Orientierung auf einen Metallblock aufgeklebt. Der Objekthalter mit dem Präparat wurde in ein Vibratom (Typ 1000, Pelco International) eingespannt und submers in dH<sub>2</sub>O 10-30 µm dicke Schnitte angefertigt, die mit Hilfe eines feinen Pinsels auf mit Seife gespülte Objektträger überführt wurden. Nach kurzem Trocknen wurden die Schnitte in Moviol-Lösung eingebettet.

**Gelatine/Albumin Einbettungsmedium:** 1×PBS, 4.88 mg/ml Gelatine, 0.3 g/ml Albumin, 0.2 mg/ml Sucrose. Zunächst wurde die Gelatine durch Erhitzen auf ca. 60°C gelöst und nach dem Abkühlen Albumin und Sucrose zugefügt. Die Lösung wurde filtriert (0.45 µm) und aliquotiert bei -20°C gelagert.

**Moviol-Lösung:** 9.6 g Moviol in 19.35 ml 100 % Propantriol lösen, 1 h Rühren. Zugabe von 24 ml dH<sub>2</sub>O, 2 h Rühren. Zugabe von 48 ml 0.2 M Tris-HCl (pH 8.5), 10 min Erhitzen auf 50°C, 15 min bei 5.000 Upm abzentrifugieren. Überstand aliquotiert bei -20°C lagern.

## 2.23 Isolierung von RNA-Lokalisationselementen in Mikroinjektionsexperimenten

### 2.23.1 Kultivierung von *Xenopus* Oozyten (nach Kloc et al., 1999)

Verschiedene Stadien vereinzelter Oozyten wurden in 1×MBSH bei 18°C aufbewahrt. Die Kultivierung von Oozyten in 1× MBSH fördert nicht deren Reifung und Wachstum sowie eine effiziente Lokalisation von endogenen und injizierten RNAs. Daher wurden die Oozyten nach Injektion von exogenen RNAs zur Analyse von Lokalisationselementen in das komplexe, mit Vitellogenin angereicherte OCM (Oozyten Kulturmedium) verbracht.

**Oozyten-Kulturmedium:** 50 % Leibovitz L15-Kulturmedium (Invitrogen); 1 mM L-Glutamin (Invitrogen); 1 µg/ml Schweine-Insulin (Sigma); 15 mM HEPES/NaOH, pH 7,5; 100 µg/ml Gentamycin (Invitrogen); 50 µg/ml Tetracyclin; 50 U/ml Nystatin (Invitrogen); 5 mg/ml Vitellogenin

### 2.23.2 Präparation von Vitellogenin aus Froschserum (nach Kloc et al., 1999)

Zur Präparation von Vitellogenin wurde das Serum 20 weiblicher Frösche verwendet. Zur Anregung der Vitellogenin-Synthese wurde den Fröschen jeweils zehn und sieben Tage vor Blutentnahme 1,5 mg 17-β-Östradiol (Sigma) in die dorsalen Lymphgefäße injiziert. Vor dem Ausbluten der Frösche wurden diese in 0,25 % 3-Aminobenzoessäureethylester anästhesiert. Mit einem dreieckigen Einschnitt wurde dann das Sternum und die Rippen entfernt und das schlagende Herz herausgehoben. Danach wurde ein kleiner Einschnitt in den Herzbeutel eingeführt und das austretende Blut in einem 50 ml Falcon-Gefäß mit 50 % Dulbeccos Kalzium freier Saline (Invitrogen) mit 0,07 M Natriumzitat (pH 7,6) gesammelt. Es wurde so jeweils 1 ml Saline zum Blut von zwei Fröschen gegeben und auf Eis aufbewahrt. Anschließend wurden feste Bestandteile



des Blutes durch Zentrifugation bei 2500  $\times g$  für 15 min abgetrennt. Zur Ausfällung des Vitellogenins wurden jeweils 5 ml Serum mit 20 ml 20 mM EDTA und 1,6 ml 0,5 M  $MgCl_2$  versetzt, durchmischt und für 15 min im GSA-Rotor bei 5000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das leuchtend grüne Vitellogenin-Pellet in 3 ml Puffer A gelöst. Um Magnesiumionen zu entfernen, wurde das Vitellogenin über Nacht im Kühlraum 4 $\times$  gegen 1 Liter 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 in Dialyserrahmen (Slide-A-Lyzer, Pierce) dialysiert. Anschließend wurden die Präparationen zur Mengenabschätzung bei 280 nm im Photometer 1:20 in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 verdünnt gemessen und in 1 ml Aliquots bei  $-20^\circ C$  eingefroren und gelagert. Die Vitellogeninkonzentration der Präparationen konnten über deren Extinktion bei 280 nm multipliziert mit Verdünnungsfaktor und dividiert durch den Koeffizienten 0,75 in mg/ml ermittelt werden. Zu diesem Wert wurde anschließend der Korrekturfaktor von 2,3 mg/ml addiert. Üblicherweise konnten so Vitellogeninkonzentrationen von 40-60 mg/ml ermittelt werden. Es wurden auf diese Weise ca. 40 ml gereinigtes Vitellogenin aus dem Serum von 20 Fröschen gewonnen.

**Puffer A:** 1 M NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 7.5

### 2.23.3 Injektion und Detektion von lacZ-RNA-Fusionen in *Xenopus* Oozyten

Um die cis-agierenden Elemente einer lokalisierten RNA nachzuweisen, können Subfragmente derselben fusioniert an einen RNA-tag, in die Nuklei von Stadium II-IV Oozyten injiziert werden und nach zwei- bis dreitägiger Kultivierung in Oozyten Kulturmedium in der whole mount *in situ*-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten Sonde nachgewiesen werden, die gegen den Fusionsanteil der injizierten RNA gerichtet ist. Entsprechende cDNA-Fragmente der *in vivo* lokalisierten RNAs wurden dazu hinter einen kurzen lacZ-Reporter kloniert und davon *in vitro* transkribierte, Monomethylguanosin-Cap-enthaltene RNAs in die Nuklei von *Xenopus* Oozyten injiziert.

Zur Mikroinjektion von RNA in *Xenopus* Oozyten wurde die RNA mit einer langen Plastikpipettenspitze (Mikroloader von Eppendorf) in eine mit einem Nadelziehgerät ausgezogene Glaskapillare (GC100F-16, Clark Electromedical Instruments, Reading, England) pipettiert. Unter dem Binokular wurde dann mit einer Uhrmacherpinzette die Spitze der Kapillare abgebrochen und diese so geöffnet. Die Injektionsnadel wurde dann in eine Luftdruckregulierte Mikromanipulationsapparatur (Mikroinjektor 5242, Eppendorf) eingespannt. Unter Variation des Injektionsdrucks (1000-2000 hPa) sowie der Injektionszeit (0,1-0,2 sec.) wurden so 2,5 nl der RNA Lösung einer Konzentration von 50 ng/ $\mu l$  in die Zellkerne der *Xenopus* Oozyten injiziert. Dazu wurden die Oozyten in MBSH-Puffer auf einem in eine Zellkulturschale eingeklebten Nylonsiebgewebe (0,2-0,6 cm) ausgerichtet. Nach Injektion wurden die Oozyten in Oozytenkulturmedium überführt und bei  $18^\circ C$  für zwei bis vier Tage kultiviert. Zur Detektion der injizierten RNAs wurden die Oozyten zunächst für 1 h in MEMFA fixiert und dann in die whole mount *in situ*-Hybridisierung eingesetzt.

## 2.24 Analyse von RNA-Protein-Wechselwirkungen

### 2.24.1 UV-Quervernetzungsversuche

Mit der Methode der UV-Quervernetzung können RNA-Protein-Interaktionen durch Einfügung einer kovalenten Bindung zwischen im RNA-Proteinkomplex direkt in Kontakt stehenden Basen- oder Aminosäurereste nachgewiesen werden. Aufgrund der differentiellen Absorption von RNA und Proteinen bei einer Wellenlänge von 254 nm können RNA-Protein-Quervernetzungen in den Komplex eingefügt werden, die Ausbildung von intra-Protein-Quervernetzungen sowie die Degradation von RNA oder Protein jedoch weitgehendst vermieden werden. Durch die Anregung interkalierender  $\pi$ -Elektronensysteme von Uracil- oder aromatischen Aminosäureresten kommt es dabei zur Ausbildung einer kovalenten, intermolekularen  $\sigma$ -Bindung. An die Behandlung des RNA-Proteinkomplexes mit UV-Licht schließt sich die Analyse der miteinander vernetzten Komponenten durch RNase-Behandlung, SDS-PAGE und Auswertung im Phosphoimager an.

Üblicherweise wurden zum Nachweis von RNA-Protein-Interaktionen durch UV-Quervernetzung 2,5  $\mu$ l *Xenopus*-Oozyten S100-Extrakt (10 mg/ml Proteingehalt) mit 5 $\times$  UV-Quervernetzungsmix, Kompetitor-RNA und DEPC-behandeltem Wasser in einem Volumen von 9  $\mu$ l in einem Eppendorfreaktionsgefäß zusammengefügt und zehn Minuten bei RT inkubiert. Danach wurde 1  $\mu$ l einer mit  $\alpha^{32}$ P-UTP während der *in vitro*-Transkriptionsreaktion markierten RNA hinzugegeben und weitere 10 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine zehnminütige Behandlung des Reaktionsansatzes mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm im Stratalinker (Stratagene). Der Abstand zwischen Probe und UV-Lichtröhre betrug dabei 5 cm. Zur Entfernung der nicht-quervernetzten RNA aus dem Reaktionsansatz, wurde dieser mit 2  $\mu$ l RNase A (5 mg/ml) versetzt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Zur weiteren Analyse wurden die Proben zusammen mit einem radioaktiv markiertem Molekulargewichtstandard oder einem „prestained“ Marker über SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel in Methanol-Essigsäure fixiert, getrocknet und mit dem Phosphoimager ausgewertet.

**Bindungs-Bedingungen für den UV-Quervernetzungsversuch:** 5 mg/ml Heparin; 1 % (v/v) Propantriol; 50 mM KCl; 10 mM DTT; 5.2 mM HEPES (pH 7.9); 1,5 mM ATP; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM EDTA; 40  $\mu$ g/ml tRNA

### 2.24.2 Koimmunopräzipitation von RNA

Zur Untersuchung von RNA-Protein-Wechselwirkungen wurde die Methode der Koimmunopräzipitation radioaktiv markierter RNAs mit *in vitro* translatierten, myc-Epitop-markierten und immobilisierten Proteinen verwendet. Dafür wurden zunächst die zu untersuchenden Proteine in Retikulozytenlysat, nicht radioaktiv, translatiert. Anschließend wurde dem Ansatz die zu untersuchende *in vitro* transkribierte und radioaktiv markierte RNA zugesetzt (ca. 200000-400000 cpm/ $\mu$ l) und für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurden die Reaktionsansätze in

500 µl NET-2-Puffer auf ein  $\alpha$ -myc-Immunopellet gegeben und für 1,5 h bei 8°C auf einem Drehrad rotiert. Anschließend wurden 200 µl des Überstandes mit der ungebundenen RNA abgenommen und Phenol/Chloroform-extrahiert. Die Immunopellets wurden 3× mit 800 µl NET-2-Puffer gewaschen, um nichtgebundene RNAs aus dem Ansatz zu entfernen. Das Pellet wurde anschließend in 200 µl NET-2 mit 20 µl 10 % SDS und Fällungs-tRNA versetzt und die RNA aus dem Ansatz Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt. Die RNA-Pellets wurden anschließend in 10 µl Harnstoff-RNA-Auftragspuffer aufgenommen und auf einem 8% Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit dem Phosphoimager ausgewertet.

**NET-2-Puffer:** 50 mM Tris/HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 0,05 % NP 40; eventuell wurden vor Anwendung 1 mM PMSF und Proteaseinhibitor-Tabletten (Roche) zugefügt.

### 2.24.3 Herstellung von $\alpha$ -myc-Immunopellets

Zur Herstellung von Immunopellets wurden anti-Myc-Antikörper (9E10; Santa Cruz) an eine Sepharosematrix gebunden. Pro Pellet wurden dabei 15 µl Protein-G-Sepharose und 1 µl Antikörperlösung eingesetzt. Die Sepharosematrix wurde vorangehend dreimal mit NET-2-Puffer gewaschen und anschließend für 1 h bei RT mit dem Antikörper inkubiert. Um nichtgebundene Antikörper zu entfernen, wurde das Sepharosepellet wiederum dreimal mit NET-2-Puffer gewaschen und anschließend in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Immunopellets bei 4°C gelagert.

### 2.25 Mikroinjektion von *Xenopus* Embryonen

Zur Überexpression von Proteinen wurde beim Erreichen des 2- Zell-Stadiums synthetische Cap-mRNA in einzelne Blastomere von *Xenopus* Embryonen injiziert. Die Injektion erfolgte dabei ebenso wie unter 2.23.3 für Oozyten Injektionen beschrieben wurde. Vor der Injektion wurden die zu injizierenden Embryonen in Injektionspuffer überführt und auf mit Repell-Silan beschichtete Objektträger aufgebracht. Nach 1 h Inkubation in Plastikkulturschalen (Greiner) wurden die Embryonen in Post-Injektionspuffer überführt, der nach ca 30 min gegen 0.1×MBSH ausgetauscht werden konnte. Zur Fixierung wurden die Embryonen bei RT 1 h in 1×MEMFA inkubiert und anschließend in 1×MEM bei 4°C gelagert.

Die fotografische Dokumentation von phänotypischen Effekten der Injektion auf die Embryonalentwicklung erfolgte mit Hilfe eines Stereomikroskops (Stemi SV 6, Zeiss) mit Kameraaufsatz (Zeiss).

**Injektionspuffer:** 1% Ficoll, 1×MBSH

**Post-Injektionspuffer:** 0.5% Ficoll, 0.1×MBSH

### 2.26 Klonierungen

**KH7:** Dieses pBK-CMV Plasmid enthält die cDNA der Klon 20 RNA (XDead end), die aus der Stadium V/VI Oozyten cDNA-Bibliothek isoliert werden konnte.

**KH9:** Dieses pBK-CMV Plasmid enthält die cDNA der Klon 22 RNA (Glycerolkinase), die aus der Stadium V/VI Oozyten cDNA-Bibliothek isoliert wurde.

### 2.26.1 Subklonierung von Fragmenten der XDead end (Klon 20) cDNA

**KH8 lacZfull:** Dieses Plasmid enthält die XDead end (Klon 20) cDNA 3' hinter der *lacZ*-Sequenz des Plasmids MC 161 (Claußen, Dissertation, 2002) und wurde zur Generierung einer Fusions-RNA zur Injektion in Oozyten benutzt. Zur Erstellung des Plasmids wurde die Klon 20 cDNA mit den Enzymen *Bam*HI und *Xho*I aus dem Plasmid KH7 ausgeschnitten und dieses Fragment in den mit *Bam*HI und *Xho*I linearisierten Vektor MC161 ligiert.

**KH11 lacZORF:** Dieses Plasmid enthält die kodierende Region der XDead end (Klon 20) cDNA, die hinter die *lacZ*-Reportersequenz fusioniert wurde. Die kodierende Region wurde mit folgenden Primern in der PCR amplifiziert, in den pGEM-T Vektor ligiert, aus diesem *Bam*HI/*Xho*I herausgeschnitten und schließlich in den *Bam*HI/*Xho*I geschnittenen Vektor MC161 ligiert.

T3: ATTAACCCTCACTAAAGGGA  
20XhoI-2: TTGGTTTGGTCATTCTCGAGGC

**KH12 lacZUTR:** Dieses Plasmid enthält den 3'-untranslatierten Bereich der XDead end (Klon 20) cDNA, die hinter die *lacZ*-Reportersequenz fusioniert wurde. Der 3'-UTR wurde mit folgenden Primern in der PCR amplifiziert, in den pGEMT-Vektor ligiert, aus diesem *Bam*HI/*Xho*I herausgeschnitten und schließlich in den *Bam*HI/*Xho*I geschnittenen Vektor MC161 ligiert.

20BamHI-1: GCGGATCCAATGACCAAACCAA  
T7: TAATACGACTCACTATAGGGCGA

Die folgenden Plasmide enthalten jeweils Fragmente des 3'-UTRs der XDead end cDNA die mit den folgend aufgeführten Primern in der PCR amplifiziert wurden, in der pGEM-T Vektor ligiert wurden und dann schließlich über die *Bam*HI/*Xho*I Schnittstellen in den Vektor MC161 ligiert wurden.

**KH13:** Nukleotide 1100–1338

20\_1Bam: CTCACTGGGAGACGTCACGGATTC  
20\_1Xho: CTCGAGATTAGCTTTACACCAATGC

**KH14:** Nukleotide 1296–1547

20\_2Bam: CTGCCCTTGCATCCTACATTTGGATCC  
20\_2Xho: CTCGAGGCAGGGAGCAGGCAGATGACG

**KH15:** Nukleotide 1460–1726

20\_3Bam: GGATCCTTCGGAAGGGCTTTCCTGGTG  
20\_3Xho: GTCAGCCAACCAGTGACTAACCTCGAG

**KH16:** Nukleotide 1675–1904

20\_4Bam: GGATCCCCTCCACATAGGTAAAA

T7: TAATACGACTCACTATAGGGCGA

**KH17:** Nukleotide 1275–1426

20F2-1Bam: CGCGAATCCTCTGCCCTTGCATCCTAC

20F2-1Xho: CCGCTCGAGGTGGCAACACTATTTTCG

**KH18:** Nukleotide 1408–1547

20F2-2Bam: CGCGGATCCGATCGGAAAATAGTGTTC

20F2-2Xho: CTCGAGGCAGGGAGCAGGCAGATGACG

Das Plasmid **KH31** enthält das 3'-UTRs der XDead end cDNA ohne den Bereich der cDNA von Nukleotid 1296 bis 1547. Das Fragment von Nukleotid 1460 bis 1904 wurde mit den folgend aufgeführten Primern in der PCR amplifiziert und in den pGEM-T Vektor ligiert. Anschließend wurde dieses Fragment über die *XhoI* Schnittstelle in den Vektor KH13 ligiert.

20ΔF2 CTGCATCTGCCTGCTCCCTGCACCTCGAG

T7: TAATACGACTCACTATAGGGCGA

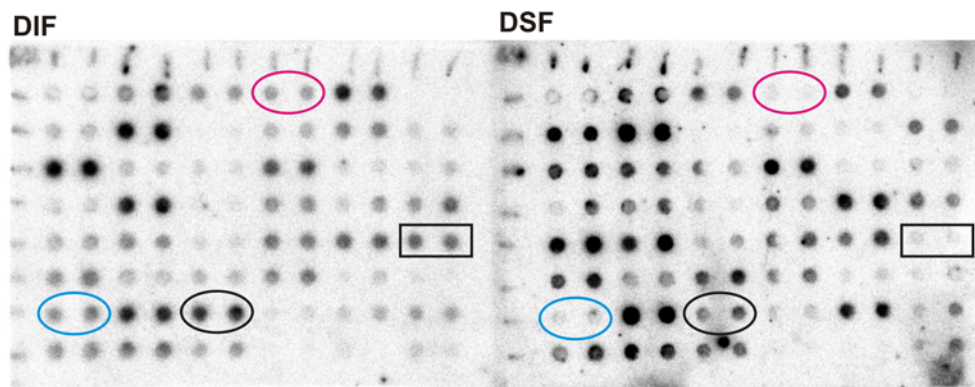
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Identifizierung vegetal lokalisierter RNAs mittels differenzieller Hybridisierung von Macroarrays und anschließender whole mount *in situ* Hybridisierung

Die Lokalisation maternaler Faktoren am vegetalen Pol der *Xenopus* Oozyte ist essentiell für eine asymmetrische Zellteilung und differentielle Musterbildung während der Embryogenese. Eine Identifikation dieser Faktoren trägt somit zum Gesamtverständnis der Organisation der Bildung hochdifferenzierter Strukturen bei. Um die vegetal in der *Xenopus* Oozyte angereicherten Transkripte zu isolieren, wurden in der Vergangenheit unterschiedliche experimentelle Strategien gewählt. Die *Vgl* mRNA (Rebagliati et al., 1985) wurde in einem Filterscreening durch differentielle Hybridisierung mit radioaktiv markierten cDNA Sonden, hergestellt aus dem animalen bzw. vegetalen Pol unbefruchteter Eizellen, isoliert. Auf Grund der Eigenschaft von vegetal lokalisierten RNA Molekülen, stabil mit dem Zytoskelett des vegetalen Kortex verbunden zu sein (Pondel and King, 1988; Yisraeli et al., 1990), konnten vegetal lokalisierte RNAs aus cDNA Banken isoliert werden, die aus Detergenzien-unlöslicher und somit Zytoskelett-assoziiertes RNA hergestellt wurden (Forristall et al., 1995; King, 1995; Mosquera et al., 1993). Um gezielt vegetal lokalisierte RNA Moleküle zu identifizieren, die nach den Merkmalen des frühen Lokalisationsweges verteilt und mit dem Keimplasma assoziiert sind, wurde außerdem eine cDNA Bibliothek durchmustert, die aus der RNA der mitochondrialen Wolke hergestellt worden ist (Chan et al., 1999; Zearfoss et al., 2004).

Zur Isolation noch unbekannter vegetal lokalisierter RNA Moleküle wurde in der vorliegenden Arbeit eine  $\lambda$ TriplEx2 Phagenbibliothek (Claußen, Dissertation 2002), (Claussen et al., 2004; Claussen and Pieler, 2004) benutzt. Für die Herstellung dieser mit vegetal/kortikal-assoziierten Transkripten angereicherten cDNA Bibliothek wurde ausschließlich RNA verwendet, die zuvor aus vegetalen Kortexen aus Stadium VI Oozyten präpariert wurde. Zunächst wurde der Titer der Phagenbibliothek bestimmt. Dieser betrug  $1,6 \times 10^6$  pfu/ml. Zur Durchmusterung der cDNA Bibliothek wurde diese zunächst im großen Maßstab exzisiert. Ungefähr 10000 einzelne Bakterienklone wurden gepickt, in Flüssigkultur gebracht und Glycerinstammkulturen angelegt. Anschließend wurden die cDNA Inserts von 600 Bakterienklonen mittels PCR amplifiziert und in Duplikaten auf zwölf Macroarrays gebracht. Mit dem Ziel, diejenigen cDNAs auszuwählen, die eine vegetal lokalisierte RNA repräsentieren könnten, wurden zunächst Detergenzien-unlösliche

(DIF) bzw. lösliche (DSF) RNA Fraktionen aus Stadium V und VI *Xenopus* Oozyten gewonnen (Zhang and King, 1999). In diesen Stadien ist der Lokalisationsprozeß abgeschlossen und die RNAs sind am vegetalen Kortex verankert. Die vegetal lokalisierten Transkripte in der *Xenopus* Oozyte sind stark mit dem kortikalen Zytoskelett verbunden. Die DIF RNA Fraktion beinhaltet Zytoskelett und Kortex-assoziierte RNAs, die in hohen Salzkonzentrationen und Detergenzien unlöslich sind. Es handelt sich hier also um eine RNA Fraktion, die mit vegetal lokalisierten RNA Molekülen angereichert ist (Forristall et al., 1995). Anschließend wurden identische Macroarrays jeweils parallel mit  $^{32}\text{P}$ -dCTP markierter DIF bzw. DSF cDNA, die aus den DIF und DSF RNA Fraktionen hergestellt wurde, hybridisiert. Mit Hilfe eines Phosphoimagers wurden die aus der Hybridisierung resultierenden Signale detektiert (exemplarisch dargestellt in Abb.3.1). Ausgehend von einem mehr als zweifach stärkeren Signal nach der Hybridisierung mit der DIF cDNA im Vergleich zu DSF cDNA, welches über das ImageQuant Programm (Amersham Biosciences) ermittelt wurde, konnten 25 Kandidaten zur weiteren Analyse mittels whole mount *in situ* Hybridisierung ausgewählt werden.

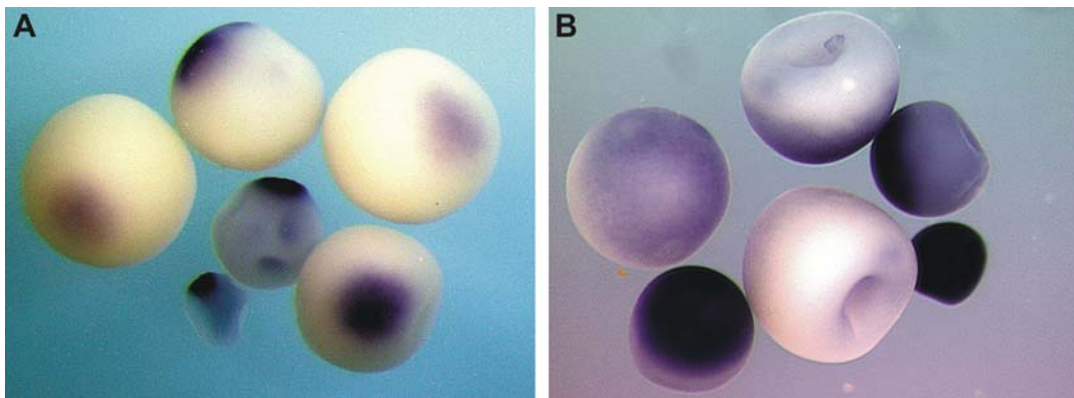


**Abb.3.1** Differentielle Hybridisierung von Macroarrays zur Vorauswahl potentiell vegetal lokalisierter RNAs.

Die Abbildung zeigt zwei Duplikate eines Macroarrays, die parallel mit DIF und DSF cDNA hybridisiert und mittels Phosphoimager ausgewertet wurden. Die als Positivkontrolle dienende Vg1 cDNA (Rebagliati et al., 1985) ist mit einem schwarzen Kasten eingrahmt. Mit Ellipsen eingrahmt sind die ausgewählten Kandidaten. Zusätzlich farblich markiert sind die Klone, die nach der *in situ* Hybridisierung als lokalisierte RNAs identifiziert werden konnten (blau, Kl 23 und rot, Kl 22).

Für die Verifizierung einer vegetalen Lokalisation mittels whole mount *in situ* Hybridisierung dienen die ausgehend von den Bakterienklonen amplifizierten PCR Produkte als Matrize zur Herstellung Fluoreszin-markierter antisense RNA Sonden. Mit der Analyse der 25 ausgewählten Kandidaten in der whole mount *in situ* Hybridisierung

konnte für 11 Klone eine Lokalisation am vegetalen Kortex nachgewiesen werden (Abb.3.2).



**Abb.3.2 Verifikation der vegetalen Lokalisation in der whole mount *in situ* Hybridisierung.** Exemplarische Darstellung der in der *in situ* Hybridisierung nachgewiesenen Lokalisation der endogenen mRNA am vegetalen Pol der *Xenopus* Oozyte. A. Xotx1; B. Kl 23

Nach dem Ansequenzieren der cDNAs dieser 11 lokalisierten Klone stellte sich heraus, daß sechs RNAs schon bekannten Transkripten entsprachen (2x *VegT*, *Fatvg*, *XVelo1*, *BicaudalC*, *DEADSouth* und *Xotx1*). Zusätzlich konnten vier neue RNAs identifiziert werden, die nach der Analyse in der whole mount *in situ* Hybridisierung Charakteristika des späten Lokalisationsweges aufweisen. Alle vier cDNAs enthielten unvollständige Fragmente noch unbekannter RNA Moleküle (siehe Tabelle 3.1).

<i>Lokalisation</i>	<i>reidentifizierte RNAs</i>	<i>neu identifizierte RNAs</i>
spät	2x <i>VegT</i> , <i>XVelo1</i> , <i>Fatvg</i> , <i>BicaudalC</i>	Kl 18, Kl 20, Kl 22, Kl 23
früh	<i>DEADSouth</i> , <i>Xotx1</i>	

**Tabelle 3.1 Insgesamt 11 lokalisierte RNAs wurden in der whole mount *in situ* Hybridisierung als vegetal lokalisiert bestätigt.**

Von 25 nach differentieller Hybridisierung ausgewählten Klonen wurden in der whole mount *in situ* Hybridisierung 4 spät und 2 früh lokalisierte RNAs reidentifiziert. Außerdem wurden vier unbekannte RNAs identifiziert, die aufgrund ihres Verteilungsmusters in verschiedenen Oozytenstadien zur Gruppe der spät lokalisierten RNAs gehören.



### 3.2 Durchmusterung der $\lambda$ TriplEx2 Phagenbibliothek im Großmaßstab zur Identifikation neuer vegetal lokalisierter Transkripte

Das Ziel dieser Arbeit war es, möglichst die gesamte Population der in der *Xenopus* Oozyte vegetal lokalisierten Transkripte zu identifizieren. Mit der auf Macroarray-basierenden Durchmusterungsmethode ist es aber nicht möglich, eine tatsächlich repräsentative Anzahl an Klonen der vegetal/kortikal angereicherten  $\lambda$ TriplEx2 Phagenbibliothek zu analysieren. Aus diesem Grund wurden mögliche Kandidatenklone, ähnlich wie im vorherigen Kapitel beschrieben, basierend auf Microarray Hybridisierungen ausgewählt. So wurden zunächst cDNA Inserts der  $\lambda$ TriplEx2 Phagenbibliothek in der PCR amplifiziert und auf einen speziell beschichteten Glasobjekträger gebracht. Auf diese Weise entstand ein Microarray mit Inserts von ungefähr 10000 cDNA Klonen der vegetal/kortikal angereicherten  $\lambda$ TriplEx2 Phagenbibliothek. Zur Vorselektion möglicher vegetal lokalisierter Kandidaten wurden zwei unabhängige RNA Präparationen der in hohen Salzkonzentrationen und Detergenzien unlöslichen bzw. löslichen RNA Fraktionen (DIF bzw. DSF) gewonnen. Zur Herstellung von Cyanine 3- bzw. 5- dCTP markierter Proben für die Hybridisierung wurden anschließend diese DIF bzw. DSF RNA Fraktionen benutzt. Um aussagekräftige Daten aus diesem Hybridisierungsexperiment zu erzielen, wurde das Experiment im sogenannten „Dye-Swap“- Design (Kerr and Churchill, 2001) durchgeführt. Das Prinzip dieses Designs ist, jede Hybridisierung zweimal mit der umgekehrten Farbmarkierung in der zweiten Hybridisierung durchzuführen. Dazu wurden zwölf identische Microarrays mit jeweils unterschiedlich markierter DIF und DSF cDNA parallel in unterschiedlichen Kombinationen, wie in Tabelle 3.2 aufgelistet, hybridisiert.

<i>Microarray</i>	<i>Cy3-markiert</i>	<i>Cy5 -markiert</i>
1	DIF-1	DSF-1
2	DSF-1	DIF-1
3	DIF-1	DSF-1
4	DSF-1	DIF-1
5	DIF-1	DSF-1
6	DSF-1	DIF-2
7	DIF-2	DSF-2
8	DSF-2	DIF-2
9	DIF-2	DSF-2
10	DSF-2	DIF-2
11	DIF-2	DSF-2
12	DSF-2	DIF-2

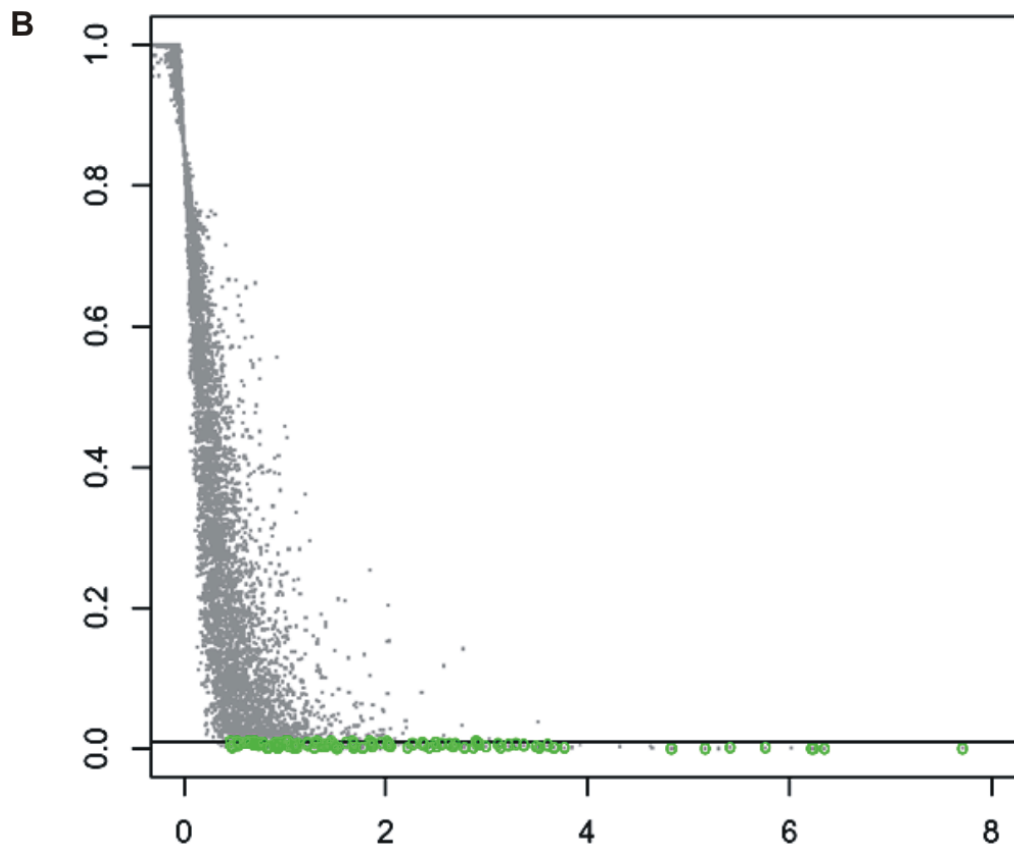
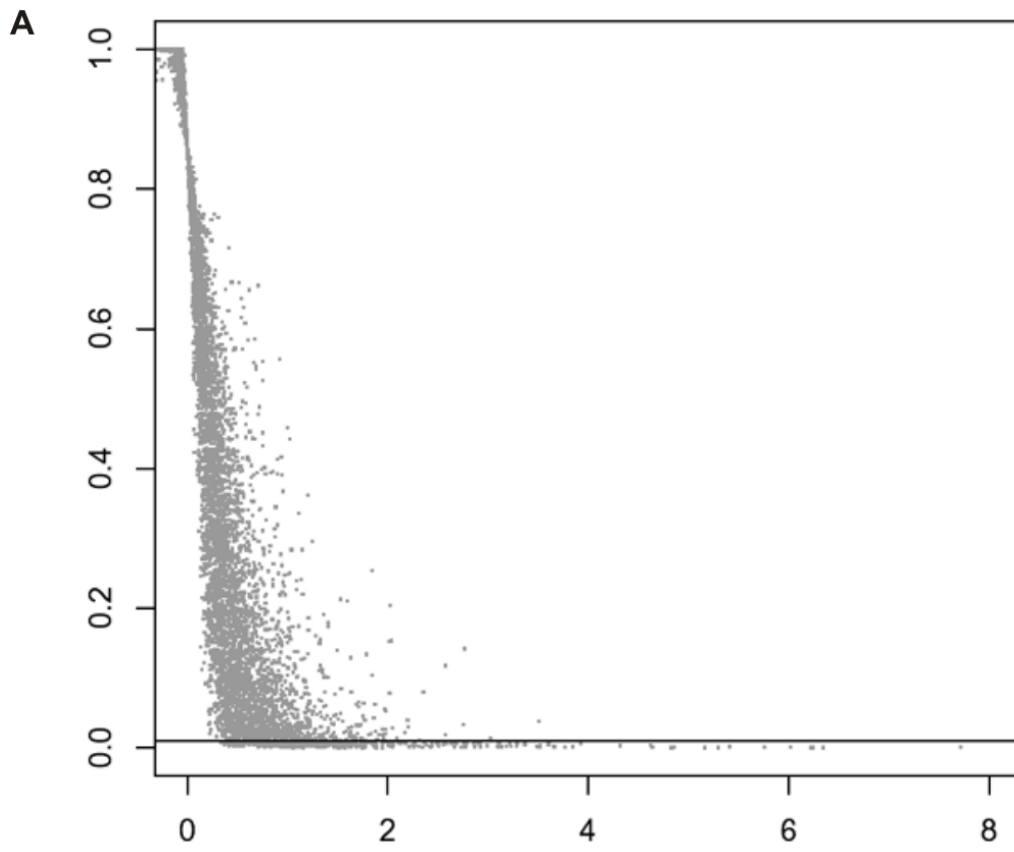
**Tabelle 3.2 Hybridisierung der Microarrays im „Swap“- Design.**

Die Tabelle zeigt die jeweilige Kombination der unterschiedlich markierten DIF und DSF cDNAs, die zusammen auf einem Microarray hybridisiert wurden. DIF-1 bzw. DIF-2 entsprechen cDNAs aus unabhängigen RNA Präparationen.

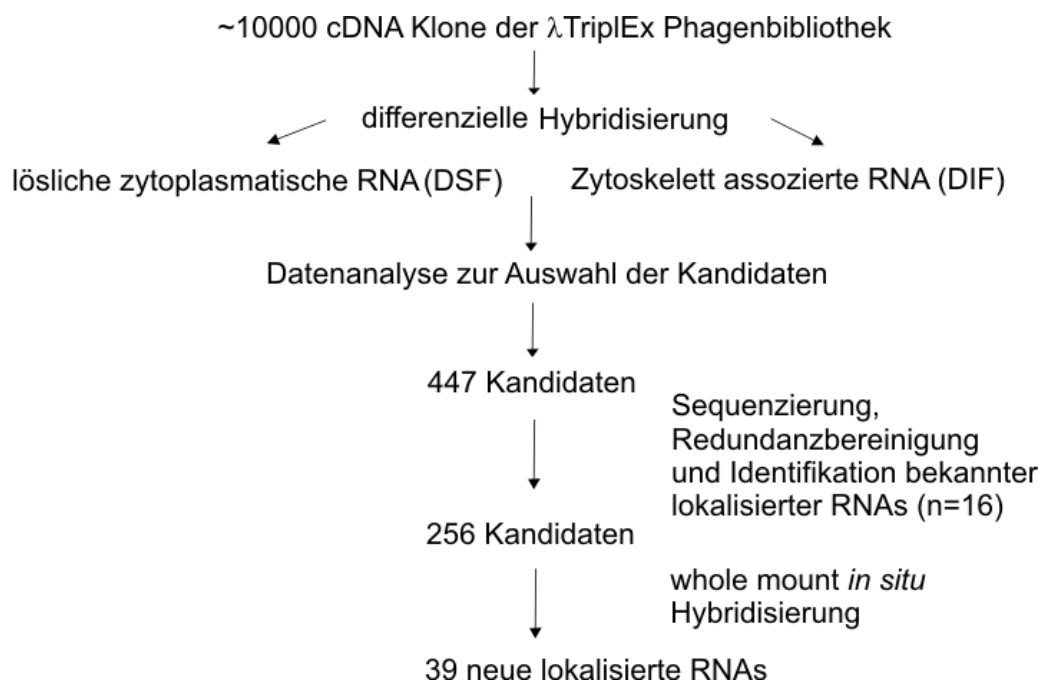
Die durch Scannen im Cy3- und Cy5 -Kanal entstandenen Bilder wurden mit der Imagene 4 Software (Biodiscovery) ausgewertet. Durch biologische Variationen des RNA Ausgangsmaterials, durch experimentelle Variationen, z.B. verursacht durch einen ungleichen Einbau von Cy3-dCTP im Vergleich zu Cy5-dCTP bei der Herstellung der markierten cDNA, sowie durch bei der Messung entstehende Variationen, resultierend aus der unterschiedlichen Detektionseffizienz der Cyanidine, entsteht Datenrauschen. Um dieses zu eliminieren, wurden die aus der Bildauswertung erhaltenen Daten zunächst normalisiert. Diese Normalisierung erfolgte nach der von Yang et al. beschriebenen Methode (Yang et al., 2002). Das wesentliche Prinzip dieses Normalisierungsverfahrens ist die Annahme, daß nur ein kleiner Teil der untersuchten Gene differenziell exprimiert ist. Um geeignete Kandidaten zur weiteren Analyse in der whole mount *in situ* Hybridisierung auszuwählen, wurde eine Kontrastabschätzung der normalisierten Daten nach der DaMA Methode (Landgrebe et al., 2004) vorgenommen. Außerdem wurde durch einen einseitigen *t*-Test die Signifikanz der Daten, die im sogenannten p-Wert ausgedrückt ist, bestimmt. Diese Daten sind in Abbildung 3.2 graphisch dargestellt. Ausgehend von den berechneten Kontrast - und Signifikanzwerten wurden 447 Kandidatenklone zur weiteren Analyse ausgewählt, die alle unterhalb des Signifikanzschwellenwertes  $\leq 0,01$  liegen (siehe Abbildung 3.3 A).

**Abb.3.3 Graphische Darstellung der berechneten Kontrastwerte und der dazugehörigen Signifikanzwerte im Scatterplot.**

Auf der Abzisse dargestellt ist der Kontrastwert angegeben als Wert  $\log_2(\text{DIF/DSF})$ . Die Ordinate gibt den Signifikanzwert (p-Wert) an. In Abbildung A ist der Signifikanzschwellenwert  $\geq 0,01$  eingetragen. Abbildung B zeigt die als *vegetal* lokalisiert verifizierten Klone mit einem grünen Kreis markiert.



Zunächst wurde die cDNA dieser ausgewählten Klone sequenziert, mit dem Ziel redundante Klone zu eliminieren und bekannt vegetal lokalisierte RNAs zu identifizieren. Durch das Ansequenzieren aller cDNA Inserts aus der 5'-Richtung konnten mit Ausnahme der früh lokalisierten RNAs *Xpat* und *Xwnt11* alle schon bekannten vegetal lokalisierten RNAs reidentifiziert werden. Viele dieser bekannten Transkripte wurden in mehreren Kopien isoliert. 256 Klone bildeten anschließend die Gruppe von Kandidaten, die hypothetisch nur eine RNA repräsentieren und eine noch unbekannt subzelluläre Verteilung in der *Xenopus* Oozyte aufweisen (Abb. 3.4). Diese verbliebenen Kandidatenklone wurden in der whole mount *in situ* Hybridisierung auf eine mögliche Anreicherung am vegetalen Pol der Oozyte hin untersucht. So konnten schließlich insgesamt 39 neue vegetal lokalisierte RNAs identifiziert werden. Von diesen noch unbekannt vegetal lokalisierten RNAs werden 14 RNAs nach den Charakteristika des frühen, 23 RNAs nach dem späten und zwei RNAs nach Merkmalen des intermediären Verteilungsweges lokalisiert (siehe auch Tabelle im Anhang).

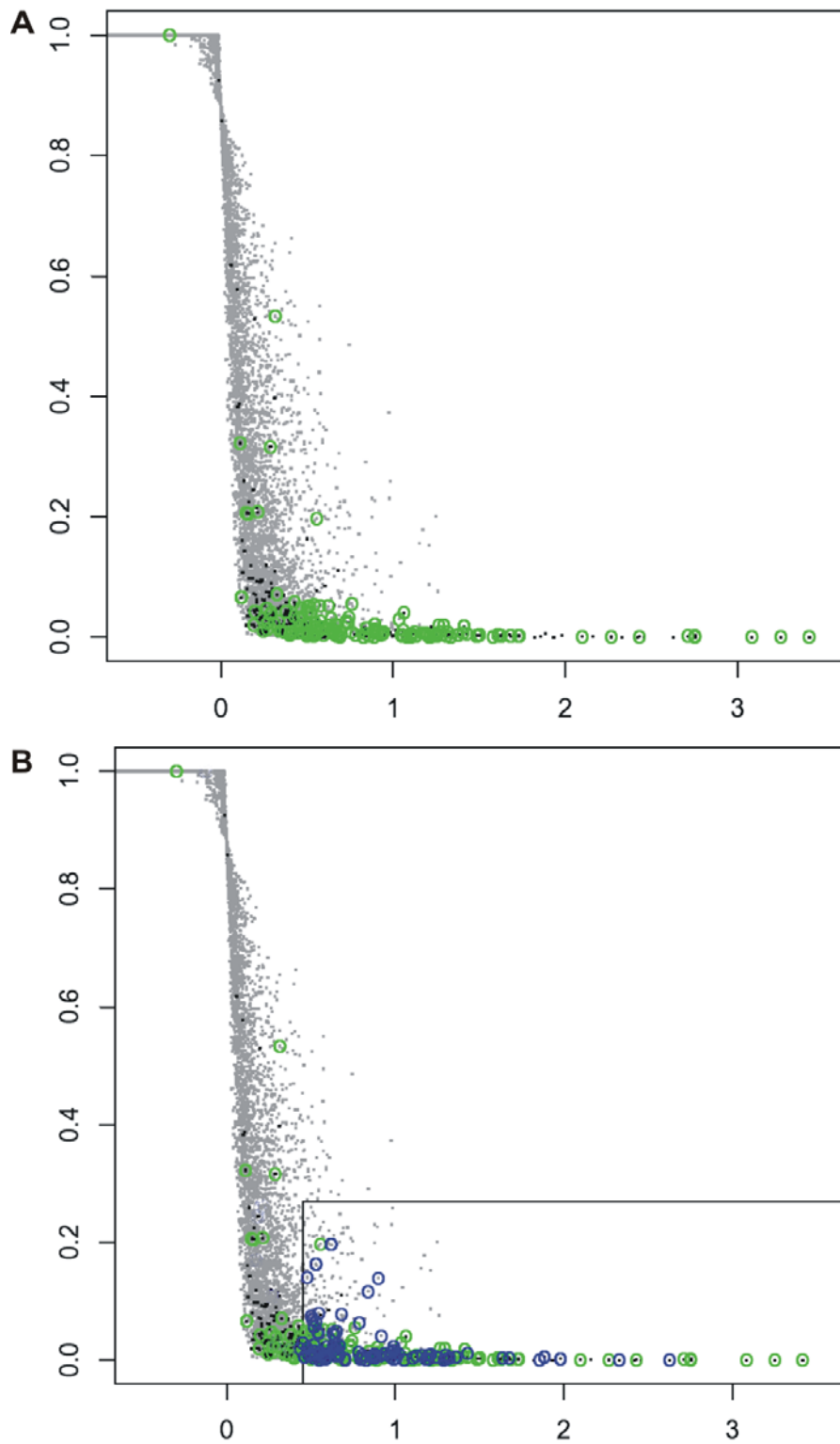


**Abb.3.4 Darstellung der experimentellen Strategie zur Identifikation neuer vegetal lokalisierter RNAs.**

Von ungefähr 10000 Klonen wurden nach differenzieller Hybridisierung 447 Kandidatenklone ausgewählt, zunächst sequenziert, Redundanz bereinigt und bekannte lokalisierte RNAs aussortiert. Zur Verifikation der vegetalen Lokalisation wurden 256 Kandidaten in der whole mount *in situ* Hybridisierung überprüft und 39 neue lokalisierte RNAs konnten identifiziert werden.

Betrachtet man die Gesamtzahl der ausgewählten Kandidaten ( $n = 447$ ) und die Zahl der als vegetal lokalisiert (re)identifizierten RNAs ( $n = 174$ ), konnte mehr als jeder dritte ausgewählte Kandidat als vegetal lokalisierte RNA verifiziert werden (siehe Abbildung 3.3 B).

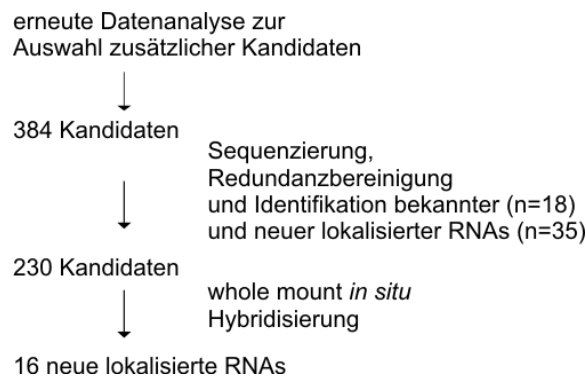
Ein weiterer interessanter Aspekt der Ergebnisse der Suche nach vegetal lokalisierten RNAs ist die Beobachtung, daß nur wenige der neu identifizierten vegetal lokalisierten RNAs in mehreren Kopien isoliert werden konnten. Der größere Teil (16 Klone) wurde nur einfach identifiziert. Diese Tatsache könnte ein Argument dafür sein, viele seltene vegetal lokalisierte RNA identifiziert zu haben. Andererseits könnte es auch dafür sprechen, noch nicht ausreichend viele Kandidatenklone analysiert zu haben. Außerdem konnten die früh lokalisierten RNAs *Xpat* und *Xwnt11* nicht isoliert werden. Ausgehend von der Annahme eine noch nicht ausreichend große Anzahl an Kandidaten überprüft zu haben, sollten deshalb weitere potentiell lokalisierte cDNA Klone ausgewählt werden. Zunächst aber wurden die Bilder, die nach der Microarrayhybridisierung entstanden waren, in einer neuen Bildanalysesoftware (Scanarray Express; Perkin Elmer), die eine optimierte Hintergrundintensitätsberechnung aufweist (Katzner et al., 2003), ausgewertet. Der Kontrast der Expression und die Signifikanz dieser Werte wurde nach den zuvor benutzten Methoden ermittelt und ist in Abbildung 3.5 A dargestellt. In dieser Abbildung ist zu erkennen, daß resultierend aus der erneuten Datenauswertung für viele der Klone, die in der ersten Runde ausgewählt wurden, nun höhere Signifikanzwerte berechnet wurden. Es existieren jedoch auch Klone, denen nach der ersten Auswertung Werte zugeordnet worden sind, die oberhalb des Signifikanzschwellenwertes lagen und daraufhin nicht ausgewählt wurden. Nach der zweiten verbesserten Auswertung liegen diese Klone nun im Bereich unterhalb des zuvor gewählten Signifikanzschwellenwertes. Ein weiteres Ergebnis dieser erneuten Datenauswertung ist die Tatsache, daß mehr potentielle Kandidaten mit einem höheren Kontrastwert (ab  $\sim 0,5$  siehe Abbildung 3.3 A) als vegetal lokalisiert verifiziert werden konnten. Auf Grund dieser Beobachtungen wurden für eine zweite Runde der Durchmusterung nach vegetal lokalisierten RNAs nochmals 384 Kandidaten mit einer geringeren Signifikanz aber auch größeren Kontrastwerten ausgewählt (siehe Abbildung 3.5 B).



**Abb.3.5 Graphische Darstellung der berechneten Kontrastwerte und der dazugehörigen Signifikanzwerte im Scatterplot nach erneuter Bildauswertung.**

Auf der Abzisse dargestellt ist der Kontrastwert angegeben als Wert  $\log_2(\text{DIF}/\text{DSF})$ . Die Ordinate gibt den Signifikanzwert (p-Wert) an. In der Abbildung sind die in der ersten Durchmusterungsrunde ausgewählten Kandidaten schwarz markiert. Grün markiert sind die verifizierten vegetal lokalisierten Klone. Abbildung A zeigt die in der ersten Runde ausgewählten Kandidaten (schwarz) und die als vegetal lokalisiert identifizierten Klone (grün). In Abbildung B ist der Bereich der zusätzlich ausgewählten 384 Klone markiert. Blau gekennzeichnet sind lokalisierte RNAs, die in der zweiten Runde zusätzlich identifiziert wurden.

Die auf die oben beschriebene Weise zusätzlich ausgewählten 384 Kandidatenklone wurden zunächst wieder ansequenziert, um bekannte RNAs und die in der ersten Runde neu isolierten RNAs auszusortieren und redundante Klone zu eliminieren. Durch die Sequenzierung konnten nun alle schon publizierten vegetal lokalisierten RNAs und der größte Teil der neu identifizierten RNAs ermittelt werden. Schließlich wurden in der whole mount *in situ* Hybridisierung 230 Redundanz-bereinigte unbekannte Kandidaten im Hinblick auf vegetale Lokalisation in der *Xenopus* Oozyte überprüft (Abb. 3.6). Auf diese Weise konnten so zusätzlich zu den neuen 39 RNAs aus der ersten Runde weitere 16 neue RNAs identifiziert werden, von denen 6 RNAs dem frühen und 9 RNAs dem späten Lokalisationsweg und eine dem intermediären Weg zugeordnet werden können (siehe auch Tabelle im Anhang).



**Abb.3.6 Experimentelle Strategie zur Analyse zusätzlicher Kandidatenklone.**

Nach wiederholter Datenanalyse wurden weitere 384 Kandidatenklone sequenziert und unbekannte Klone in der *in situ* Hybridisierung analysiert. Für weitere 16 neue RNAs konnte eine vegetale Lokalisation nachgewiesen werden.

Ermittelt man hier den Anteil der vegetal lokalisierten RNAs ( $n = 88+16$  neue) an der Gesamtzahl der ausgewählten Kandidaten ( $n = 384$ ) zeigt sich, daß nun ungefähr jeder vierte Kandidat tatsächlich vegetal lokalisiert war. Damit ist im Vergleich zur ersten Auswahlrunde die Zahl der „falschpositiven“ Kandidaten höher.

In Tabelle 3.3 sind alle schon publizierten und neuen RNAs aufgelistet, die in der hier beschriebenen Suche nach vegetal lokalisierten RNAs identifiziert worden sind. Betrachtet man alle identifizierten vegetal lokalisierten RNAs, so fällt deutlich auf, daß die schon bekannten vegetal lokalisierten RNAs im Vergleich zu den neuen RNAs in einer deutlich höheren Kopienzahl reisoliert wurden (Tab. 3.3). In der zweiten Runde sind zwar viele der neu identifizierten RNAs wieder isoliert worden, in Anbetracht der Tatsache, daß fast die Hälfte der neuen RNA nur einmal isoliert worden ist, stellt sich aber nun erneut die Frage,

ob in diesem Fall äußerst seltene vegetal lokalisierte RNAs identifiziert wurden, oder ob die Gesamtzahl der analysierten Klone immer noch zu gering war.

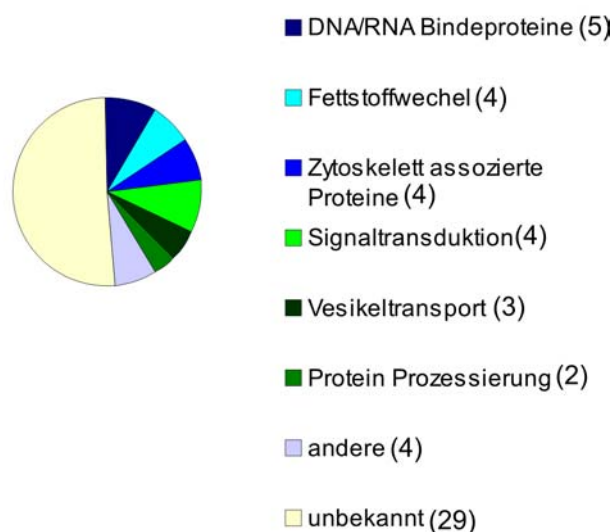
Nr.	Name	Häufigkeit	Lokalisation	Keimplasma assoziiert	Funktion	Referenz
1	Xvelo	29	spät			Claussen and Pieler, 2004
2	XPTB	20	spät	+	Phosphotyrosin bindendes Protein	Chen et al. 2002
3	XDead end/KI20	18	spät	+	RNA -Bindeprotein	
4	Xcat-2	15	früh	+	Zinkfingerprotein	Kloc et al. 2000
5	fatvg	14	intermediär		Fettstoffwechsel	Chan et al. 1999
6	Vg1	12	spät		Signaltransduktion	Rebagliati et al. 1985
7	VegT	12	spät		Transkriptionsfaktor	Zhang and King 1996
8	DEADSouth	12	früh	+	RNA Helikase	MacAthur et. al 2000
9	KI22/XGik	10	spät		Fettstoffwechsel	
10	XFACS	08	früh		Fettstoffwechsel	Chan et al. 1999
11	hermes	07	intermediär		RNA Bindeprotein	Gerber et al. 1999
12	velo12	07	spät			
13	velo8	06	spät		Fettstoffwechsel	
14	XNIF	05	früh		NI-interagierender Faktor	Claussen et al., 2004
15	velo7	05	spät		Stoffwechsellenzym	
16	velo11	05	spät		RNA/DNA Bindeprotein	
17	germes	04	früh	+	Leucin Zipper, EF-hand domain	Berekelya et al. 2003
18	velo45	04	früh	+	DNA/RNA Bindeprotein	
19	Xotx1	04	früh		Homeobox Transkriptionsfaktor	Simeone et al. 1993
20	velo5	04	spät		Vesikeltransport	
21	velo6	04	spät			
22	Xpat	03	früh	+		Hudson and Woodland 1998
23	velo76	03	spät	+	Zytoskelett assoziiertes Protein	
24	velo44	02	früh	+		
25	Xdazl	02	früh	+	RNA Bindeprotein	Housten et al. 1998
26	velo50	02	früh	+	Proteinprozessierung	
27	XPACE4/velo58	02	früh	+	Subtilisin ähnlich	Birsoy et al. 2005
28	velo73	02	früh	+	hypothetisches Protein	
29	velo39	02	intermediär		Fettstoffwechsel	
30	beta-TrCP2	02	spät		Beta-Transducin Protein	Hudson et al. 1996
31	BicaudalC	02	spät		RNA Bindeprotein	Wessely and Robertis 2000
32	velo20	02	spät			
33	velo21	02	spät	+		
34	velo31	02	spät			
35	velo80	02	spät			
36	velo18	02	spät		Zytoskelett assoziiertes Protein	
37	velo46	01	früh	+	Zytoskelett assoziiertes Protein	
38	velo47	01	früh	+		
39	velo48	01	früh			
40	velo49	01	früh	+		
41	velo51	01	früh			
42	velo52	01	früh	+		
43	velo53	01	früh			
44	velo55	01	früh			
45	velo56	01	früh	+	Vesikeltransport	
46	velo57	01	früh	+		
47	velo59	01	früh	+	Zytoskelett assoziiertes Protein	
48	velo68	01	früh	+		
49	velo70	01	früh	+		
50	velo71	01	früh	+	Protein Prozessierung	
51	velo75	01	früh		RNA/DNA Bindeprotein	
52	velo40	01	intermediär		Proteinkinase	
53	velo72	01	intermediär			
54	Xwnt11	01	spät		Signaltransduktion	Ku and Melton 1993
55	velo9/KI 23	01	spät		RNA Helikase	
56	velo13	01	spät	+	Signaltransduktion	
57	velo14	01	spät		Proteinkinase (DRAK)	
58	velo16	01	spät			
59	velo17	01	spät	+	hypothetisches Protein	
60	velo19	01	spät			
61	velo24	01	spät		Vesikeltransport	
62	velo26	01	spät			
63	velo27	01	spät			
64	velo28	01	spät			
65	velo29	01	spät		Rezeptorprotein	
66	velo69	01	spät			
67	velo74	01	spät	+		
68	velo77	01	spät			
69	velo78	01	spät		Proteinmodifizierung	
70	velo79	01	spät			
71	velo81	01	spät			
72	velo82	01	spät			
73	velo84	01	early		Hormonstoffwechsellenzym	



**Tabelle 3.3 Liste der identifizierten vegetal lokalisierten RNA Moleküle.**

Die in der Tabelle angegebenen RNAs sind absteigend nach der im „Screening“ aufgetretenen Häufigkeit sortiert. Farbig unterlegt sind die neu identifizierten vegetal lokalisierten RNAs.

Die genauere Sequenzanalyse der neuen vegetal lokalisierten Klone ergab, daß der weitaus größere Teil nur ein Fragment der cDNA mit einer durchschnittlichen Insertlänge von 1000 nt aufweist. In den meisten Fällen konnte nur ein Bereich identifiziert werden, der den 3'-untranslatierbaren Bereich der vegetal lokalisierten RNA representiert. Für einige der Klone konnte aber mit Sequenzen aus Datenbanken eine Sequenzverlängerung erzielt werden. Im Laufe der Anfertigung der vorliegenden Arbeit wurden außerdem hypothetische Vollängen cDNAs in Datenbanken veröffentlicht, zu denen die cDNA Fragmente einiger neu isolierter Klone identisch sind. Durch verschiedene Methoden der Sequenzverlängerung konnte so für einen Teil der neu identifizierten RNAs ein hypothetisches Proteinprodukt vorhergesagt werden. Nach der Durchsichtung verschiedener Datenbanken nach ähnlichen Proteinen bzw. bekannten Proteinmotiven konnten Gruppen mit unterschiedlichen Funktionszugehörigkeiten gebildet werden. So wurden durch den Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen RNAs identifiziert, die unter anderem für DNA bzw. RNA-Bindeproteine, für Zytoskelett assoziierte Proteine, für Fettstoffwechsellenzyme oder für Proteine involviert in die Signalweiterleitung kodieren. Abbildung 3.7 zeigt graphisch die anteilige Zugehörigkeit der Proteinprodukte der neu identifizierten vegetal lokalisierten mRNAs (Tab. 3.3) zu den jeweiligen Funktionsgruppen.

**Abb.3.7 Neu identifizierte vegetal lokalisierte RNAs lassen sich in Gruppen mit verschiedenen Proteinfunktionen einteilen.**

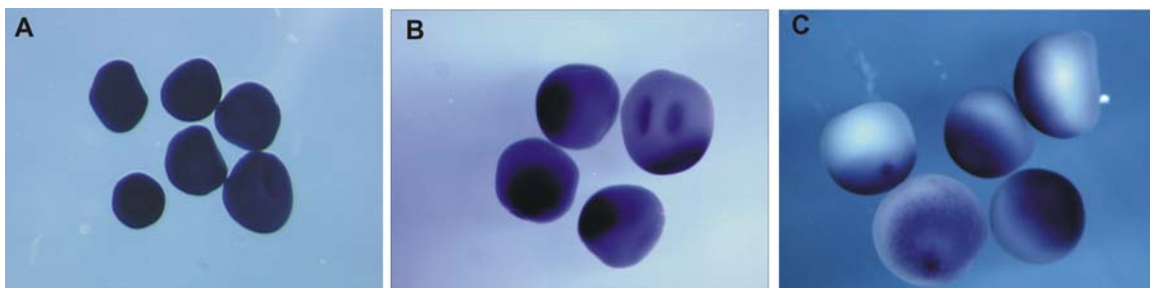
Das Schema zeigt den absoluten Anteil (die Zahlen sind jeweils in der Klammer angegeben) der neu identifizierten vegetal lokalisierten RNAs zu unterschiedlichen Funktionsgruppen.

Ein weiterer interessanter Aspekt, vor allem im Hinblick auf eine mögliche Funktion des von der vegetal lokalisierten RNA kodierten Proteins während der Embryogenese, ist die Isolation neuer vegetal lokalisierter RNAs, die eine Keimplasma-spezifische Expression während der Embryogenese zeigen. Von den neu identifizierten früh lokalisierten RNA Molekülen weisen zwei Drittel eine Keimplasma-spezifische Expression auf. Interessanterweise ist sogar ein Fünftel der neu identifizierten spät lokalisierten RNAs, z.B. XDead end, velo 13, 21, und 76, mit dem Keimplasma assoziiert (Tab.3.3). Diese RNAs sind somit die ersten über den späten Verteilungsweg lokalisierten RNA, die als Keimplasma-spezifisch charakterisiert wurden.

### 3.3 Charakterisierung neu identifizierter vegetal lokalisierter RNAs

#### 3.3.1 Die nach dem späten Verteilungsweg lokalisierte RNA Kl 22 kodiert für ein Protein mit möglicher Glycerolkinase Funktion

Die vorangehend beschriebene Suche nach vegetal lokalisierten Transkripten identifizierte die Kl 22 RNA, die nach dem Muster einer spät lokalisierten RNA während der Oogenese verteilt ist. Der Nachweis der endogenen Kl 22 RNA in der whole mount *in situ* Hybridisierung zeigt in mittleren Stadium I Oozyten eine homogene Verteilung in der gesamten Oozyte (Abb.3.8 A), während ab Stadium III der Oogenese eine deutliche Lokalisation in der gesamten vegetalen Hälfte nachzuweisen ist (Abb.3.8 B). Stadium V/VI Oozyten zeigen die charakteristische vegetal-kortikale Anreicherung vergleichbar mit anderen spät lokalisierten RNAs (Abb.3.8 C).



**Abb.3.8 Die Anreicherung der Kl 22 RNA erfolgt über den späten Lokalisationsweg.**

Die Abbildung zeigt die Lokalisation des Kl 22 Transkripts während der Oogenese, dargestellt durch whole mount *in situ* Hybridisierung mit einer antisense digoxigeninmarkierten RNA Sonde. A. Stadium I Oozyten zeigen eine gleichmäßige Verteilung der RNA in der Oozyte. B. In Stadium III Oozyten ist die Anreicherung am vegetalen Pol der Oozyte detektierbar. C. Lokalisation der RNA am vegetalen Pol in Stadium V/VI der Oogenese.

Die Sequenzierung des aus der  $\lambda$ TriplEx2 Phagenbibliothek isolierten Klons ergab, daß die cDNA eine Länge von 1014 Nukleotiden umfaßt, wobei ungefähr 200 Nukleotide als Teil einer kodierenden Region identifiziert werden konnten. In der Annahme, daß diese Sequenz nur ein Fragment der entsprechenden RNA repräsentiert, wurde die Gesamt-Oozyten Phagenbibliothek mit Hilfe nicht radioaktiver Hybridisierung nach einem der Vollängen RNA entsprechenden cDNA Klon durchsucht. Ein positiver Phage konnte identifiziert, angereichert und schließlich exzisiert werden. Die Sequenzanalyse des isolierten Phagemid Inserts zeigte, daß es eine Länge von 2577 bp hat. Wie in Abb.3.9 schematisch dargestellt, konnte ein offener Leserahmen von 1691 Nukleotiden identifiziert werden (Nukleotidposition 35-1726), der für ein 563 Aminosäuren umfassendes Protein einer theoretischen Molekülmasse von 61,6 kDa kodiert.



#### Abb.3.9 Schematische Darstellung der KI 22 cDNA

Die Vollängen cDNA des KI22 cDNA Klons, welcher aus der Gesamt-Oozyten Phagenbibliothek isoliert wurde. In der Abbildung gekennzeichnet sind die Nukleotidpositionen des Start- bzw. Stopkodons und die Bereiche der kodierenden (blau unterlegt) und der untranslatierten Region.

Die Annahme eines Startkodons an Nukleotidposition 35 der cDNA wurde aufgrund der Existenz eines Stopkodons in 5' Richtung im gleichen Leserahmen gemacht. Zunächst wurde mit dem Blast „Conserved Domain Search“ Programm (Marchler-Bauer and Bryant, 2004) nach möglichen konservierten Bereichen in der abgeleiteten Aminosäuresequenz gesucht. Diese Suche ergab die Identifikation einer für die Glycerolkinase charakteristischen Domäne, die einen Bereich von Position 11 bis 521 der abgeleiteten Aminosäuresequenz entspricht. Aufgrund dessen wurde dem KI 22 Transkript die Bezeichnung XGlk zugewiesen. Das Durchsuchen des NCBI Blastservers nach homologen Proteinen anderer Spezies resultierte in der Identifikation von hypothetischen Proteinprodukten aus dem Mensch und der Maus. Auch diese Proteine kennzeichnet eine Glycerolkinasedomäne. Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *Xenopus* Glycerolkinase mit dem humanen Homolog (Genbank Eingangsnummer CAB54859) ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Die Identität der Proteine auf Aminosäureebene beträgt 97,8 %. Glycerolkinasen sind ATP:Glycerol-3-phosphotransferasen, die eine Phosphorylierung von Glycerol zu Glycerol-3-phosphat katalysieren.

	1		60
XG1k	MAASNRVILGPI	LVGAIDQGTSSTRFLVFN	AKTAELLSHHQVEIKQKFPKEGWVEQDPKEI
hG1k	....KKAV.....V.....	S.....	E..R.....
	61		120
XG1k	LRSVYECVEKTCEKLTQLNIDITNIKAIGVSNQRETTVVWDKTTGEPLYNAIVWLDLRTQ		
hG1k	.H.....I.....G.....S.....		I.....V.....
	121		180
XG1k	STVERLLKRIPIGKNKNFFKSRTGLPLSTYFSAVKIRWLLDNVVEEIRHAVSEGRAMFGTVD		
hG1k	....S.S.....N.-..V..K.....		L.....RKVQK..E.K..L...I.
	181		240
XG1k	SWIIWSLTGAKNGGVHCTDVTNASRTMLFNIHTLEWDTELCQFFDIPMELLPKVRSSEI		
hG1k	..L.....GV.....		S....KQ..E..G....I..N.....
	241		300
XG1k	YGLMKICPSLKSALTGVPIISGCLGDQSAALVGQMCQDQAKNTYGTGCFLLCNTGSKP		
hG1k	.....SH.V.A...E.....		I.....H.C
	301		360
XG1k	VLSDHGLLTTVAYKLRDTPACYALEGSVAIAGAVRWRDLNLGIVKTTEEVEKLAAEVG		
hG1k	.F.....K.VY.....		I.....I..S..I...K...
	361		420
XG1k	TSYGCYFVPAFSGLYAPYWEPSARGIICGLTQFTNRNHIAFAALEAVCFQTREILDAMNQ		
hG1k	.....		KC.....R
	421		480
XG1k	DCGIPLNQLQVDGGMTSNKILMQLQADILCIPVVKPSMPETTALGAAMAAGAAEGVGVWS		
hG1k	.....SH.....		Y.....
	481		540
XG1k	LNPGDLTAVTCERFEPQINPEESEFRYARWKKAVLKSMDWESAEPTSNNGDCSIFCSLP		
hG1k	.E.E..S..M.....A....I..ST.....M...G.VTTQ--.PES..P.....		
	541	563	
XG1k	LGLYIVSSMVLIGAKYISGLNK		
hG1k	..FF.....M....R....IP		

**Abb.3.10 Vergleich der Aminosäuresequenzen der *Xenopus* Glycerolkinase mit einem humanen Homolog.**

Oberhalb der Sequenz sind die Aminosäurepositionen gekennzeichnet. Identische Aminosäuren sind mit einem Punkt gekennzeichnet. Fehlende Aminosäuren sind durch Querstriche dargestellt. Die für Glycerolkinasen typische Domäne ist grau unterlegt. Im Alignment mit der *Xenopus* Glycerolkinase ist die Glycerolkinase aus dem Mensch (Genbank Eingangsnummer CAB54859) dargestellt.

**3.3.2 Expression des *XG1k* (K1 22) Transkripts in Embryonalstadien und adulten Geweben**

Mit dem Ziel, die über den späten Verteilungsweg lokalisierte *XG1k* (K122) RNA näher zu analysieren, wurde zunächst die Expression der RNA in der whole mount *in situ* Hybridisierung mit einer antisense digoxigeninmarkierten RNA Sonde in verschiedenen

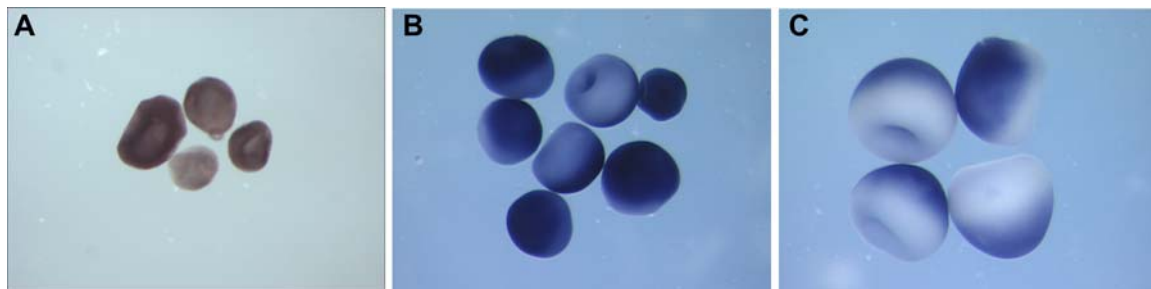


**Abb.3.11 Expression von *XGlk* in verschiedenen Embryonalstadien und adulten Geweben.**

Die endogene *XGlk* RNA wurde mit digoxigeninmarkierter antisense RNA in der whole mount *in situ* Hybridisierung detektiert. A. Zweizellstadium, Achtzellstadium; B. Gastrula; C. Neurula; D. Schwanzknospfenstadium; E. Die Analyse der *XGlk* RNA in verschiedenen Embryonalstadien und Gewebetypen erfolgte mit semiquantitativer RT-PCR. Die Beschriftungen über der DNA-Banden entsprechen den untersuchten Embryonalstadien (Nieuwkoop and Faber, 1967) bzw. den verschiedenen Gewebearten (sc, Rückenmark; mu, Skelettmuskel; li, Leber; he, Herz; in, Darm; sk, Haut; pa, Pankreas; br, Gehirn; ey, Auge; lu, Lunge; te, Testis, ov, Ovar; M, Molekulargewichtsstandard 1 kb-Leiter). Die zu erwartende Länge des *XGlk* PCR Produktes entspricht 330 bp. Zur Kontrolle der in der RT-PCR eingesetzten RNA-bzw. cDNA Menge wurde die gleichmäßig exprimierte Histon H4 RNA benutzt. Die PCR Produktlänge für das H4 Transkript beträgt 200 bp.

**3.3.3 *XDead end* (Kl 20) ist eine spät lokalisierte RNA und kodiert für ein putatives RNA Bindeprotein**

Die zuerst durch Macroarray-Hybridisierung identifizierte Kl 20 RNA zeigt nach der Analyse in der whole mount *in situ* Hybridisierung eine vegetale Anreicherung ähnlich der *Vgl* RNA (Rebagliati et al., 1985) und weist somit das charakteristische Muster des späten Lokalisationsweges auf (Abb.3.12). In Stadium I Oozyten ist die RNA gleichmäßig verteilt. Stadium III Oozyten und spätere Stadien dagegen zeigen eine deutliche Anreicherung der RNA am vegetalen Pol der Oozyten, die über die gesamte vegetale Hälfte ausgedehnt ist.

**Abb.3.12 Die *XDead end* (Kl 20) RNA wird über den späten Lokalisationsweg verteilt.**

Die subzelluläre Verteilung der *XDead end* (Kl 20) RNA wurde in der whole mount *in situ* Hybridisierung nachgewiesen. Dazu wurde eine digoxigeninmarkierte antisense RNA Sonde benutzt, die der Vollängen cDNA (Konstrukt KH10) entspricht. A. In späten Stadium I Oozyten ist die RNA homogen in den Oozyten verteilt. B. In Oozyten der Oogenesestadien III und VI ist eine deutliche Anreicherung am vegetalen Pole zu erkennen. C. Stadium V und VI Oozyten zeigen das typische Verteilungsmuster der spät lokalisierten RNAs am Kortex der gesamten vegetalen Hemisphäre.

Die Sequenzierung der isolierten cDNA für Kl 20 ergab, daß die cDNA ein ca. 800 Nukleotide langes Fragment enthält. Da in diesem Fragment kein offener Leserahmen identifiziert werden konnte, repräsentiert dieses Fragment vermutlich die 3' untranslatierte Region der RNA. Mit dem Ziel eine Vollängen cDNA dieser RNA zu isolieren, wurde die

Gesamt- Oozyten Phagenbibliothek (Claussen, Dissertation, 2001) mittels nicht radioaktiver Hybridisierung durchsucht. Nach mehrmaliger Anreicherung eines positiven Phagen wurde ein Einzelphege exzisiert, der eine cDNA enthielt, die mit dem 800 nt langen cDNA Fragment aus der  $\lambda$ TriplEx2-Phagenbibliothek vollständig überlappt. Die isolierte cDNA umfaßt eine Länge von 1904 Nukleotiden. Nach vollständiger Sequenzierung der cDNA konnte ein offener Leserahmen (Nukleotide 54 - 1118) und ein 3' untranslatierter Bereich (Nukleotide 1119 - 1904) identifiziert werden (Abb.3.13). Als mögliches Startkodon wurde das an Nukleotidposition 54 gelegende Startkodon postuliert. Jedoch konnte kein in 5'-Richtung zu dem angenommenen Startkodon liegendes Stopkodon identifiziert werden. Aufgrund von aus Datenbanksuchen erhaltenen Sequenzinformationen über *Xenopus* EST Sequenzen und homologe Proteine (siehe Abb.3.14) kann jedoch angenommen werden, daß es sich um das tatsächliche Startkodon der cDNA handelt.



### Abb.3.13 Schematische Darstellung der XDead end cDNA

Die Abbildung zeigt den aus der Gesamt-Oozyten Phagenbibliothek isolierten Vollängen-cDNA Klon (Konstrukt KH10). Angezeigt sind die Bereiche der 5'- untranslatierbaren Region, der kodierenden Region (ORF; offener Leserahmen; blau gekennzeichnet) und der 3'- untranslatierbaren Region mit den jeweilig entsprechenden Nukleotidpositionen.

Die cDNA des aus der Gesamt-Oozyten Phagenbibliothek isolierten Klons kodiert für ein Protein mit 354 Aminosäuren und einer hypothetischen Molekülmasse von 41,1 kDa. Eine Datenbanksuche des NCBI Blast Servers nach möglichen konservierten Motiven („NCBI conserved domain search“) (Marchler-Bauer et al., 2003) ergab die Identifikation eines RRM-Motivs („RNA recognition motif“), das einen Bereich von 73 Aminosäuren (Aminosäureposition 60- 133) umfaßt. Damit kann dem Protein eine hypothetische Funktion als RNA bindendes Protein zugewiesen werden. Bei der Suche nach homologen Proteinen anderer Organismen wurden zunächst nur Proteine gefunden, die aufgrund einer RNA- Bindedomäne Homologien aufwiesen. Während der Anfertigung dieser Promotionsarbeit wurde von Weidinger et al., (2003) der kodierende Bereich einer cDNA veröffentlicht (Gendatenbank Eingangsnummer AY321494), welcher mit dem kodierenden Bereich der in dieser Arbeit beschriebenen cDNA identisch ist. Lediglich in 2 Nukleotiden, jedoch nicht auf Aminosäureebene, unterscheiden sich die Sequenzen. Mit

dieser Publikation wurde das zu diesem Protein homologe aus Zebrafisch identifiziert. Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse über die Funktion des Proteins im Zebrafisch wurde es „Dead end“ benannt. Außerdem wurden mit dieser Arbeit auch Homologe aus Maus (AY321066) und Mensch (AY321065) veröffentlicht. In einem nach der ClustalW-Methode durchgeführten Sequenzvergleich (Corpet, 1988) wurde das *Xenopus* Dead end Protein mit Homologen aus Mensch und Zebrafisch verglichen (Abb.3.14). Folgende Sequenzidentitäten zu den homologen Proteinen konnten ermittelt werden: humanes Dead end (AAQ63635), 43 %; Zebrafisch Dead end (AAP22373), 26,8 %.

```

1                                     60
XDead end MELSDEQKSQMWINSVNSENKEALLAWVKETGIELVQINGQRKYGGPPPGWIGNAPVSGS
hDead end  MQSKRDCEL.CER..P...A..E...R...R...V.....V.SP.PA..
zDead end  .VGDMDAQQ.ELQQIL.PQKLS.QE.MQRNS.T.T.V.....Q.P..G..C

61                                     120
XDead end  EVFIGKIPQDIYEDKLIPLFQSVGKLYEFRLLMMTFSGLNRFAYARYISRRQAISSAIMSL
hDead end  .....RL...V..HQ.....R..R.....S...G.QA..AT.
zDead end  ....SQ..N.V...R.....I.TI.....N...QT.....K.GDPLT.SA.VTT.

121                                    180
XDead end  NGFEITKGCCIVVCRSTEKSELALDGLPGNFDENMLKNVLDEVTSGVSSISLHPSPTKES
hDead end  HNHPLRPS.PLL.....C..SV...P.LTRSA.LLA.QPLGP.LQEAR.L...GPAP
zDead end  HQYRLPE.G.LT.R....RQ.R.GD..VSMN.SK.LM..QMLSD..EDVL.K.PGP.GK

181                                    240
XDead end  QVLAVVKYDSHRAAAMAKKTLCEGSPILPGLPLTVNWLKTDMRQKLRST---DKLQQTkd
hDead end  QQI.LL.FS.....A.V..QSH.C.EQVA.E...P.LK.R..Q-----Q.VGPFLL
zDead end  E.V.L.N.T..Y..S....V.V.AFRNRY.ISI..R.TSFSKSKRVED.PQE.SCVTPLV

241                                    300
XDead end  LSPLPLLYTDRPDLP-----ETLLSAVGCLNMLCQEMKLGPRVFLIKLFSVTSFGWIRFW
hDead end  R..Q.EGSQLALARDK----LGFQG.RAT.QL...R...S...T.CLGIGPA..H...
zDead end  .K..SKPSLLHY.V.AHQSLLP.FR...GPTTSE.RDEMIPQPTIMSRNELIPQSS..QR

301                                    360
XDead end  YQVVIPTYPTPCGYAWMIGENLELNEKYEHARQVVAMKILSALGYIPDFSLGDVTARNA
hDead end  .....GH.V..S.LI.VV-LT.DGRDGH.V.KDA.SVRL.Q..SESGANL.WSAG.EAG
zDead end  DEM.PQLPIR.RD.M.PQSPIS.DAVSHLQWMCE.NRLGSPQYEVHFHHAAPDGFYFAF

361                                    411
XDead end  L
hDead end  TMVKQ
zDead end  KVLIPGLPLPLYGFVQILPGTSARAMKSEVRAAAEQVIQTLCRVSNLRPF

```

**Abb.3.14 XDead end Aminosäuresequenzvergleich mit homologen Proteinen anderer Organismen.**

Dargestellt ist der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des *Xenopus* Dead end Proteins und der homologen Proteine anderer Spezies. Identische Aminosäuren sind mit Punkten gekennzeichnet. Fehlende Aminosäuren sind als Querstriche dargestellt. Oberhalb der Sequenz sind die Aminosäuresequenzpositionen angegeben. Vergleichend dargestellt sind die homologen Proteine aus dem Menschen (hDead end; AAQ63635) und Zebrafisch (zDead end; AAP22373). Die RNA Bindedomäne ist grau unterlegt.

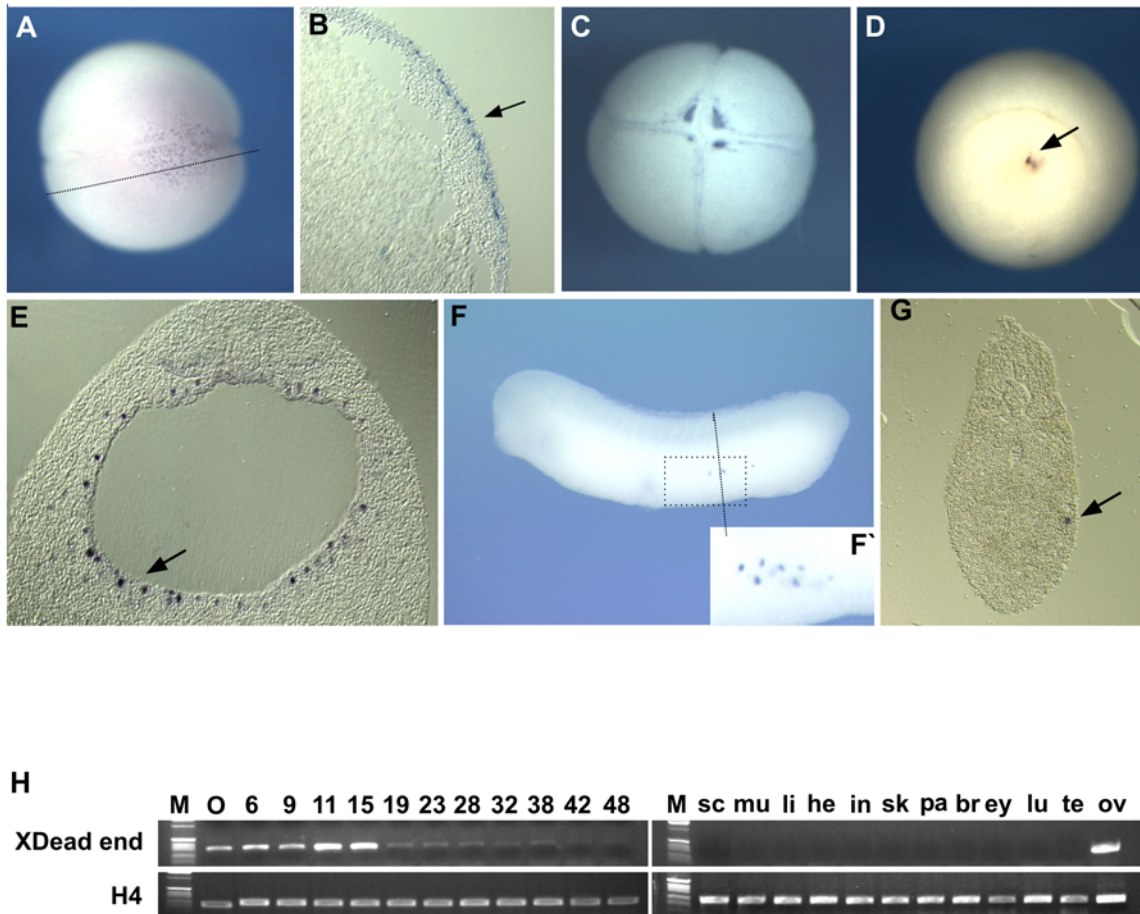


### 3.3.4 Expressionsanalyse von *XDead end* in verschiedenen Embryonalstadien und adulten Geweben

Um die spät lokalisierte *XDead end* (Kl 20) RNA genauer zu untersuchen, wurde das Expressionsmuster der RNA in verschiedenen Embryonalstadien mit Hilfe der whole mount *in situ* Hybridisierung analysiert. Außerdem wurden RT-PCR Analysen verschiedener Embryonalstadien und Gewebe von adulten Tieren durchgeführt.

Nach der ersten Zellteilung des Embryos ist die *XDead end* RNA zunächst punktförmig in granulären Strukturen am vegetalen Pol der Blastomere verteilt (Abb.3.15 A, B). Im 8 Zellstadium sind vier inselförmige Anreicherungen an der Teilungszone der vegetalen Blastomere zu erkennen (Abb.3.15 C). Dieses Expressionsmuster ist typisch für RNAs, die mit dem Keimplasma assoziiert sind und wurde schon für eine Reihe von früh lokalisierten Transkripten beschrieben (Chan and Etkin, 2001; Houston et al., 1998; Kloc et al., 2000; MacArthur et al., 2000; Zhou and King, 1996a). Im Gastrulationsstadium ist die *XDead end* RNA in Zellen exprimiert, die im posterioren Endoderm lokalisiert sind (Abb.3.15 D). Auch dieses Expressionmuster ist für Keimplasma spezifische RNAs beschrieben worden (Hudson and Woodland, 1998; Kloc et al., 2001). Die *XDead end* RNA scheint zusammen mit den Keimplasma- assoziierten Strukturen durch die Bewegung des Endoderms in den Embryo einzuwandern, denn in Neurulationsstadien ist oberflächlich keine *XDead end* RNA Expression zu detektieren. Dorso-ventrale Schnitte vom Neurulastadium zeigen dafür eine *XDead end* RNA Expression im Endoderm im Bereich des Archenterons (Abb.3.15 E). Im Schwanzknospenstadium ist die für Keimzellen- assoziierte RNAs typische Expression in den wandernden primordialen Keimzellen relativ schwach auch für die *XDead end* RNA zu erkennen (Abb.3.15 F, F', G).

Die Untersuchung der Expression in verschiedenen Embryonalstadien mit RT-PCR Analyse ergab, daß bis zum Stadium 15 der Embryogenese das Expressionsniveau relativ konstant bleibt und danach jedoch stark abfällt. Ab Stadium 48 der Embryogenese ist nahezu keine Expression mehr zu detektieren (Abb.3.15 H). Die Analyse verschiedener Gewebe in der RT-PCR zeigt, daß im adulten Tier die *XDead end* RNA ausschließlich im Ovar exprimiert ist.



**Abb.3.15 Expressionsanalyse der *XDead end* RNA in verschiedenen Embryonalstadien und Geweben.**

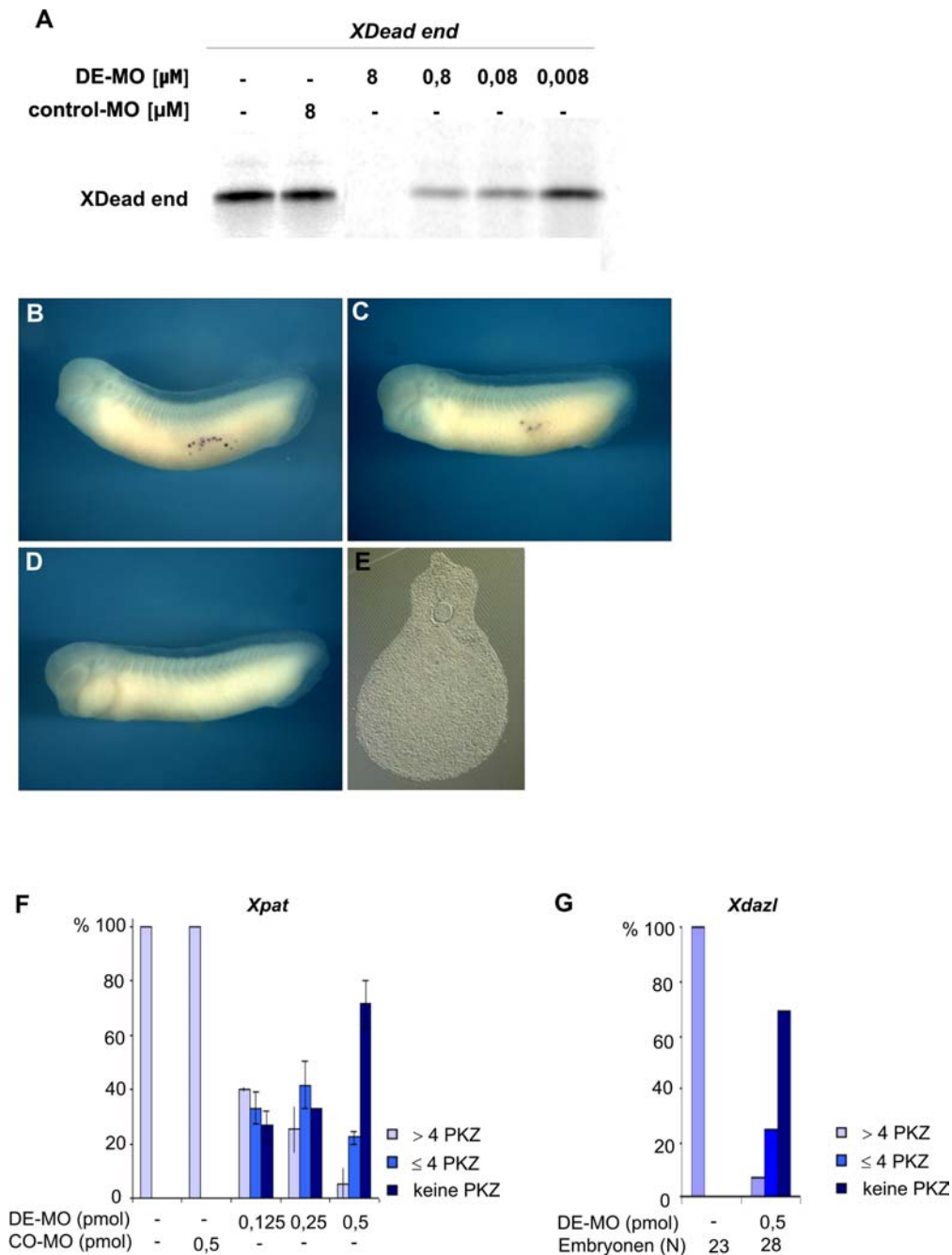
Die endogene RNA wurde mit digoxigeninmarkierter antisense RNA in der whole mount *in situ* Hybridisierung detektiert. A. Zweizellstadium; B. Vibratonschnitt eines 2-Zell Stadium Embryos entlang der Teilungszone. *XDead end* exprimierende Zellen sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. C. Achtzellstadium; D Stadium 10; E. Dorsoventraler Vibratonschnitt eines Stadium 15 Embryos; *XDead end* exprimierende Zellen sind mit einem Pfeil markiert. F. Stadium 30; Primordiale Keimzellen sind mit einem Pfeil gekennzeichnet und in F' vergrößert dargestellt; G. Vibratonschnitt durch einen Stadium 30 Embryo entlang der dorsoventralen Achse. Die primordiales Keimzellen sind mit einem Pfeil markiert.

H. Die Analyse der *XDead end* RNA in verschiedenen Embryonalstadien und Gewebetypen erfolgte mit semiquantitativer RT-PCR. Die Beschriftungen über der DNA-Banden entsprechen den untersuchten Embryonalstadien (Nieuwkoop and Faber, 1967) bzw. den verschiedenen Gewebearten (sc, Rückenmark; mu, Skelettmuskel; li, Leber; he, Herz; in, Darm; sk, Haut; pa, Pankreas; br, Gehirn; ey, Auge; lu, Lunge; te, Testis, ov, Ovar; M, Molekulargewichtsstandard 1 kb-Leiter). Die zu erwartende Länge des *XDead end* PCR Produktes entspricht 300 bp. Zur Kontrolle der in der RT-PCR eingesetzten RNA-bzw. cDNA Menge wurde die gleichmäßig exprimierte Histon H4 RNA benutzt. Die PCR Produktlänge für das H4 Transkript beträgt 200 bp.

### 3.3.5 Das *Xenopus* Dead end Protein hat eine Funktion bei der Entwicklung der primordialen Keimzellen

Ähnlich wie in vielen anderen Organismen werden in *Xenopus* Keimzell- assoziierte RNAs wie *Xpat*, *Xdazl* und *Xcat2* während der Oogenese im sogenannten Keimplasma am vegetalen Pol angereichert. Aus diesem mit spezifischen Faktoren angereicherten Bereich entstehen während der ersten Teilungsstadien des Embryos die primordialen Keimzellen, die zunächst in Gastrula- und Neurulastadien im Endoderm nachzuweisen sind und später durch das laterale Endoderm bis in die Gonadenleisten migrieren (Kloc et al., 2001).

Mit dem Ziel eine mögliche Funktion des XDead end Proteins in der primodiale Keimzellwanderung bzw.-spezifikation zu untersuchen, wurde zunächst von der Firma Genetools ein antisense Morpholino Oligonukleotid hergestellt, das komplementär zu dem das Startkodon der XDead end cDNA umfassenden Bereich ist. Zunächst wurde im Retikulozytenlysat überprüft, ob durch Zugabe des XDead end Morpholino Oligonukleotids in den *in vitro* Transkription/Translationansatz die Translation des XDead end Proteins unterdrückt wird. Die Zugabe verschiedener Mengen XDead end Morpholino Oligonukleotids, jedoch nicht die Zugabe eines Kontrollmorpholino Oligonukleotids, zeigt deutlich die konzentrationsabhängige Abnahme der XDead end Proteintranslation im Retikulozytenlysat (Abb.3.16 A). Sowohl das XDead end Morpholino Oligonukleotid (DE-MO), als auch das Kontrollmorpholino Oligonukleotid (KO-MO) wurde vegetal in beide Blastomere des Zweizellstadiums injiziert, um den Effekt eines XDead end Protein Funktionsverlustes zu testen. Nach dem Wachstum der Embryonen bis zum Schwanzknospenstadium wurden die primordialen Keimzellen in der whole mount *in situ* Hybridisierung mit einer antisense *Xpat* RNA-Sonde detektiert. Schon nach Injektion von 0,125 pmol DE-MO konnten bei einem großen Teil der injizierten Embryonen weniger bzw. keine primordialen Keimzellen mehr detektiert werden (Abb.3.16 B, C, D, F). Dieser Effekt stellte sich als konzentrationsabhängig dar. Mit einer ansteigenden Menge an injiziertem DE-MO wurde auch die Zahl der Embryonen mit geringerer Anzahl bzw. keinen detektierbaren *Xpat* exprimierenden Zellen höher. Nach Injektion von 0,5 pmol DE-MO konnten bei mehr als der Hälfte der analysierten Embryonen keine *Xpat* positiven Keimzellen mehr nachgewiesen werden (Abb.3.16 F).



**Abb.3.16 XDead end Morpholino Oligonukleotid Injektion.**

In beide Blastomere des Zweizellstadiums wurde vegetal die in der Grafik angegebene Menge an Morpholino Oligonukleotid injiziert. Die Embryonen wurden bis zum Schwanzknospfenstadium heranwachsen gelassen. Die primordialen Keimzellen wurden anschließend in der whole mount *in situ* Hybridisierung mit einer *Xpat* antisense RNA-Sonde detektiert. A. Überprüfung der XDead end *in vitro* Transkription/Translation im Retikulozytenlysat nach Zugabe von Kontrollmorpholino Oligonukleotid (CO-MO) bzw. verschiedenen Mengen XDead end Morpholino Oligonukleotids. B. Nachweis der *Xpat* exprimierenden primordialen Keimzellen nach Kontrollmorpholino Oligonukleotid (CO-MO)-Injektion. C. Embryo mit verminderter Anzahl an *Xpat* exprimierenden primordialen Keimzellen nach XDead end Morpholino Oligonukleotid (DE-MO)-Injektion. D. Embryo ohne detektierbare primordiale Keimzellen nach DE-MO-Injektion. E. Dorso-ventraler Schnitt von einem Embryo ohne detektierbare primordiale Keimzellen nach DE-MO-Injektion. F. Grafische Darstellung der Ergebnisse der *Xpat* Expression nach DE-MO und Kontrollmorpholino Oligonukleotid (CO-MO) Injektion. Die Abzisse gibt die Menge an injiziertem antisense MO und die Zahl der analysierten Embryonen an. Die Ordinate zeigt die prozentualen Anteile der Embryonen mit mehr als 4 (hellblau), weniger bzw. mindestens 4 (mittelblau) oder keinen

detektierbaren Keimzellen (dunkelblau). G. Grafische Darstellung der Ergebnisse der *Xdazl* Expression nach DE-MO- Injektion. Die Abzisse gibt die Menge an injiziertem antisense MO und die Zahl der analysierten Embryonen an. Die Ordinate zeigt die prozentualen Anteile der Embryonen mit mehr als 4 (hellblau), weniger, bzw. mindestens 4 (mittelblau), oder keinen detektierbaren Keimzellen (dunkelblau).

Als Phänotyp nach der XDead end Morpholino Oligonukleotid Injektion konnte die Reduktion von *Xpat* positiven primordialen Keimzellen in Stadium 31/32 Embryonen beobachtet werden (Abb.3.16 B, C, D, E). Im Gegensatz dazu konnte im Gastrulastadium (St. 11) und Neurulastadium (St. 17) kein Unterschied zwischen DE-MO injizierten Embryonen und Kontrollembryonen festgestellt werden (Abb.3.17 A, B, B', C und C').

Die Analyse von DE-MO injizierten Stadium 24 und 27 Embryonen in der whole mount *in situ* Hybridisierung und einer sich anschließenden Klärung der Embryonen mit „Murray`s“-Lösung zeigte, daß zwar beim größten Teil der Embryonen die Anzahl der *Xpat* exprimierenden primordialen Keimzellen vergleichbar mit den Kontrollembryonen ist, jedoch eine auffällige Aggregation der primordialen Keimzellen zu beobachten ist (Abb.3.17 A, D, D', E und E').

---

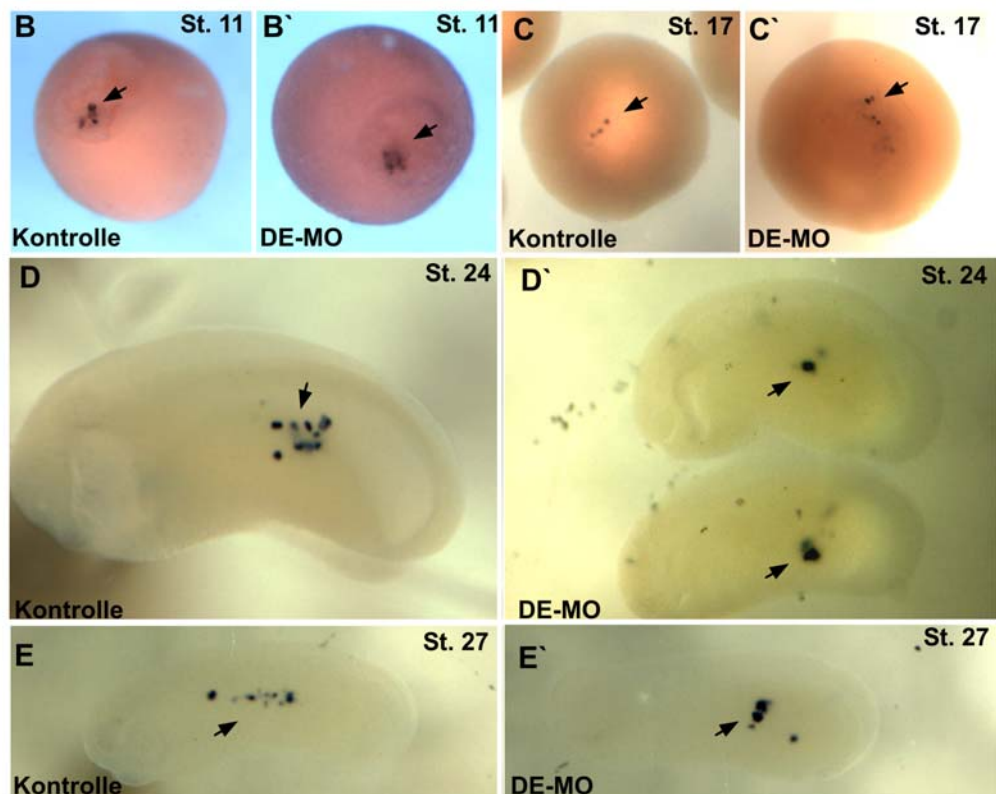
**Abb.3.17 *Xpat* Expression in XDead end Morpholino Oligonukleotid injizierten Embryos.**

Kontrollembryonen und DE-MO injizierte Embryonen wurden nach verschiedenen Stadien auf eine *Xpat* Expression hin untersucht. Um die Anzahl und Verteilung der primordialen Keimzellen zu analysieren, wurden die Embryonen gegebenenfalls in „Murray`s“-Lösung geklärt.

(A). Die Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der DE-MO Injektion Ergebnisse. Die *Xpat* Expression wurde beim in der Tabelle angegebenen Embryonalstadium analysiert. (B, B') Kontrollembryonen und DE-MO injizierte Embryonen (Stadium 11) zeigen eine normale *Xpat* Expression in den primordialen Keimzellen des posterioren Endoderms. (C, C') Kontrollembryonen und DE-MO injizierte Embryonen, die im Stadium 17 analysiert wurden, zeigen eine vergleichbare Anzahl und räumliche Verteilung der primordialen Keimzellen. (D, E) Stadium 24 bzw. 27 Kontrollembryo mit einer typischen Anzahl und Lokalisation der primordialen Keimzellen. (D', E') DE-MO injizierte Embryonen zeigen im Vergleich dazu eine Aggregation der *Xpat* exprimierenden primordialen Keimzellen.

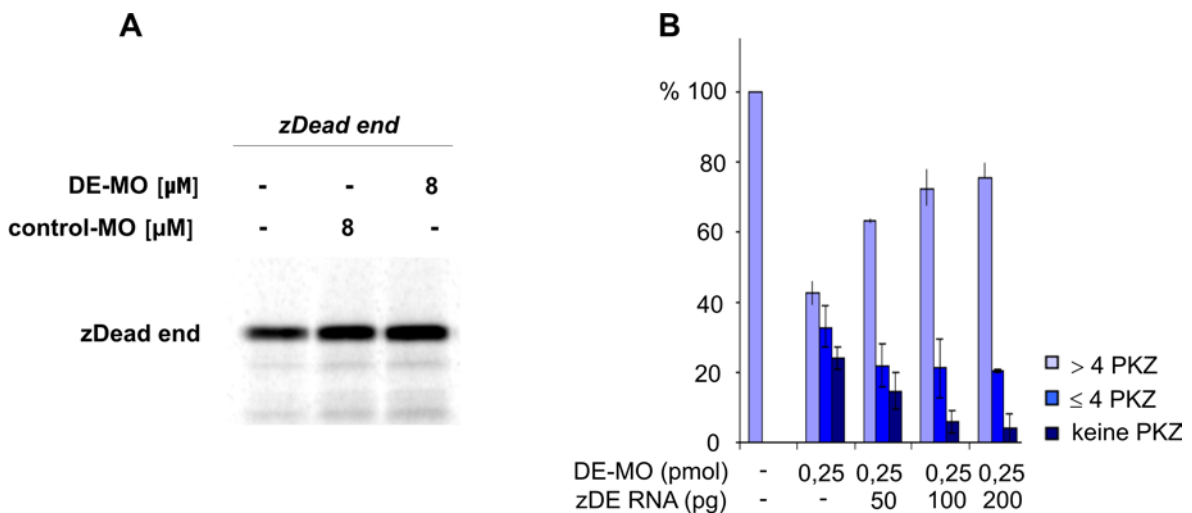
## A

	<i>Xpat</i> positive Zellen	Stadium 11	Stadium 17	Stadium 24	Stadium 27	Stadium 31
Kontrolle	> 4 PKZ	15/15	10/10	11/11	10/10	24/24
	≤ 4 PKZ	0/15	0/10	0/11	0/10	0/24
	keine	0/15	0/10	0/11	0/10	0/24
DE-MO injiziert (0,5 pmol)	> 4 PKZ	13/13	15/15	8/10	7/10	2/28
	≤ 4 PKZ	0/13	0/15	0/10	0/10	7/28
	keine	0/13	0/15	2/10	3/10	19/28



Um festzustellen, ob der Phänotyp nach Morpholino Oligonukleotid Injektion tatsächlich durch die Inhibition der Translation des endogenen Proteins hervorgerufen wird, kann zusammen mit dem Morpholino Oligonukleotid RNA ko-injiziert werden, an die jedoch nicht das jeweilige Morpholino Oligonukleotid bindet. Mit der Annahme, daß das Zebrafisch Dead end Protein die Funktion des endogenen *Xenopus* Dead end Proteins übernehmen könnte, wurde das XDead end Morpholino Oligonukleotid zusammen mit der Zebrafisch *Dead end* RNA ko-injiziert. Die Injektion der Zebrafisch *Dead end* RNA, die vom *Xenopus*  $\beta$ -globin 5'-und 3'UTR flankiert ist, könnte somit den durch den XDead end Proteinfunktionsverlust erzielten Effekt umkehren. Mit Hilfe des gekoppelten *in vitro* Transkription/Translationssystem im Retikulozytenlysat zeigte sich, daß die Zugabe des XDead end spezifischen Morpholino Oligonukleotids tatsächlich keinen Einfluß auf die Translation des Zebrafisch Dead end Proteins hat (Abb.3.18 A). Nach der Ko-Injektion des

DE-MO und der Zebrafisch *Dead end* RNA, ist ein Zebrafisch *Dead end* RNA konzentrationsabhängiger Anstieg an detektierbaren *Xpat* positiven Keimzellen zu beobachten (Abb.3.18 B). Eine hundertprozentige Umkehrung des durch die DE-MO Injektion resultierenden Effektes, ist aber nicht zu erkennen. Jedoch deuten die Ergebnisse der XDead end Morpholino Oligonukleotid Injektion und der Zebrafisch *Dead end* RNA Ko-Injektion auf eine wichtige konservierte Funktion des XDead end Proteins in der Entwicklung der primordialen Keimzellen hin.



**Abb.3.18 XDead end –Morpholino Oligonukleotid / *zDead end* RNA Ko-Injektion.**

In beide Blastomere des Zweizellstadiums wurde vegetal die in der Grafik angegebene Menge an Morpholinooligonukleotid und Zebrafisch *Dead end* RNA injiziert. Die Embryonen wurden bis zum Schwanzknospenstadium heranwachsen gelassen. Die primordialen Keimzellen wurden anschließend in der whole mount *in situ* Hybridisierung mit einer *Xpat* antisense RNA-Sonde detektiert. A. Kontrolle des DE-MO Effektes auf die Zebrafisch *Dead end* Proteintranslation im Retikulozytenlysat. B. Grafische Darstellung der Ergebnisse nach DE-MO/ Zebrafisch *Dead end* RNA- Injektion. Die Abzisse gibt die Menge an injiziertem antisense MO bzw. Zebrafisch *Dead end* RNA und die Zahl der analysierten Embryonen an. Die Ordinate zeigt die prozentualen Anteile der Embryonen mit mehr als 4 (hellblau), weniger bzw. mindestens 4 (mittelblau) oder keinen detektierbaren Keimzellen (dunkelblau).

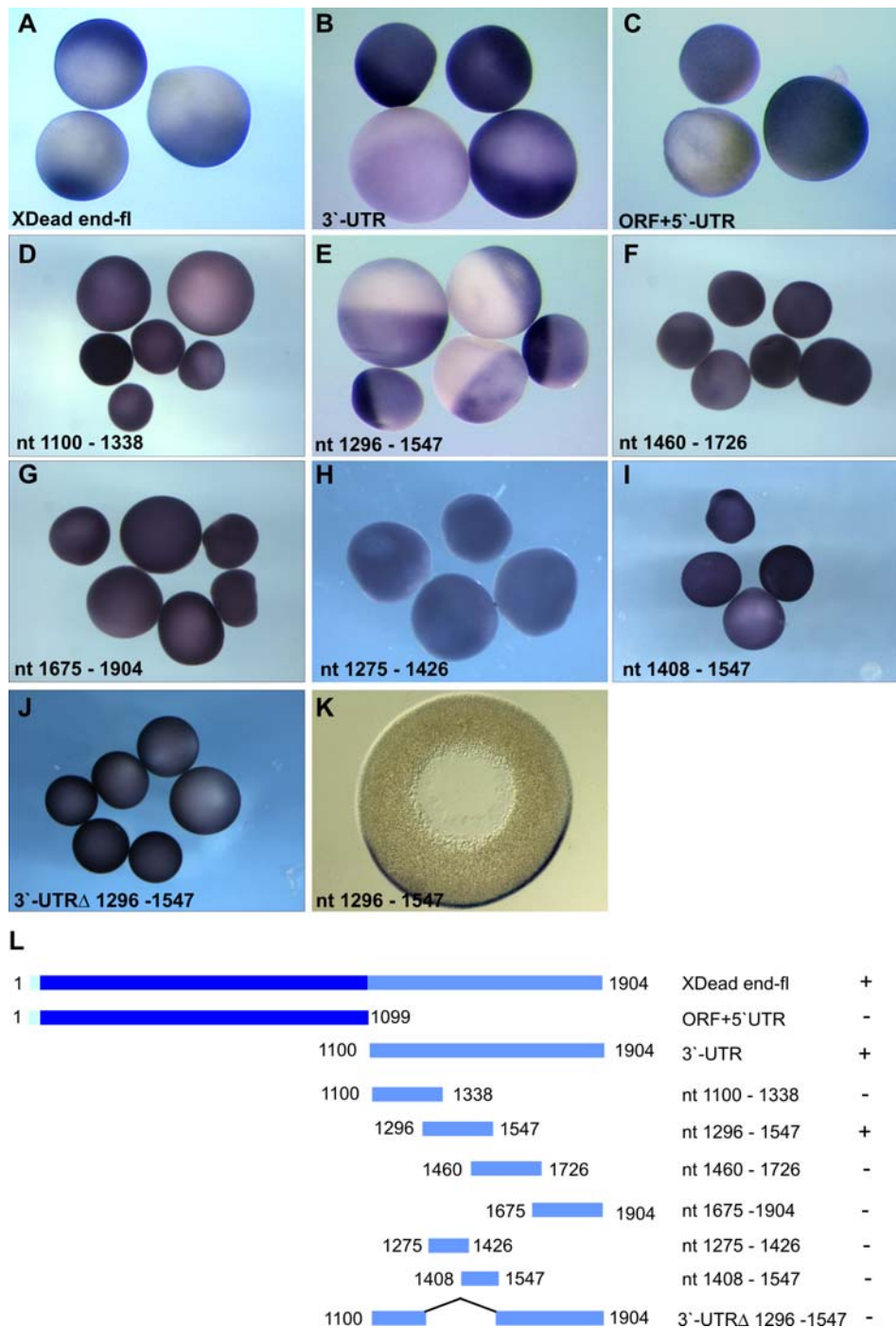
### 3.4 Ein 251 Nukleotide umfassendes Fragment des 3'-UTRs der *XDead end* RNA vermittelt eine Anreicherung am vegetalen Kortex

In der Vergangenheit konnten für viele lokalisierte RNAs unterschiedlicher Spezies Sequenzen identifiziert werden, die für die Lokalisation der RNA essentiell sind und somit als Lokalisationssignal agieren. Mit dem Ziel, die für die *XDead end* RNA verantwortliche Sequenz zu identifizieren, wurde ein Mikroinjektionsassay benutzt. Dazu wurden in der *in vitro* Transkription *lacZ*- fusionierte RNAs, versehen mit einem Cap-Analog, hergestellt und anschließend in den Kern von Stadium III und IV *Xenopus* Oozyten injiziert. Danach

folgte eine *in vitro* Kultur der injizierten Oozyten für zwei bis drei Tage in speziellem Kulturmedium bestehend aus L15-Medium, verschiedenen Antibiotika und angereichert mit Frosch-Vitellogenin. Die Detektion der injizierten RNA erfolgte schließlich in der whole mount *in situ* Hybridisierung mit einer lacZ antisense RNA Sonde.

Zur Eingrenzung des RNA- Lokalisationselementes der spät lokalisierten RNA *XDead end* wurden zunächst *in vitro* synthetisierte lacZ Reporter fusionierte RNAs, die der Vollängen cDNA, dem offenen Leserahmen inklusive 5'-untranslatiertem Bereich und dem 3'-untranslatiertem Bereich entsprechen, in den Kern von Oozyten injiziert. Nach der *in situ* Hybridisierung zeigte sich, daß die injizierte Vollängen RNA und auch die 3'- UTR RNA am vegetalen Pol angereichert ist (Abb.3.19 A und B). Dagegen wird die injizierte RNA, die der kodierenden Sequenz inklusive 5'-UTR entspricht, nicht am vegetalen Pol angereichert, sondern verteilt sich scheinbar gleichmäßig in der Oozyte nach der Mikroinjektion (Abb. 3.19 C). Daraus läßt sich folgern, daß sich ein Lokalisationselement im 3'- untranslatierten Bereich befindet. Um den Bereich eines Lokalisationselementes weiter einzugrenzen, wurden vier überlappende Fragmente des 3' untranslatierten Bereichs subkloniert. Die lacZ-fusionierten RNAs, die den vier Fragmenten der 3'-UTR Region entsprechen, wurden in Oozyten injiziert, um diese auf eine mögliche Lokalisation hin zu überprüfen. Nach der Detektion der injizierten RNA zeigte sich, daß eines der Fragmente tatsächlich am vegetalen Pol lokalisiert (Abb.3.19 E, K). Dieses Fragment umfaßt die Nukleotide 1296 – 1547 der cDNA Sequenz (siehe auch Abb.3.19 L). Alle anderen drei Fragmente zeigten nach der *in situ* Hybridisierung eine homogene Verteilung in der Oozyte (Abb.3.19 D, F, G). Weiterhin wurde versucht, die ein Lokalisationsignal enthaltende Sequenz (Nukleotide 1296 – 1547) noch weiter einzuschränken, in dem zwei ca. 110 Nukleotide umfassende und sich überlappende Fragmente subkloniert und die dazugehörigen *in vitro* transkribierten RNAs auf ihre Verteilung in der Oozyte untersucht wurden. Hierbei zeigte sich, daß beide Fragmente nicht subzellulär angereichert, sondern gleichmäßig verteilt wurden (Abb.3.19 H, I). Vermutlich konnte durch die Teilung des lokalisierten Fragmentes kein funktionelles Lokalisationssignal erhalten werden. Außerdem führte auch die interne Deletion des 3'UTRs innerhalb der Nukleotide 1296 bis 1547 zu einem Verlust der vegetalen Lokalisation nach Mikroinjektion des entsprechenden RNA Fragmentes (Abb.3.19 J, L). Diese Beobachtung spricht dafür, daß der die Nukleotide 1296 bis 1547 umfassende Bereich nicht nur ausreichend, sondern auch nötig ist, und somit dieses 251 bp Fragment als Lokalisationssignal agiert.





**Abb.3.19 Der 3'-UTR der XDead end RNA enthält ein 251 bp umfassendes Lokalisationssignal.**

Der Volllänge cDNA bzw. Fragmenten entsprechende, an den *lacZ* Reporter fusionierte *in vitro* transkribierte RNAs wurden in Stadium III und IV Oozyten injiziert. Nach drei Tagen Inkubation wurde mit einer digoxigeninmarkierten *lacZ* antisense Sonde in der *in situ* Hybridisierung die Verteilung der injizierte RNA untersucht. In den Abbildungen (A – J) sind die Nummern der injizierten Konstrukte enthalten. Abbildung J zeigt einen Vibratomschnitt entlang der animal/vegetalen Achse. In der schematischen Darstellung (L) der injizierten Konstrukte sind außerdem die entsprechenden Nukleotidpositionen der subklonierten Fragmente angegeben. Der 5'- UTR Bereich ist hellblau, der kodierende Bereich dunkelblau und der 3'- UTR mittelblau gekennzeichnet. Zusätzlich ist die Fähigkeit zur vegetalen Lokalisation der Fragmente mit + oder – angegeben.

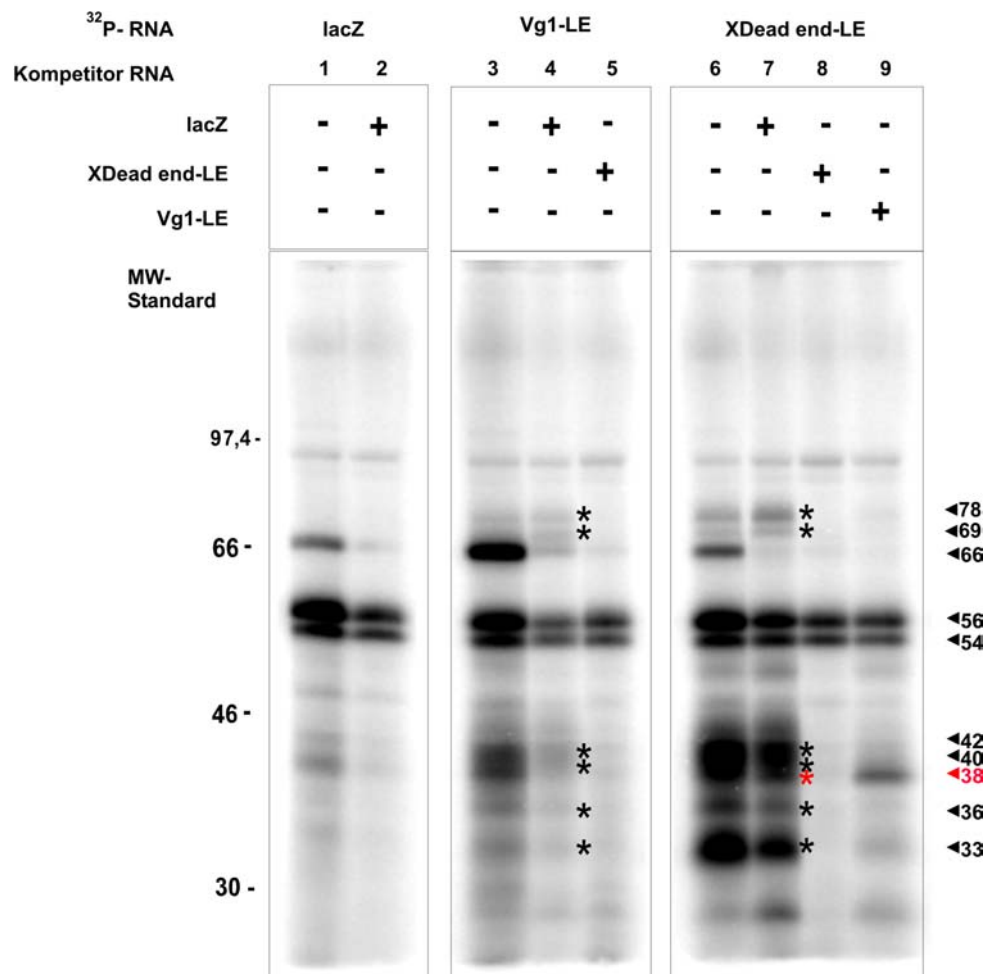
### 3.5 Untersuchung der Proteinbindung des XDead end RNA-Lokalisations-elementes

#### 3.5.1 Das XDead end Lokalisations-element zeigt ein zum Vg1 Lokalisations-element ähnliches Proteinbindungsmuster

Nachdem in Mikroinjektionsexperimenten ein Fragment eingegrenzt werden konnte, das für die Lokalisation am vegetalen Kortex nötig ist, sollte in folgenden Experimenten die Proteinbindung des RNA Fragmentes *in vitro* untersucht werden. Die Methode der UV-Quervernetzung ermöglicht es spezifische RNA-Proteinbindungen nachzuweisen. Dafür wurden S100 Extrakte aus Stadien I bis VI *Xenopus* Oozyten gewonnen, die mit den entsprechenden radioaktiv markierten RNAs zunächst inkubiert wurden. Dann wurde der Bindungsansatz mit UV-Licht bestrahlt, um die an aromatische Aminosäuren bindenden Uridine quervernetzten. Anschließend wurde der Ansatz mit RNasen behandelt, um die nicht quervernetzte und ungebundene RNA zu entfernen. Auf einem SDS-Gel wurden schließlich die Proteine aufgetrennt, um die spezifisch an die RNA bindenden und durch die Quervernetzung mit einem radioaktiv markierten Nukleotid detektierbaren Proteine zu analysieren. In dem durchgeführten UV-Quervernetzungsversuch wurden dieselben *lacZ*-Reporterfusionskonstrukte benutzt, die in den Mikroinjektionsexperimenten untersucht worden sind. Als Kontrolle und zur Identifizierung von Proteinen, die unspezifisch an RNA binden, wurde die *lacZ*-RNA auch alleine analysiert (Abb.3.20 Spur 1 und 2). Die zwei stark präsenten Banden einer geschätzten Molekülmasse von 54 und 56 kDa repräsentieren wahrscheinlich die unspezifisch RNA bindenden und in den Oozyten stark abundanten FRGY-Proteine (Bouvet et al., 1995; Bouvet and Wolffe, 1994; Duh et al., 1995; Ladomery and Sommerville, 1994; Matsumoto et al., 1996; Otero et al., 2001; Ranjan et al., 1993; Standart and Jackson, 1994; Tafuri and Wolffe, 1993).

Außerdem lassen sich weitere Proteine mit einer geschätzten Molekülmasse von 97 und 66 kDa detektieren, die vermutlich auch Proteine mit sequenzspezifischer RNA Binefähigkeit sind. Der vierfache Überschuß an unmarkierter *lacZ*-RNA im RNA-Proteinbindungsansatz bewirkt keine vollständige Konkurrenz. Um das Proteinbindungsmuster der spät lokalisierten RNA *XDead end* zu charakterisieren, wurde außerdem die spät lokalisierte *Vg1* RNA zum Vergleich im UV-Quervernetzungsversuch herangezogen. Beide RNAs zeigen zusätzlich zu den sequenzspezifisch bindenden Proteinen, die vorangehend beschrieben wurden, spezifische Proteinbindung (Abb.3.20 Spur 4-8). In beiden Quervernetzungsansätzen konnten Proteine mit einer ungefähren Molekülmasse von 78 und 69 kDa detektiert werden, die als typisches Doppelbande

erscheinen. Weiterhin sind Proteinbanden einer relativen Größe von 42, 40, 36 und 33 kDa zu erkennen. Diese Proteine scheinen sequenzspezifisch zu binden, da im Ansatz eine im Überschuß zugegebene nichtmarkierte Vg1 LE bzw. XDead end-LE RNA die Bindung kompetiert. Jedoch zeigt der Überschuß an unmarkierter lacZ-RNA keine Wirkung. Der direkte Vergleich beider Bandenmuster nach der UV-Quervernetzung zeigt, daß beide spät lokalisierte RNAs ein qualitativ ähnliches Proteinbindungsmuster zeigen (Abb.3.20 vergleiche Spur 4 und 7).



**Abb.3.20 Das XDead end Lokalisationselement interagiert spezifisch mit Proteinen im UV-Quervernetzungsversuch.**

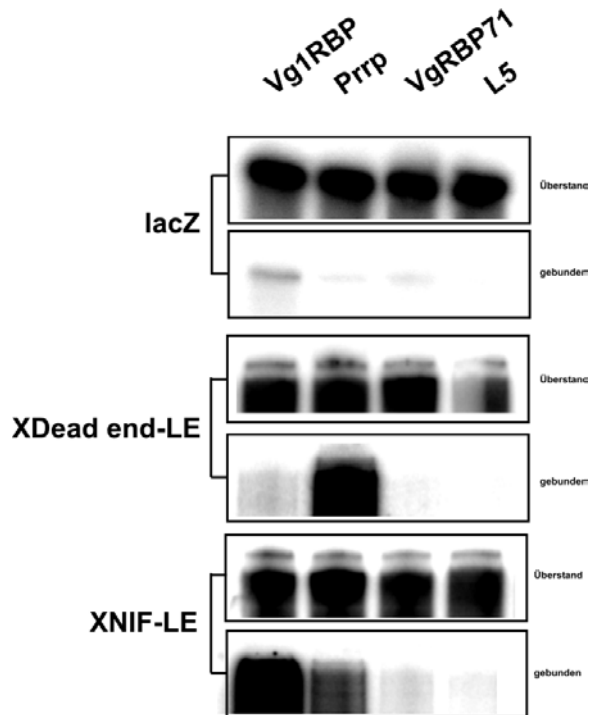
LacZ RNA (MC161; Spur 1 und 2), Vg1-LE RNA (MC 191, Spur 3, 4 und 5) und XDead end-LE+lacZ RNA (KH14, Spur 6, 7, 8 und 9) wurden in der *in vitro* Transkriptionsreaktion mit <sup>32</sup>P-rUTP markiert und nach Inkubation mit *Xenopus* S100 Extrakten UV-quervernetzt. Zur Kompetition wurde jeweils ein vierfacher Überschuß nicht radioaktiv markierter RNA eingesetzt. Nach anschließender RNase Behandlung wurden die Ansätze auf einem 10% igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion des Proteinbindungsmusters erfolgte durch einen Phosphoimager. In der Abbildung angegeben sind die relativen Molekülmassen des C<sup>14</sup>markierten Proteinstandards (links; MW-Standard). Auf der rechten Seite sind die relativen Molekülmassen der interagierenden Proteine angegeben; in schwarz spezifisch interagierende Proteine. Zusätzlich sind die mit den Lokalisationselementen spezifisch interagierenden Proteine mit einem Sternchen markiert (mit einem roten Sternchen markiert, das spezifisch mit dem XDead end-LE zusätzlich interagierende Protein).

Bei genauer Betrachtung fällt aber auf, daß die Bindung des XDead end-Lokalisationselementes an die Proteine mit einer ungefähren Molekülmasse von 42, 40 und 33 kDa deutlich stärker ist. Die Bindung zu den anderen Proteinen und zu den sequenzunspezifischen RNA Bindeproteinen ist relativ vergleichbar. Ein weiterer Unterschied im Vergleich der spezifischen Proteinbindung beider RNAs ist die Existenz einer zusätzlichen Proteinbindung des XDead end-LE RNA Fragmentes. Dieses Protein einer ungefähren Molekülmasse von 38 kDa scheint tatsächlich spezifisch für die XDead end-LE RNA zu sein, denn die Zugabe von unmarkierter Vg1-LE RNA im Überschuß kann diese Bindung nicht kompetitieren (Abb.3.20 Spur 9).

Im UV-Quervernetzungsversuch konnten Proteine einer relativen Molekülmasse von 78, 69, 42, 40, 36 und 33 kDa identifiziert werden, die spezifisch mit dem XDead end- und dem Vg1-LE Lokalisationselement interagieren. Bis jetzt konnten fünf Proteine isoliert werden, die nachweislich an das Vg1-LE binden (Vg1RBP/Vera, VgRBP60, VgRBP71, Prp und XStaufen) (Cote et al., 1999; Deshler et al., 1997; Havin et al., 1998; Kroll et al., 2002; Yoon and Mowry, 2004; Zhao et al., 2001). Nun stellt sich die Frage, ob diese bekannten Proteine auch in diesem UV-Quervernetzungsversuch nachgewiesen werden können. Das Vg1RBP/Vera Protein hat eine relative Molekülmasse von 69 kDa (Deshler et al., 1997; Havin et al., 1998). Im hier durchgeführten UV-Quervernetzungsversuch existiert eine 69 kDa Bande, die dem Vg1RBP/Vera Protein entsprechen könnte. Das VgRBP60 Protein, das eine relative Molekülmasse von 60 kDa hat, dürfte nur schwer in diesem UV-Quervernetzungsversuch zu detektieren sein, da die Bindung der unspezifisch bindenden FRGY-Proteine (56 und 54 kDa) trotz Einsatzes von Kompetitoren sehr stark ist. Das VgRBP71 Protein hat eine rechnerische Molekülmasse von 71 kDa und könnte somit auch der 78 kDa Bande entsprechen, die im vorliegenden UV-Quervernetzungsversuch zu detektieren ist. Außerdem könnte das XStaufen Protein mit 78 kDa durch die entsprechende 78 kDa Bande im Quervernetzungsversuch repräsentiert werden. Ein weiteres Protein, das an das Vg1-LE bindet, ist Prp mit einer relativen Molekülmasse von 39 kDa. Im UV-Quervernetzungsversuch konnten Proteine mit Molekülmassen von 40 und 42 kDa identifiziert werden, die an das Vg1-LE binden und außerdem ein Protein mit einer relativen Molekülmasse von 38 kDa, das aber spezifisch nur an das XDead end-LE bindet. Eines dieser Proteine könnte möglicherweise das Prp Protein darstellen.

### 3.5.2 Das XDead end Lokalisationselement bindet Prrp im Koimmunopräzipitationsexperiment

Zusätzlich zur Analyse der Proteinbindung im UV-Quervernetzungsexperiment sollte die Proteinbindung des XDead end Lokalisationselements an bekannte RNA bindende Proteine, für die eine Bindung an das Vg1-LE und eine mögliche Funktion im Lokalisationsprozeß gezeigt werden konnte, getestet werden. Koimmunopräzipitationsexperimente bieten die Möglichkeit RNA-Protein-Interaktionen *in vitro* zu testen. Dazu wurde die radioaktiv markierte RNA mit poly-myc Epitoptag fusioniertem Protein inkubiert, welches zuvor im Retikulozytenlysat *in vitro* translatiert wurde. Nach der erfolgten Bindung wurde die RNA mit Hilfe von anti myc-Immunopellets koimmunopräzipitiert. Die Analyse erfolgte anschließend durch die Auftrennung der koimmunopräzipitierten RNA auf einem Harnstoffgel. Die Proteinbindung des XDead end Lokalisationselements wurde mit dem Vg1RBP Protein (Elisha et al., 1995), (Deshler et al., 1997), dem Prrp Protein (Zhao et al., 2001) sowie dem VgRBP71 Protein (Kroll et al., 2002) durchgeführt. Als Negativkontrolle sollte die Bindung mit dem ribosomalen Protein L5 getestet werden. Als interne Positivkontrolle wurde das XNIF-LE im Koimmunopräzipitationsversuch hinzu gezogen (Claussen et al., 2004). Außerdem wurde auch die Bindung der lacZ RNA an diese Proteine getestet, die nur eine sehr schwache Hintergrundbindung an Vg1RBP zeigt (Abb.3.21). Das als Negativkontrolle eingesetzte Protein L5 bindet nicht an das XDead end-LE. Anders als aus den Ergebnissen des UV-Quervernetzungsexperimentes zu erwarten wäre, zeigt das XDead end Lokalisationselement nur eine Hintergrund Bindung an Vg1RBP. Eine Proteinbindung von VgRBP71 ist überhaupt nicht zu detektieren. Dagegen bindet das XDead end-LE stark das Prrp Protein.



**Abb.3.21 Bindung des XDead end Lokalisationselements im Koimmunopräzipitations-experiment.**

Die *in vitro* transkribierten  $^{32}\text{P}$ -rUTP markierten XDead end-LE RNA (KH14), *lacZ* RNA und als interne Positivkontrolle XNIF-LE RNA wurden mit *in vitro* translatierten poly-myc fusionierten Vg1-RBP, Prrp, VgRBP71 und L5 inkubiert und anschließend mit anti-myc Immunopellets koimmunopräzipitiert. Die gebundene bzw. ungebundene RNA wurde durch Phenol/Chloroform Extraktion und anschließender Ethanol-fällung isoliert und auf einem Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Detektion der gebundenen bzw. ungebundenen RNA erfolgte mit dem Phosphoimager.

## 4 Diskussion

Die subzelluläre Lokalisation von maternalen Determinanten am vegetalen Kortex der Oozyte während der *Xenopus* Oogenese gewährleistet eine asymmetrische Zellteilung und damit eine räumlich und zeitlich gezielte Weitergabe wichtiger maternaler Faktoren während der frühen Embryogenese. Um im großen Maßstab nach diesen wichtigen maternalen Faktoren zu suchen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine mit lokalisierten RNA Molekülen angereicherte cDNA Bibliothek benutzt. Mittels differenzieller Hybridisierung eines cDNA Microarrays wurden cDNA Klone ausgewählt, die potentiell vegetal lokalisierten RNA Molekülen entsprachen. Deren vegetale Lokalisation wurde mittels whole mount *in situ* Hybridisierung verifiziert. In zwei aufeinander folgenden Durchmusterungsrunden konnten zusätzlich zu allen schon bekannten vegetal lokalisierten RNAs 55 neue Transkripte identifiziert werden, die sich aufgrund ihres charakteristischen Lokalisationsmusters dem frühen, intermediären bzw. späten Lokalisationsweg zuordnen ließen.

Zwei dieser neu identifizierten RNAs sollten näher charakterisiert werden, indem die RNA Expression während der Embryogenese und teilweise die Funktion des von der RNA kodierten Proteins untersucht wurde. Um weiterhin mehr Erkenntnisse den Mechanismus der RNA Lokalisation zu erlangen, wurde außerdem das RNA Lokalisationssignal der *XDead end* RNA identifiziert und deren Proteinbindung analysiert.

### 4.1 Die Identifikation neuer vegetal lokalisierter RNAs durch differenzielle Hybridisierung

Eine wichtige Strategie zur Etablierung von Zellasymmetrien und für die ungleichmäßige Weitergabe maternaler Determinanten ist die zytoplasmatische Lokalisation von RNA Molekülen in bestimmten subzellulären Bereichen der Zelle. Für einige während der *Xenopus* Oogenese vegetal angereicherten RNAs konnte mittlerweile eine wichtige Funktion in der frühen embryonalen Musterbildung nachgewiesen werden, bzw. eine Rolle in der primordialen Keimzellentwicklung gezeigt werden. In vorhergehenden Arbeiten, in denen gezielt nach vegetal lokalisierten RNAs gesucht wurde, konnten beispielsweise *VegT*, *Xcat2* und *DEADSouth* aus einer cDNA Bibliothek isoliert werden, die aus der Zytoskelett assoziierten Detergenzien unlöslichen Oozyten RNA Fraktion (DIF) hergestellt

wurde (Mosquera et al., 1993). Dazu wurden in diesem Fall die cDNAs von Bakterienklonen auf Filter gebracht und diese mit radioaktiv markierten cDNA Sonden aus RNA vegetaler bzw. animaler Kortizes (Zhang and King, 1996), oder mit subtrahierter cDNA, hergestellt aus DIF RNA, hybridisiert (Mosquera et al., 1993). Die potentiellen Kandidaten wurden in diesen Arbeiten anschließend mittels whole mount *in situ* Hybridisierung überprüft. Eine ähnliche Strategie wurde in der hier vorliegenden Arbeit gewählt. Die zur Durchmusterung nach vegetal lokalisierten RNAs dienenden und mit diesen Transkripten angereicherte cDNA Bibliothek wurde ausschließlich aus RNA vegetaler Kortizes hergestellt (Claußen, 2002). Um anschließend diese cDNA Bibliothek zu durchsuchen, wurden die ausgehend von Bakterienklonen amplifizierte cDNAs auf Macro- bzw. Microarrays gebracht. Anders als bei der Identifizierung von *VegT* wurden zur Herstellung markierter cDNAs für die Hybridisierung der Arrays Detergenzien unlösliche bzw. lösliche RNA Fraktionen benutzt. Von 10000 cDNA Klonen, die mit Hilfe von Macro- bzw. Microarray basierender Hybridisierung analysiert wurden, konnten insgesamt 831 potentielle Kandidaten aus zwei unabhängigen Runden für eine weitere Analyse ausgewählt werden. Die Sequenzierung der cDNAs ergab die Reidentifizierung aller schon bekannten vegetal lokalisierten RNAs, häufig in mehrfachen Kopien. Mit der Analyse der überbleibenden Kandidaten in der whole mount *in situ* Hybridisierung wurden insgesamt 55 neue vegetal lokalisierte RNAs identifiziert (Abb 3.3). Auch die neu identifizierten vegetal lokalisierten RNAs konnten teilweise in mehreren Kopien isoliert werden. Insgesamt sind von den 831 für eine weitere Analyse ausgewählten Kandidaten 279 als in der Oozyte vegetal lokalisiert bestätigt worden. Somit war einer von drei Kandidaten, die aufgrund von Signifikanz- und Kontrastwert ausgewählt worden sind, tatsächlich vegetal lokalisiert. Diese Quote zeigt deutlich die Effizienz der in der vorliegenden Arbeit gewählten Strategie zur Identifizierung vegetal lokalisierter RNAs.

Anhand der unterschiedlichen zeitlichen und räumlichen Charakteristika der Lokalisationswege lassen sich die neu identifizierten vegetal lokalisierten RNAs deutlich in Gruppen aufteilen. In die Gruppe der früh lokalisierten RNA können 20 der neuen RNAs eingeteilt werden. Ein für die *Vgl* RNA typisches spätes Verteilungsmuster weisen dagegen 32 der neu identifizierten RNAs auf. Außerdem konnten auch drei neue RNAs identifiziert werden, die Merkmale beider Verteilungswege aufweisen, und damit in die Gruppe der intermediär lokalisierten RNAs eingeteilt werden. Interessanterweise sind in der Literatur bislang deutlich mehr früh lokalisierte RNA Moleküle als spät lokalisierte RNAs beschrieben. Diese Beobachtung läßt sich aber vielleicht damit erklären, daß in



vorangegangenen Suchen nach vegetal lokalisierten RNAs unter anderem auch cDNA Bibliotheken benutzt worden sind, die speziell aus der RNA der mitochondrialen Wolke hergestellt wurden (Kloc et al., 1993). Die Duchmusterung dieser cDNA Bibliotheken schließt die Identifikation von RNAs aus, die nicht über die mitochondriale Wolke verteilt werden.

Obgleich es schon bekannt war, daß nicht alle früh lokalisierten RNAs eine Keimplasma spezifische Expression zeigen, wird eine Korrelation zwischen dem frühen RNA Sortierungsweg und einer Assoziation mit den Keimplasma postuliert (Houston and King, 2000b; Kloc et al., 2001). Für sechs der 10 bekannten früh lokalisierten RNAs konnte eine Expression im Keimplasma nachgewiesen werden. Diese Korrelation kann mit der Anzahl der neu identifizierten früh lokalisierten RNA Moleküle untermauert werden. Ein deutlicher Anteil (14 von 20 RNAs) zeigt eine Expression im Keimplasma. Dagegen gab es bislang für die Assoziation einer spät lokalisierten RNA mit dem Keimplasma keine Beispiele. Nur für die *fatvg* RNA, die über den intermediären Lokalisationsweg verteilt wird, konnte eine Expression im Keimplasma in den frühen Teilungsstadien der Embryogenese gezeigt werden (Chan et al., 2001). Interessanterweise sind aber sechs der neu identifizierten und über den späten Lokalisationsweg zum vegetalen Pol transportierten RNAs im Keimplasma des Embryos exprimiert. Die Identifikation dieser RNAs zeigt, daß die Lokalisation in der mitochondrialen Wolke (wie bei RNAs des frühen und intermediären Weges) möglicherweise nicht ausschlaggebend für die spätere Assoziation mit dem Keimplasma ist.

#### **4.2 Neu identifizierte lokalisierte maternale Faktoren kodieren für unterschiedliche hypothetische Proteinfunktionen**

In der Suche nach noch unbekanntem am vegetalen Pol der *Xenopus* Oozyte lokalisierten RNA Molekülen konnten 55 bislang unbekannte Transkripte identifiziert werden (Tabelle 3.3). Obgleich für einen großen Teil der cDNA Sequenzen bislang keine Annotation vorliegt, konnten für 27 der neuen RNAs Aminosäuresequenzen abgeleitet und damit eine hypothetische Proteinfunktion vorausgesagt werden. Eine Gruppe von fünf RNAs kodiert vermutlich für Nukleinsäure Bindeproteine. Von den schon bekannten vegetal lokalisierten RNAs gehört eindeutig der größte Teil (7 von 18 RNAs) zu dieser Funktionsgruppe. Für spät lokalisierte RNAs dieser Gruppe, z.B. *VegT* (Zhang et al., 1998; Zhang and King, 1996) und auch *XBicaudalC* (Wessely and De Robertis, 2000), konnte eine Rolle in der

Endodermspezifikation während der frühen Embryogenese gezeigt werden. Früh lokalisierte RNAs, beispielsweise *Xcat2* (MacArthur et al., 1999) und *Xdazl* (Houston and King, 2000a; Houston et al., 1998), die für RNA Bindeproteine kodieren, sind vermutlich in die Spezifikation und Entwicklung der Keimzellvorläuferzellen involviert. Kürzlich wurde für das von der *Hermes* RNA kodierte RNA Bindeprotein eine mögliche Rolle in der translationellen Repression oder der Regulation der Stabilität von RNAs, die am vegetalen Pol lokalisiert werden, vermutet (Zearfoss et al., 2004). Die bisherigen experimentellen Daten liefern dafür allerdings keine eindeutigen Beweise, obgleich die Koloalstion des Hermes Proteins zusammen mit der über den intermediären Verteilungsweg lokalisierten *Hermes* RNA in der mitochondrialen Wolke und am vegetalen Pol dies andeutet.

Eine weitere Funktionsgruppe innerhalb der vegetal lokalisierten RNAs bilden Proteine, die vermutlich Komponenten von Signaltransduktionswegen repräsentieren. Diese werden von 4 neuen RNAs kodiert, die über den späten bzw. intermediären Verteilungsweg lokalisiert werden. Auch hier existieren Beispiele für schon bekannte RNAs, die für Proteine aus Signaltransduktionsketten kodieren. Das Proteinprodukt der spät lokalisierten *Vg1* RNA (Kessler and Melton, 1995; Thomsen and Melton, 1993) wurde als wichtiger sezenerter TGF  $\beta$  Faktor charakterisiert. Für das Vg1 Protein wird eine Rolle in der Bildung des dorsalen Mesoderms postuliert (Thomsen and Melton, 1993). Eine andere über den späten Lokalisationsweg verteilte RNA kodiert für das Signalmolekül *Xwnt11* (Ku and Melton, 1993b). Das *Wnt11* Protein ist unter anderem wichtig für die Etablierung der dorso-ventralen Achse des sich entwickelnden Embryos.

Eine andere interessante Gruppe von vier neuen spät lokalisierten RNA Molekülen kodiert für unterschiedliche Proteine, die mit dem Fettstoffwechsel im Zusammenhang stehen. Auch dieser Gruppe lassen sich schon bekannte RNAs zuordnen, wobei über die Funktion dieser Proteine bislang keine Daten veröffentlicht wurden. Die über den intermediären Sortierungsweg verteilte *fatvg* RNA kodiert für ein Protein mit einer Homologie zu dem ADR („adipose differentiation related“) Protein aus der Maus (Chan et al., 1999). Die Keimplasma-spezifische Expression von *fatvg* läßt die Vermutung einer Rolle in der Keimzellentwicklung zu. Die Expression von *fatvg* in den Fettkörpern von Embryonen im Kaulquappenstadium deutet jedoch auf weitere Funktionen für das *Fatvg* Protein hin.

Mit der Identifikation einer großen Zahl neuer vegetal lokalisierter RNAs lassen sich zusätzlich zu den Funktionsgruppen, die von Proteinen bekannter lokalisierter RNAs gebildet werden, auch neue Funktionsgruppen charakterisieren. Eine dieser neuen Gruppen

bilden die Proteinprodukte von vier RNAs, die Zytoskelett assoziierte Proteine darstellen. Diese könnten möglicherweise in der Reorganisation des Zytoskeletts nach der Fertilisation involviert sein. Für die mit dem Keimplasma assoziierten Mitglieder dieser Gruppe ist aber auch eine wichtige Rolle in diversen Transportprozessen, z.B. der Keimplasmaaggregation oder der Wanderung primordialer Keimzellen während der Embryogenese, vorstellbar.

Neue Funktionsgruppen, für die bisher noch keine Mitglieder als vegetal lokalisierte RNA identifiziert wurden, bilden außerdem Proteinprodukte mit einer möglichen Rolle im Vesikeltransport. So konnte in gezeigt werden, daß die Mutation des *Drosophila* Rab 11 Proteins, einer monomerischen GTPase involviert in unterschiedliche Vesikeltransportprozesse, eine ektopische Lokalisation von *oskar* zur Folge hat (Jankovics et al., 2001). Die Mislokalisierung von *oskar* ist in diesem Fall eine Konsequenz abnormal polarisierter Mikrotubuli. Zwar ist die *Rab11* RNA selber nicht in der *Drosophila* Oozyte lokalisiert, jedoch zeigt dieses Beispiel einen Zusammenhang zwischen RNA Lokalisation und Proteinen, die für ihre Funktion im Vesikeltransport bekannt sind.

Sehr interessant könnte außerdem die Funktion der Proteine sein, die von neu identifizierten vegetal lokalisierten RNAs kodiert werden und in die Prozessierung von Proteinen involviert sind. Erst kürzlich wurde die früh lokalisierte RNA *XPACE4* („paired basic amino acid converting enzyme 4“) publiziert, die für ein Protein der Subtilisin/Kexin Proproteinkonvertase Familie kodiert (Birsoy et al., 2005). *XPACE4* hat eine wichtige Funktion in der endogenen Induktion des Mesoderm, indem es die Produktion aktiver und reifer TGF- $\beta$  Signalmoleküle, wie Vg1, Xnr1, Xnr2 und andere, reguliert.

Für einen großen Teil der neu identifizierten vegetal lokalisierten RNAs ist es jedoch bislang nicht möglich, Vermutungen über mögliche Funktionen der Proteine anzustellen, da die Sequenz der entsprechenden cDNAs oftmals Bereiche der 3'-untranslatierbaren Region repräsentiert und somit keine Information über die Aminosäuresequenz enthält.

#### **4.3 Die *XGik* RNA kodiert für ein Protein mit hypothetischer Glycerolkinase Aktivität**

Bei der Suche nach noch unbekanntem RNAs, die am vegetalen der Pol der *Xenopus* Oozyte lokalisiert sind, wurde zunächst in der auf Macroarray-Hybridisierungen basierenden Durchmusterung der mit lokalisierten RNAs angereicherten cDNA Bibliothek eine cDNA und in der sich anschließenden Microarray-Hybridisierung zehn unabhängige

cDNAs isoliert, die eine RNA repräsentieren. Ausgehend von der typischen zeitlichen und räumlichen Expression der *XGlk* RNA während der Oogenese kann diese RNA dem späten Lokalisationsweg zugeordnet werden. Die Analyse der RNA Expression während der Embryogenese mittels whole mount *in situ* Hybridisierung und RT-PCR Analyse zeigte, daß die RNA während der ersten Zellteilungen kaum nachweisbar exprimiert ist, während der Gastrulation und Neurulation jedoch wieder stärker detektierbar ist und mit zunehmender Entwicklungsstufe abnimmt. Anders als in den ersten Teilungsstadien, in denen kaum noch maternales Transkript nachzuweisen ist, kann vermutlich aufgrund zygotischer Expression in Gastrula- und Neurulastadien die *XGlk* RNA nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine sehr frühe Funktion des Proteins schon vor bzw. unmittelbar nach der Fertilisation des Eis und eine spätere Funktion während der Embryogenese hin. Beispielsweise hat das Protein, das von der früh lokalisierten RNA *Xwnt11* kodiert wird, eine wichtige Funktion in der Ausbildung der dorso-ventralen Achse des Embryos (Ku and Melton, 1993b; Schroeder et al., 1999). Außerdem wird für *Xwnt11* auch eine Rolle in der Kardiogenese beschrieben (Pandur et al., 2002).

Interessanterweise kodiert die *XGlk* RNA für das Enzym Glycerolkinase, das die Phosphorylierung von Glycerol zu Glycerol 3-phosphat katalysiert. Damit stellt die Glycerolkinase ein wichtiges Enzym an der Schnittstelle von Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel dar. Die Glycerolkinase ist ein evolutionär stark konserviertes Enzym mit einer Ähnlichkeit von 50 % zwischen humaner und bakterieller Glycerolkinase aus *E. coli* (Hurley et al., 1993) und einer Identität von 83 % zwischen humaner und *Xenopus laevis* Glycerolkinase. Auch die Tertiärstruktur des Glycerolkinase Proteins ist stark konserviert. So wie andere Mitglieder der Aktin Superfamilie der ATPasen z.B. zytoskelettale Aktin Proteine, Hexokinasen und Hitzeschockproteine bildet die Glycerolkinase eine für die Proteinsuperfamilie typische ATP-Bindetasche, den sogenannten „actin fold“, aus (Hurley, 1996).

Mit einer Glycerolkinase Mangelfunktion in Folge von Mutationen des X-Chromosoms sind im Menschen erblich bedingte Krankheiten wie die Nebennierenhypoplasie und eine muskuläre Dystrophie beschrieben worden (Sehgal and Stack, 2005). Im sich entwickelnden Mausembryo führt ein Glycerolkinasemangel zu Wachstumsstörungen, verändertem Fettsäuremetabolismus, zu einer autonomen Glucocorticoidausschüttung und einem neonatalem Tod (Huq et al., 1997). Eine vegetale Lokalisation der *XGlk* RNA bedeutet aber, daß im Gegensatz zur animalen Hemisphäre das Enzym in der vegetalen Hemisphäre abhängig vom Zeitpunkt der Translation angereichert wird. Eine interessante

Frage ist es deshalb, welche Rolle eine im Vergleich zum animalen Bereich des Eis bzw. des Embryos eine gezielte Bereitstellung von phosphoryliertem Glycerol für den vegetalen Bereich und damit für die Entwicklung des Embryos bedeutet.

#### **4.4 Die spät lokalisierte *XDead end* RNA ist während der *Xenopus* Embryogenese Keimplasma-spezifisch exprimiert**

Während der *Xenopus* Oogenese werden bestimmte mRNA Moleküle über zeitlich und räumlich unterschiedlich Verteilungswege zum vegetalen Pol der Oozyte transportiert und dort verankert. Eine in der vorausgehend beschriebenen Suche nach vegetal lokalisierten Transkripten identifizierte RNA, *XDead end*, ist in Stadium I/II Oozyten zunächst gleichmäßig, jedoch nicht in der mitochondrialen Wolke, exprimiert. Ab dem Stadium III der Oogenese, ist die Anreicherung der *XDead end* Transkripte am vegetalen Pol zu beobachten. Diese sind in Stadium VI Oozyten schließlich über die gesamte vegetalen Hemisphäre verteilt. Die Lokalisationscharakteristika der *XDead end* RNA entsprechen somit klar denen anderer über den späten Lokalisationsweg verteilten RNAs, beispielsweise *Vgl* und *VegT* (Weeks and Melton, 1987; Zhang and King, 1996). Während der ersten Zellteilungsstadien des *Xenopus* Embryos ist die *XDead end* RNA jedoch ähnlich wie *Xpat* (Hudson and Woodland, 1998) zunächst in inselförmigen Strukturen des Keimplasmas lokalisiert und in den Gastrulationsstadien mit den primordialen Keimzellen assoziiert, die mit der Gastrulationsbewegung in das posteriore Endoderm transportiert werden. In Neurulationsstadien ist die *XDead end* RNA ausgehend von der räumliche Expression in der whole mount *in situ* Hybridisierung und der zeitlichen Expression in der RT-PCR Analyse auf dem höchsten Expressionslevel und in granulären Strukturen im Endoderm des Embryos lokalisiert. Im Stadium 30/31 der *Xenopus* Embryogenese ist eine im Vergleich zu *Xpat* deutlich schwächere Expression der *XDead end* RNA in den primordialen Keimzellen im Endoderm zu beobachten. Eine schwache RNA Expression in diesem Embryonalstadium wird auch in der RT-PCR Analyse bestätigt, in der *XDead end* Transkripte zu diesem Zeitpunkt kaum mehr nachzuweisen sind. Interessanterweise konnten mittels RT-PCR Analysen, anders als bei der *DEADSouth* und *Xdazl* RNA, die auch im Testisgewebe exprimiert sind (Claußen, 2002; Houston et al., 1998), *XDead end* Transkripte nur im Ovar des adulten Frosches detektiert werden, die auf die maternale Expression der *XDead end* RNA zurückzuführen sind. Somit ist die *XDead end* RNA

ausschließlich und spezifisch zunächst während der Oogenese und später im Keimplasma und den primordialen Keimzellen der frühen *Xenopus* Embryogenese exprimiert.

In *Xenopus* sind eine ganze Reihe früh lokalisierter RNA Moleküle bekannt, die spezifisch im Keimplasma und den primordialen Keimzellen exprimiert werden (Kloc et al., 1998). Auch für die *fatvg* RNA ist eine Assoziation mit dem Keimplasma in frühen Embryonalstadien beschrieben (Chan et al., 2001). Die *XDead end* RNA ist jedoch das bisher erste Beispiel für eine RNA, die über den späten Verteilungsweg zum vegetalen Pol der Oozyte transportiert wird und während der Embryogenese spezifisch für das Keimplasma und die Keimzellvorläuferzellen ist. Dabei stellt die *XDead end* RNA keine Ausnahme dar, wie andere neu in dieser Arbeit identifizierte spät lokalisierte RNAs, z.B. *velo 13*, *21* und *76*, belegen, die ähnlich wie *XDead end* während der frühen Embryogenese im Keimplasma lokalisiert sind (siehe auch Kapitel 4.1). Diese noch neue Beobachtung wirft die Frage auf, wie über den späten Lokalisationsweg und über die ganze vegetale Hemisphäre verteilte RNA Moleküle nachträglich mit den für das Keimplasma charakteristischen Strukturen assoziieren, da bekanntermaßen RNAs, wie *Xcat2*, die über den frühen Verteilungsweg lokalisiert werden, schon in den sehr frühen Oogenesestadien mit Keimplasma bildenden Strukturen, wie den Keimgranulae oder dem „Nuage“ assoziiert und mit diesen zunächst in der mitochondrialen Wolke und dann am vegetalen Pol der Oozyte lokalisiert sind (Kloc et al., 2002).

Auch die Zebrafisch *Dead end* RNA (Weidinger et al., 2003) ist spezifisch in Keimzellen während der Zebrafisch Embryogenese exprimiert. Jedoch ist die maternale Zebrafisch *Dead end* RNA nicht, wie z.B. *zDazl*, während der Zebrafisch Oogenese vegetal lokalisiert.

#### **4.5 Die XDead end Funktion in der primordialen Keimzellentwicklung ist evolutionär konserviert**

Ausgehend von der Beobachtung, daß die *XDead end* RNA spezifisch im Keimplasma und primordialen Keimzellen exprimiert ist, wurde mittels Injektion eines *XDead end* antisense Morpholino Oligonuklotids der Effekt einer verminderten *XDead end* Proteinmenge auf die Entwicklung der primordialen Keimzellen untersucht. DE-MO injizierte Embryonen, die im Stadium 31 analysiert wurden, zeigen weniger bzw. keine *Xpat* positiven Keimzellen. Die Analyse der *Xpat* Expression zeigt, daß die primordialen Keimzellen aufgrund der Inhibition der *XDead end* Proteintranslation vermutlich nicht korrekt in Richtung des lateralen Endoderms migrieren können und möglicherweise daraufhin

verloren gehen. Ein vergleichbarer Effekt auf die Zahl der primordialen Keimzellen nach DE-MO Injektion ist auch nach der Analyse der *Xdazl* Expression zu beobachten. Damit kann ein direkter Effekt der DE-MO Injektion auf die *Xpat* Expression der primordialen Keimzellen ausgeschlossen werden. Vielmehr scheint die Verringerung des endogenen XDead end Proteingehaltes, eine Störung der in diesem Stadium der Embryogenese migrierenden primordialen Keimzellen zu verursachen, die schließlich im Verschwinden der primordialen Keimzellen resultiert.

Die Analyse DE-MO-injizierter Embryonen im Gastrula- und Neurulastadium zeigte keinen Effekt auf die Zahl und die räumliche Verteilung der primordialen Keimzellen im Vergleich zu Kontrollembryonen. Bei DE-MO injizierten Embryonen, die im Stadium 24 bzw. 27 der Embryogenese analysiert wurden, konnte teilweise eine fehlende *Xpat* Expression beobachtet werden, während die Anzahl der *Xpat* exprimierenden primordialen Keimzellen beim größten Teil aller Embryonen mit den Kontrollembryonen vergleichbar war. Als interessanter Effekt nach DE-MO Injektion in Stadium 24 und auch 27 Embryonen zeigte sich jedoch die inselartige Aggregation der wandernden Keimzellen im Endoderm.

Diese Resultate deuten darauf hin, daß das XDead end Protein möglicherweise keine Funktion während der sehr frühen Phase der Keimzellenspezifikation hat, wie beispielsweise *Xklp1*, ein Protein der Kinesin II Familie, das als Motorprotein während der Keimplasmaaggregation in den frühen Zellteilungsstadien agiert. In Anbetracht der vergleichbaren Anzahl primordialer Keimzellen zwischen injizierten Embryonen und Kontrollembryonen des Gastrula-, Neurula- und frühen Schwanzknospenstadiums ist auch eine Funktion des XDead end Proteins in der Proliferation der primordialen Keimzellen während der Mitosen während der Stadien 10 bis 22 (Dziadek and Dixon, 1977) eher unwahrscheinlich.

Interessanterweise ist der durch *XDazl* RNA Depletion verursachte Phänotyp in Bezug auf die Zahl und Lokalisation der primordialen Keimzellen ähnlich (Houston and King, 2000a). Auch hier wurde eine verringerte Anzahl bzw. das Fehlen der wandernden primordialen Keimzellen beobachtet. Außerdem konnte in *XDazl* depletierten Stadium 27 Embryonen eine Akkumulation der primordialen Keimzellen in Gruppen festgestellt werden. *XDazl* („Deleted in Azoospermis“) kodiert für ein RNA Bindeprotein, das vermutlich eine indirekte Rolle während der Keimzellenmigration spielt. Obwohl der Phänotyp einen Migrationseffekt vermuten läßt, wird in Anbetracht der Tatsache, daß das XDazl Protein nur bis zum Stadium 22 der Embryogenese detektierbar ist und die aktive

Migration der Keimzellen mit dem Stadium 25 beginnt, eine Funktion in der Etablierung der Migrationskompetenz der Keimzellen vorgeschlagen (Houston and King, 2000a). Auch für das XDead end Protein wäre eine Funktion denkbar, die mit einer korrekten Migration der primordialen Keimzellen im Zusammenhang steht. Sowohl *XDead end* als auch *Xdazl* kodieren für RNA Bindeproteine. Im Gegensatz zu XDead end konnte für das XDazl Protein auch eine *in vitro* RNA Bindung gezeigt werden (Houston et al., 1998). Möglicherweise erfüllt XDead end ähnlich wie XDazl eine Funktion als RNA Bindeprotein, z.B. in der Kontrolle der RNA Translation, Stabilität oder sogar im Transport von RNAs in den primordialen Keimzellen. Da auf molekularer Ebene die Funktion von XDead end völlig ungeklärt ist, wäre es zunächst interessant die zeitliche Expression und die Lokalisation des endogenen Proteins zu untersuchen. Außerdem wäre es für das Verständnis der Keimzellentwicklung hilfreich zu wissen, welche RNAs an das XDead end Protein binden und dadurch reguliert werden.

Der durch die DE-MO Injektion verursachte Phänotyp konnte außerdem durch die Koinjektion von Zebrafisch *dead end* RNA zu einem großen Teil umgekehrt werden. Diese Beobachtung zeigt deutlich die XDead end Morpholino Oligonukleotid Injektion als Ursache für den erzielten Phänotyp. Obwohl das Zebrafisch Dead end Protein nur zu 26,8 % identisch ist, scheint es die Funktion des endogenen *Xenopus* Dead end Proteins übernehmen zu können. Für das Zebrafisch Dead end Protein konnte ähnlich wie für das *Xenopus* Homolog eine Rolle in der primordialen Keimzellentwicklung gezeigt werden (Weidinger et al., 2003). Damit handelt es sich hier um ein Protein mit evolutionär konservierter Funktion während der Keimzellentwicklung in Vertebraten. Die zeitliche und räumliche Lokalisation der Keimzellen während der Zebrafisch und der *Xenopus* Embryogenese ist nur bedingt vergleichbar. Im Zebrafisch migrieren die Keimzellen anders als in *Xenopus* schon mit dem Beginn der Gastrulation (Raz, 2003). Nach der Inhibition der Expression des endogenen Zebrafisch Dead end Proteins durch Morpholino Oligonukleotid Injektion konnte als erster Phänotyp bereits im Blastulastadium eine abnormale Position der primordialen Keimzellen beobachtet werden. Im Embryonalstadium 7 Stunden nach der Eibefruchtung wurde eine ektopische Lokalisation der primordialen Keimzellen festgestellt. Schließlich konnte ähnlich wie im *Xenopus*, aber schon während der Gastrulation, ein Phänotyp beobachtet werden, der charakteristisch für einen Migrationsdefekt ist und zum „Verschwinden“ der primordialen Keimzellen führt. Trotz der zeitlichen Unterschiede im Auftreten des Phänotyps, die einen direkten Vergleich erschweren, läßt der resultierende Phänotyp und die Tatsache, daß das Zebrafisch Protein



die Funktion des *Xenopus* Proteins substituiert, einen ähnlichen bzw. konservierten Funktionsmechanismus auf molekularer Ebene vermuten.

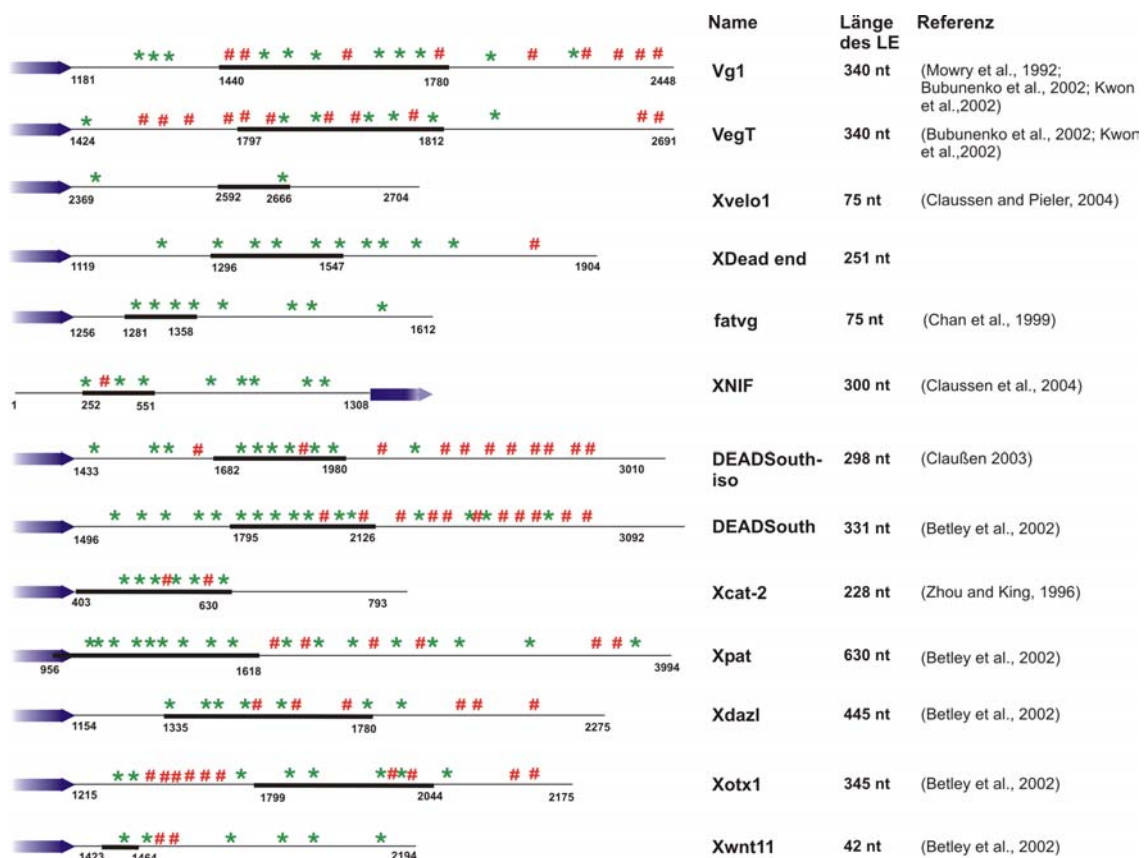
Eine weitere interessante Frage ist die Aufklärung der Ursache des durch XDead end-MO Injektion erzielten Effektes des Verlorengehens der primordialen Keimzellen. Dieser Effekt könnte einerseits das Resultat von Apoptose sein, oder durch eine Differenzierung in einen anderen Zelltyp verursacht werden. In der vorliegenden Arbeit konnten zwar keine Ergebnisse erzielt werden, die Hinweise auf die weitere Entwicklung der Zellen nach XDead end-MO Injektion ergeben, jedoch zeigen die *Xdazl* depletierten Embryonen nach DAPI Färbung und TUNEL Analyse keine Merkmale, die auf einen Zelltod hinweisen (Houston et al., 1998). Auch die Ergebnisse von Transplantationsexperimenten mit primordialen Keimzellen (Wylie et al., 1985) zeigen, daß primordiale Keimzellen in somatische Zellen differenzieren können. Im Gegensatz dazu konnten im Zebrafisch durch den „Knockdown“ des Zebrafisch Dead end Proteins primordiale Keimzellen mit den typischen morphologischen Merkmalen apoptotischer Zellen beobachtet werden (Weidinger et al., 2003).

#### **4.6 Ein 251 Nukleotide umfassendes Fragment des *XDead end* 3'-UTRs vermittelt die Lokalisation der mRNA am vegetalen Pol**

Viele Beispiele für lokalisierte RNA Moleküle unterschiedlicher Organismen zeigen, daß im allgemeinen der RNA Lokalisationsprozeß über bestimmte Signalsequenzen vermittelt wird. Diese *cis*-agierenden Faktoren befinden sich meistens im 3'-UTR der mRNAs. Auch für eine Reihe von Transkripten, die in der *Xenopus laevis* Oozyte vegetal lokalisiert sind, konnten RNA Lokalisationssignale identifiziert werden (Abb.4.1). In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Mikroinjektionsexperimenten ein Bereich der *XDead end* RNA eingegrenzt, der den Transport der mRNA zum vegetalen Pol der Oozyte vermittelt und einen 251 nt umfassenden Bereich des 3'-UTRs darstellt. Dieses *XDead end* RNA Fragment ist nicht nur das minimale Fragment, das nach Mikroinjektion in den Kern am vegetalen Pol lokalisiert wird, sondern die ubiquitäre Verteilung des RNA Fragmentes ohne den das Lokalisationssignal umfassenden Bereich nach Mikroinjektion zeigt die Notwendigkeit dieses RNA Fragmentes für die korrekte vegetale Lokalisation der *XDead end* RNA.

Bei näherer Analyse der Lokalisationssignale, die bislang in *Xenopus* identifiziert wurden, konnten z.B. für das *Vgl* und das *VegT* Lokalisationselement kurze sich wiederholende

Nukleotidmotive in der Primärstruktur charakterisiert werden (Abb. 4.1). Eine Akkumulation der sogenannten E2 (UUCAC) und VM1 (UUUCUA) Motive im Bereich der Sequenz des 3'untranslatierten Bereiches korreliert in diesen Fällen scheinbar mit der Position des Lokalisationselementes (Bubunenko et al., 2002). Noch deutlicher ist diese Korrelation für das *Xcat2* Lokalisationssignal. Hier sind E2 und VM1 Motive, ausschließlich im für die Lokalisation der RNA verantwortlichen Bereich zu finden (Abb.4.1). Die Korrelation zwischen der Anhäufung bestimmter Motive und vegetaler Lokalisation ließ die Vermutung zu, daß diese Elemente ein Konsensussignal für den Transport der RNA darstellen. So verhindert die Mutation der E2 Elemente (UUCAC) im VegT-LE die Lokalisation des RNA Fragmentes. Andererseits existieren einige Beispiele, für die dieser Zusammenhang nicht zutrifft. So befinden sich die E2 Motive im 3`-UTR der *XDead end* RNA relativ gleichmäßig verteilt. Außerdem überlappt das einzige VM1 Motiv innerhalb des 3`-UTRs der *XDead end* RNA nicht mit dem Lokalisationselement (siehe Abb.4.1).



**Abb.4.1 Übersicht der Lokalisationssignale vegetal lokalisierter RNA Moleküle**

Schematische Darstellung der bislang experimentell ermittelten Lokalisationselemente vegetal lokalisierter RNAs in *Xenopus*. Dargestellt ist jeweils die relative Größe des untranslatierten Bereiches und die Position des identifizierten Lokalisationssignals. Die dazugehörige exakte Nukleotidposition bzw. die Größe des Lokalisationssignals ist in Zahlen angegeben. Mit einem grünen Stern ist die Position eines E2- bzw. E2-ähnlichem Elementes (UUCAC, UUGCAC, AUCAC, UUCAU, UCCAC oder UUCAG) und mit einer roten Raute die Position eines VM1

Elementes (UUUCUA, CUUCU, UUUUCC oder UCCUCC) angegeben (Bubunenko et al. 2002; Kwon et al. 2002).

Von der Annahme ausgehend, daß bestimmte repetitive Elemente der Primärsequenz essentiell für die Lokalisation der mRNAs am vegetalen Pol der Oozyte sind, wurde das Computerprogramm „Repfind“ zur Identifikation nicht zufällig in einem Sequenzbereich wiederholt aufeinanderfolgender kurzer Elementen entwickelt (Betley et al., 2002). Mit diesem Programm können CAC-beinhaltende kurze Sequenzwiederholungen im 3'untranslatierbaren Bereich vegetal lokalisierter RNAs identifiziert werden, die eine Ähnlichkeit mit E2 Motiven aufweisen. Eine Clusterbildung überlappend mit dem experimentell ermittelten Lokalisationselement mit einer deutlichen Signifikanz (p-Wert  $> 1 \times 10^{-6}$ ) konnte jedoch nur im 3'-UTR früh lokalisierter RNAs wie *Xcat2*, *Xpat* und *Xotx1* ermittelt werden. Die Primärsequenz lokalisierter mRNAs, beispielsweise *fatvg* und *VegT* weist zwar kurze CAC-beinhaltende Elemente, aber nicht mit signifikanter Wiederholung auf (p-Wert  $< 1 \times 10^{-4}$ ). Die Analyse der *XDead end* RNA im „Repfind“-Programm resultiert in einem ähnlichen Ergebnis. Im 3'-UTR der RNA wurden nur nicht signifikante repetitive Elemente identifiziert (p-Wert =  $3,2 \times 10^{-4}$ ), die dazu nicht einmal vollständig dem Bereich des experimentell ermittelten Lokalisationselementes entsprechen. Somit ist die Vermutung, daß clusterbildende Elemente verbreitet genutzte RNA Lokalisationssignale darstellen, nicht allgemein gültig. Vielmehr scheint es nur für eine Gruppe lokalisierter RNAs eine Tendenz für die Anhäufung bestimmter Motive in Lokalisationselementen zu geben, die notwendig für die Lokalisation am vegetalen Pol der Oozyte ist.

Eine andere Vermutung, wie Proteine eine Gruppe bestimmter RNAs „erkennen“ und dann binden, ist die Ausbildung ähnlicher RNA Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen. Bislang gibt es zwar nur wenige Beispiele, für die eine RNA Strukturvorhersage auch tatsächlich experimentell verifiziert wurde. Das *bicoid* LE konnte als komplexes und tertiär Struktur ausbildendes Lokalisationselement experimentell charakterisiert werden (Brunel and Ehresmann, 2004). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, daß Bereiche der *bicoid* und *fushi tarazu* Lokalisationselemente mit einer ähnlichen Struktur möglicherweise einen ähnlichen Proteinkomplex binden (Snee et al., 2005). Vermutlich ist ein komplexes Zusammenspiel aus Motiven der Primärstruktur, die schließlich durch Sekundär- bzw. Tertiärstruktur möglicherweise eine konservierte Struktur bilden, nötig um als Lokalisationssignal die Proteinmaschinerie zu rekrutieren.

#### 4.7 Das Proteinbindungsverhalten der *XDead end* RNA korreliert mit dem anderer spät lokalisierter RNAs

Die Identifikation von Proteinen, die mit RNA Lokalisationssignalen interagieren, ist wichtig, um den molekularen Mechanismus der Lokalisation bestimmter mRNA Moleküle zu verstehen. Diese Proteine binden an die zu lokalisierende RNA und können eine Funktion als Adaptorproteine haben, die möglicherweise als Verbindung zu Motorproteinen dienen. Auch Proteine für die translationelle Regulation und die Verankerung der mRNA am Zielort sind essentielle Proteine des RNA Lokalisationskomplexes. Bislang wurden Proteine genauer charakterisiert, die an das *Vg1* mRNA Lokalisationssignal binden. Außerdem konnte mit Hilfe von UV-Quervernetzungsexperimenten und Koimmunopräzipitationen ein differenzielles Proteinbindungsverhalten im Vergleich zwischen früh und spät lokalisierten RNAs gezeigt werden (Claussen et al., 2004).

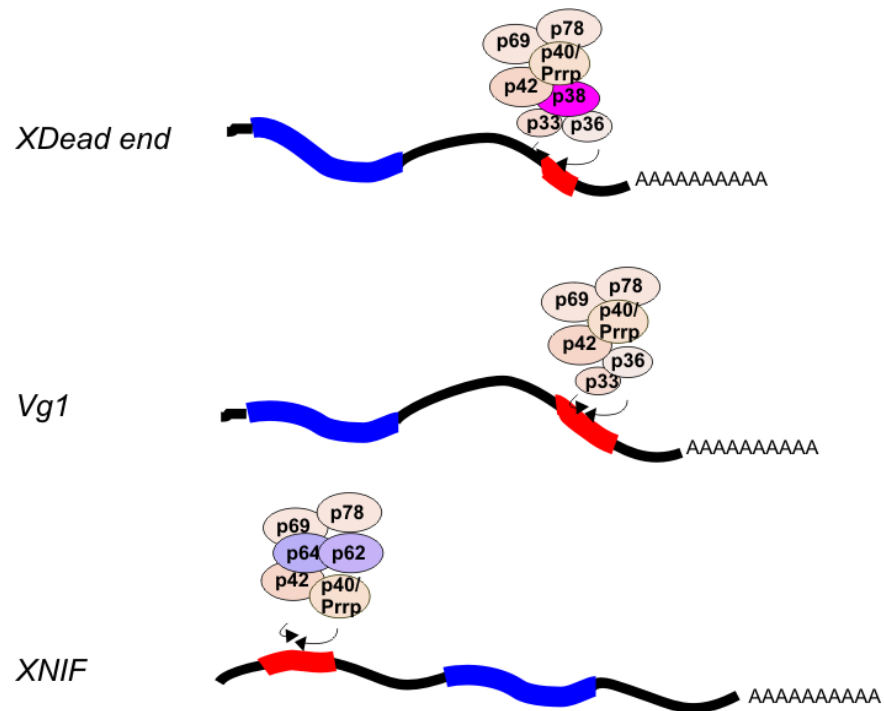
Um Erkenntnisse über das Proteinbindungsverhalten der *XDead end* RNA zu erhalten, wurde das *XDead end*-LE in UV-Quervernetzungsstudien und in Koimmunopräzipitationsexperimenten getestet. Die *XDead end* RNA wird ausgehend von den Merkmalen der subzellulären Lokalisation während der Oogenese über den späten RNA Verteilungsweg lokalisiert. Von dieser Beobachtung ausgehend ist eine ähnliche Proteinbindung vergleichbar mit anderen spät lokalisierten RNAs zu erwarten. In der UV-Quervernetzungsanalyse zeigte sich bei einem direkten Vergleich der *Vg1*-LE und *XDead end*-LE Proteinbindung, daß beide RNAs spezifisch mit wenigstens 6 Proteinen interagieren (33, 36, 40, 42, 69 und 78 kDa). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, daß RNAs, die den gleichen, in diesem Fall den späten Transportweg benutzen, dieselben Proteine binden und somit möglicherweise auf dieselbe Art und Weise transportiert werden. Interessanterweise bindet das *XDead end*-LE im Vergleich zum *Vg1*-LE stärker an die niedermolekularen Proteine (33, 40 und 42 kDa) und außerdem zusätzlich wenigstens ein spezifisches Protein einer ungefähren Größe von 38 kDa. Dieses 38 kDa Protein scheint ausschließlich spezifisch für das *XDead end*-LE zu sein, denn die *XDead end* Bindung zu diesem Protein im UV-Quervernetzungsversuch konnte durch die *Vg1*-LE RNA nicht kompetiert werden. Diese Beobachtung könnte damit erklärt werden, daß *XDead end* anders als *Vg1* zwar über den späten Transportweg lokalisiert, dann aber später mit dem Keimplasma assoziiert ist. Während *Vg1* und auch *XDead end* zunächst am vegetalen Kortex verankert werden, konnte für die *Vg1* RNA eine Loslösung vom

Oozytenkortex gezeigt werden, die möglicherweise durch die Phosphorylierung von Vg1RBP und eine folgende Disassemblierung des Lokalisationskomplexes verursacht wird (A.Git und N.Standart; persönliche Mitteilung). Im Gegensatz dazu verbleibt die *XDead end* RNA zunächst am vegetalen Kortex der Oozyte. Über einen bislang unbekanntem Mechanismus wird dann eine Assoziation der *XDead end* RNA mit dem Keimplasma ermöglicht. Vielleicht hat das in der UV-Quervernetzungsanalyse identifizierte 38 kDa Protein eine Funktion bei der nachträglichen Lokalisation der *XDead end* RNA im Keimplasma, die eine bislang noch neue Beobachtung darstellt.

Auch der Test der *XDead end* RNA Proteinbindung im Koimmunopräzipitationsexperiment bestätigt erneut die Korrelation von RNA Lokalisationsweg und Proteinbindungsverhalten. Ähnlich wie zuvor für das Vg1-LE und das XVelo1-LE im gleichen Typ von Experiment gezeigt (Claussen et al., 2004; Claussen and Pieler, 2004), bindet das XDead end-LE stark an Prrp, jedoch kaum an Vg1RBP. Im Gegensatz dazu bindet das Lokalisationselement der früh lokalisierten RNA *XNIF* stark an Vg1RBP. Außerdem ist keine Proteinbindung der XDead end-LE RNA Fragmentes mit dem VgRBP71 Protein zu beobachten.

Das Prrp Protein mit einer relativen Molekülmasse von 39 kDa, das von Zhao et al., (2001) als Vg1-LE interagierendes Protein identifiziert wurde, konnte mit Hilfe der Koimmunopräzipitationsexperimente als ein an die *XDead end* RNA bindendes Protein charakterisiert werden. Auch im UV-Quervernetzungsexperiment wurde ein XDead end-LE interagierendes Protein identifiziert, das mit einer abgeschätzten Größe von 40 kDa dem Prrp Protein entsprechen könnte. Aufgrund der Tatsache, daß das Prrp Protein mit *Vgl* am vegetalen Kortex kolokalisiert und mit den Prolin-reichen Domänen mit Profilin, einem Protein involviert in Prozesse der Aktin Polymerisation, interagiert, wird für das Prrp Protein eher eine Rolle in der Verankerung der RNA am Zielort vermutet (Zhao et al., 2001). Basierend auf dieser Beobachtung könnte vermutlich das Prrp Protein an der Verankerung der *XDead end* RNA beteiligt sein.

Obwohl im Koimmunopräzipitationsexperiment keine deutliche Bindung von Vg1RBP an das XDead end-LE festgestellt worden ist, wurden im UV-Quervernetzungsexperiment zwei Proteine einer relativen Molekülgröße von 69 und 78 kDa identifiziert, von denen eines Vg1RBP repräsentieren könnte.



**Abb.4.2 Schematische Darstellung des Vergleichs der Proteinbindung des XDead end, Vg1 und XNIF Lokalisationssignals.**

Die Abbildung zeigt gegenüberstellend die Proteinbindungsdaten des Vg1-LEs, des XDead end-LEs und als Vergleich des XNIF-LEs (Claussen et al., 2004). Das an das XDead end-LE bindende Protein ist magenta farbig gekennzeichnet während identische Proteine mit gleicher Farbe markiert sind. Proteine, die spezifisch an das XNIF-LE binden, sind hellblau markiert. (Der kodierende Bereich ist blau markiert; das Lokalisationssignal im 3'-UTR ist rot markiert.)

## 5 Zusammenfassung

Vegetal lokalisierte RNA Moleküle spielen bekanntermaßen eine wichtige Rolle während der Entwicklung des *Xenopus laevis* Embryos. Somit trägt deren Identifikation zum Verständnis der Bildung komplexer Strukturen während der Embryogenese bei.

Mit dem Ziel, noch unbekanntes vegetal lokalisierte RNAs zu identifizieren, wurden 10000 cDNA Klone einer mit vegetal-kortikal lokalisierten Transkripten angereicherten cDNA Bibliothek basierend auf einer differentiellen Hybridisierung von Macro- bzw. Microarrays durchmustert. Schließlich wurden durch Verifizierung in der whole mount *in situ* Hybridisierung insgesamt 55 neue vegetal lokalisierte RNA Moleküle identifiziert. Ausgehend von den zeitlichen und räumlichen Lokalisationsmerkmalen lassen sich die neuen Transkripte in die Gruppe der früh, spät, oder intermediär lokalisierten RNAs einteilen. Die bislang annotierten RNAs, kodieren unter anderem auch für Proteine, die für vegetal lokalisierte RNAs bisher unbekannte interessante Funktionsgruppen bilden.

Eine der neuen vegetal lokalisierten RNAs kodiert für das *Xenopus* Homolog des Zebrafisch Dead end Proteins, einem hypothetischen RNA-Bindeprotein. *XDead end* ist die erste über den späten Lokalisationsweg verteilte RNA, die als Keimplasma-spezifisch exprimiertes Transkript während der frühen *Xenopus* Embryogenese charakterisiert werden konnte. Weiterhin weisen die Ergebnisse von Morpholino Oligonukleotid Injektionsexperimenten auf eine konservierte Funktion von XDead end innerhalb der primordialen Keimzellentwicklung in *Xenopus laevis* hin.

Mit Hilfe von Mikroinjektionsexperimenten ließ sich ein für die vegetale Lokalisation der *XDead end* RNA verantwortlicher Bereich innerhalb der 3'-untranslatierten Region auf 251 Nukleotide eingrenzen. Dieses als Lokalisationssignal agierende Fragment zeigte zusätzlich zur Identifikation eines spezifisch an das XDead end Lokalisationselement bindenden Proteins ein für spät lokalisierte RNAs charakteristisches Proteinbindungsmuster in UV-Quervernetzungsexperimenten. Die Theorie einer Korrelation zwischen RNA Lokalisationsweg und Proteinbindungsverhalten wird außerdem durch die Ergebnisse der Koimmunopräzipitationsexperimente unterstützt.

## 6 Literaturverzeichnis

- Akiyama-Oda, Y., Hosoya, T. and Hotta, Y. (1999) Asymmetric cell division of thoracic neuroblast 6-4 to bifurcate glial and neuronal lineage in *Drosophila*. *Development*, **126**, 1967-1974.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**, 403-410.
- Aronov, S., Aranda, G., Behar, L. and Ginzburg, I. (2001) Axonal tau mRNA localization coincides with tau protein in living neuronal cells and depends on axonal targeting signal. *J Neurosci*, **21**, 6577-6587.
- Bashirullah, A., Halsell, S.R., Cooperstock, R.L., Kloc, M., Karaiskakis, A., Fisher, W.W., Fu, W., Hamilton, J.K., Etkin, L.D. and Lipshitz, H.D. (1999) Joint action of two RNA degradation pathways controls the timing of maternal transcript elimination at the midblastula transition in *Drosophila melanogaster*. *Embo J*, **18**, 2610-2620.
- Berekelya, L.A., Ponomarev, M.B., Luchinskaya, N.N. and Belyavsky, A.V. (2003) *Xenopus* Germes encodes a novel germ plasm-associated transcript. *Gene Expr Patterns*, **3**, 521-524.
- Berleth, T., Burri, M., Thoma, G., Bopp, D., Richstein, S., Frigerio, G., Noll, M. and Nusslein-Volhard, C. (1988) The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of the *Drosophila* embryo. *Embo J*, **7**, 1749-1756.
- Bernardoni, R., Kammerer, M., Vonesch, J.L. and Giangrande, A. (1999) Gliogenesis depends on glide/gcm through asymmetric division of neuroglioblasts. *Dev Biol*, **216**, 265-275.
- Betley, J.N., Frith, M.C., Graber, J.H., Choo, S. and 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. and 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. and Heasman, J. (2005) XPACE4 is a localized pro-protein convertase required for mesoderm induction and the cleavage of specific TGF{beta} proteins in *Xenopus* development. *Development*, **132**, 591-602.



- Bohl, F., Kruse, C., Frank, A., Ferring, D. and Jansen, R.P. (2000) She2p, a novel RNA-binding protein tethers ASH1 mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. *Embo J*, **19**, 5514-5524.
- Bouvet, P., Matsumoto, K. and Wolffe, A.P. (1995) Sequence-specific RNA recognition by the Xenopus Y-box proteins. An essential role for the cold shock domain. *J Biol Chem*, **270**, 28297-28303.
- Bouvet, P. and Wolffe, A.P. (1994) A role for transcription and FRGY2 in masking maternal mRNA within Xenopus oocytes. *Cell*, **77**, 931-941.
- Broadus, J. and Doe, C.Q. (1997) Extrinsic cues, intrinsic cues and microfilaments regulate asymmetric protein localization in Drosophila neuroblasts. *Curr Biol*, **7**, 827-835.
- Broadus, J., Fuerstenberg, S. and Doe, C.Q. (1998) Stufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature*, **391**, 792-795.
- Brunel, C. and Ehresmann, C. (2004) Secondary structure of the 3' UTR of bicoid mRNA. *Biochimie*, **86**, 91-104.
- Bubunenko, M., Kress, T.L., Vempati, U.D., Mowry, K.L. and 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.
- Chan, A.P. and Etkin, L.D. (2001) Patterning and lineage specification in the amphibian embryo. *Curr Top Dev Biol*, **51**, 1-67.
- Chan, A.P., Kloc, M., Bilinski, S. and Etkin, L.D. (2001) The vegetally localized mRNA fatvg is associated with the germ plasm in the early embryo and is later expressed in the fat body. *Mech Dev*, **100**, 137-140.
- Chan, A.P., Kloc, M. and 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.
- Chang, P., Torres, J., Lewis, R.A., Mowry, K.L., Houliston, E. and King, M.L. (2004) Localization of RNAs to the Mitochondrial Cloud in Xenopus Oocytes through Entrapment and Association with Endoplasmic Reticulum. *Mol Biol Cell*, **15**, 4669-4681.
- Chartrand, P., Meng, X.H., Singer, R.H. and Long, R.M. (1999) Structural elements required for the localization of ASH1 mRNA and of a green fluorescent protein reporter particle in vivo. *Curr Biol*, **9**, 333-336.
- Chen, Y., Jurgens, K., Hollemann, T., Claussen, M., Ramadori, G. and Pieler, T. (2003) Cell-autonomous and signal-dependent expression of liver and intestine marker

- genes in pluripotent precursor cells from *Xenopus* embryos. *Mech Dev*, **120**, 277-288.
- Claußen, M. (2002) Identifizierung und funktionelle Charakterisierung vegetal lokalisierter mRNAs in *Xenopus* Oocyten. *Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Abteilung Entwicklungsbiochemie*. Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen.
- Claussen, M., Horvay, K. and 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. and 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.
- Claussen, M., Rudt, F. and Pieler, T. (1999) Functional modules in ribosomal protein L5 for ribonucleoprotein complex formation and nucleocytoplasmic transport. *J Biol Chem*, **274**, 33951-33958.
- Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*, **16**, 10881-10890.
- Cote, C.A., Gautreau, D., Denegre, J.M., Kress, T.L., Terry, N.A. and Mowry, K.L. (1999) A *Xenopus* protein related to hnRNP I has a role in cytoplasmic RNA localization. *Mol Cell*, **4**, 431-437.
- De, J., Lai, W.S., Thorn, J.M., Goldsworthy, S.M., Liu, X., Blackwell, T.K. and Blackshear, P.J. (1999) Identification of four CCCH zinc finger proteins in *Xenopus*, including a novel vertebrate protein with four zinc fingers and severely restricted expression. *Gene*, **228**, 133-145.
- Deshler, J.O., Highett, M.I., Abramson, T. and 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. and Schnapp, B.J. (1997) Localization of *Xenopus* Vg1 mRNA by Vera protein and the endoplasmic reticulum. *Science*, **276**, 1128-1131.
- Ding, D., Parkhurst, S.M., Halsell, S.R. and Lipshitz, H.D. (1993) Dynamic Hsp83 RNA localization during *Drosophila* oogenesis and embryogenesis. *Mol Cell Biol*, **13**, 3773-3781.

- Driever, W., Siegel, V. and Nusslein-Volhard, C. (1990) Autonomous determination of anterior structures in the early *Drosophila* embryo by the bicoid morphogen. *Development*, **109**, 811-820.
- Duh, J.L., Zhu, H., Shertzer, H.G., Nebert, D.W. and Puga, A. (1995) The Y-box motif mediates redox-dependent transcriptional activation in mouse cells. *J Biol Chem*, **270**, 30499-30507.
- Dumont, J.N. (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol*, **136**, 153-179.
- Dziadek, M. and Dixon, K.E. (1977) An autoradiographic analysis of nucleic acid synthesis in the presumptive primordial germ cells of *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol*, **37**, 13-31.
- Elinson, R.P., King, M.L. and Forristall, C. (1993) Isolated vegetal cortex from *Xenopus* oocytes selectively retains localized mRNAs. *Dev Biol*, **160**, 554-562.
- Elisha, Z., Havin, L., Ringel, I. and Yisraeli, J.K. (1995) Vg1 RNA binding protein mediates the association of Vg1 RNA with microtubules in *Xenopus* oocytes. *Embo J*, **14**, 5109-5114.
- Ephrussi, A., Dickinson, L.K. and Lehmann, R. (1991) Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell*, **66**, 37-50.
- Ferrandon, D., Koch, I., Westhof, E. and Nusslein-Volhard, C. (1997) RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR-STAUFIN ribonucleoprotein particles. *Embo J*, **16**, 1751-1758.
- Forristall, C., Pondel, M., Chen, L. and King, M.L. (1995) Patterns of localization and cytoskeletal association of two vegetally localized RNAs, Vg1 and Xcat-2. *Development*, **121**, 201-208.
- Gard, D.L. (1991) Organization, nucleation, and acetylation of microtubules in *Xenopus laevis* oocytes: a study by confocal immunofluorescence microscopy. *Dev Biol*, **143**, 346-362.
- Gard, D.L. (1994) Gamma-tubulin is asymmetrically distributed in the cortex of *Xenopus* oocytes. *Dev Biol*, **161**, 131-140.
- Gard, D.L., Cha, B.J. and King, E. (1997) The organization and animal-vegetal asymmetry of cytokeratin filaments in stage VI *Xenopus* oocytes is dependent upon F-actin and microtubules. *Dev Biol*, **184**, 95-114.
- Garner, C.C., Tucker, R.P. and Matus, A. (1988) Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature*, **336**, 674-677.

- Gautreau, D., Cote, C.A. and 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.
- Gerber, W.V., Yatskievych, T.A., Antin, P.B., Correia, K.M., Conlon, R.A. and Krieg, P.A. (1999) The RNA-binding protein gene, hermes, is expressed at high levels in the developing heart. *Mech Dev*, **80**, 77-86.
- Havin, L., Git, A., Elisha, Z., Oberman, F., Yaniv, K., Schwartz, S.P., Standart, N. and Yisraeli, J.K. (1998) RNA-binding protein conserved in both microtubule- and microfilament- based RNA localization. *Genes Dev*, **12**, 1593-1598.
- Houston, D.W. and King, M.L. (2000a) 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. and King, M.L. (2000b) Germ plasm and molecular determinants of germ cell fate. *Curr Top Dev Biol*, **50**, 155-181.
- Houston, D.W., Zhang, J., Maines, J.Z., Wasserman, S.A. and 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. and Woodland, H.R. (1998) Xpat, a gene expressed specifically in germ plasm and primordial germ cells of *Xenopus laevis*. *Mech Dev*, **73**, 159-168.
- Hudson, J.W., Alarcon, V.B. and Elinson, R.P. (1996) Identification of new localized RNAs in the *Xenopus* oocyte by differential display PCR. *Dev Genet*, **19**, 190-198.
- Huq, A.H., Lovell, R.S., Ou, C.N., Beaudet, A.L. and Craigen, W.J. (1997) X-linked glycerol kinase deficiency in the mouse leads to growth retardation, altered fat metabolism, autonomous glucocorticoid secretion and neonatal death. *Hum Mol Genet*, **6**, 1803-1809.
- Hurley, J.H. (1996) The sugar kinase/heat shock protein 70/actin superfamily: implications of conserved structure for mechanism. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **25**, 137-162.
- Hurley, J.H., Faber, H.R., Worthylake, D., Meadow, N.D., Roseman, S., Pettigrew, D.W. and Remington, S.J. (1993) Structure of the regulatory complex of *Escherichia coli* III<sub>Glc</sub> with glycerol kinase. *Science*, **259**, 673-677.
- Jankovics, F., Sinka, R. and Erdelyi, M. (2001) An interaction type of genetic screen reveals a role of the Rab11 gene in oskar mRNA localization in the developing *Drosophila melanogaster* oocyte. *Genetics*, **158**, 1177-1188.

- Jansen, R.P. (2001) mRNA localization: message on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 247-256.
- Jones, T.L., Chong, L.D., Kim, J., Xu, R.H., Kung, H.F. and Daar, I.O. (1998) Loss of cell adhesion in *Xenopus laevis* embryos mediated by the cytoplasmic domain of XLerk, an erythropoietin-producing hepatocellular ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 576-581.
- Jones, T.L., Karavanova, I., Chong, L., Zhou, R.P. and Daar, I.O. (1997) Identification of XLerk, an Eph family ligand regulated during mesoderm induction and neurogenesis in *Xenopus laevis*. *Oncogene*, **14**, 2159-2166.
- Katzer, M., Kummert, F. and Sagerer, G. (2003) Methods for automatic microarray image segmentation. *IEEE Trans Nanobioscience*, **2**, 202-214.
- Kerr, M.K. and Churchill, G.A. (2001) Experimental design for gene expression microarrays. *Biostat*, **2**, 183-201.
- Kessler, D.S. and Melton, D.A. (1995) Induction of dorsal mesoderm by soluble, mature Vg1 protein. *Development*, **121**, 2155-2164.
- Kiebler, M.A., Hemraj, I., Verkade, P., Kohrmann, M., Fortes, P., Marion, R.M., Ortin, J. and Dotti, C.G. (1999) The mammalian staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J Neurosci*, **19**, 288-297.
- King, M.L. (ed.). (1995) *mRNA localization during frog oogenesis*. Landes Publishing, Austin, TX.
- King, M.L., Zhou, Y. and Bubunencko, M. (1999) Polarizing genetic information in the egg: RNA localization in the frog oocyte. *Bioessays*, **21**, 546-557.
- Kislauskis, E.H., Zhu, X. and Singer, R.H. (1997) beta-Actin messenger RNA localization and protein synthesis augment cell motility. *J Cell Biol*, **136**, 1263-1270.
- Kloc, M., Bilinski, S., Chan, A.P., Allen, L.H., Zearfoss, N.R. and Etkin, L.D. (2001) RNA localization and germ cell determination in *Xenopus*. *Int Rev Cytol*, **203**, 63-91.
- Kloc, M., Bilinski, S., Pui-Yee Chan, A. and Etkin, L.D. (2000) The targeting of Xcat2 mRNA to the germinal granules depends on a cis- acting germinal granule localization element within the 3'UTR. *Dev Biol*, **217**, 221-229.
- Kloc, M., Dougherty, M.T., Bilinski, S., Chan, A.P., Brey, E., King, M.L., Patrick, C.W., Jr. and Etkin, L.D. (2002) Three-Dimensional Ultrastructural Analysis of RNA Distribution within Germinal Granules of *Xenopus*. *Dev Biol*, **241**, 79-93.

- Kloc, M. and 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., Larabell, C., Chan, A.P. and Etkin, L.D. (1998) Contribution of METRO pathway localized molecules to the organization of the germ cell lineage. *Mech Dev*, **75**, 81-93.
- Kloc, M., Larabell, C. and Etkin, L.D. (1996) Elaboration of the messenger transport organizer pathway for localization of RNA to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Dev Biol*, **180**, 119-130.
- Kloc, M., Spohr, G. and Etkin, L.D. (1993) Translocation of repetitive RNA sequences with the germ plasm in *Xenopus* oocytes. *Science*, **262**, 1712-1714.
- Kobayashi, S., Amikura, R. and Mukai, M. (1998) Localization of mitochondrial large ribosomal RNA in germ plasm of *Xenopus* embryos. *Curr Biol*, **8**, 1117-1120.
- Kohrmann, M., Luo, M., Kaether, C., DesGroseillers, L., Dotti, C.G. and Kiebler, M.A. (1999) Microtubule-dependent recruitment of Staufin-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol Biol Cell*, **10**, 2945-2953.
- Kolev, N.G. and Huber, P.W. (2003) VgRBP71 Stimulates Cleavage at a Polyadenylation Signal in Vg1 mRNA, Resulting in the Removal of a cis-Acting Element that Represses Translation. *Mol Cell*, **11**, 745-755.
- Kress, T.L., Yoon, Y.J. and Mowry, K.L. (2004) Nuclear RNP complex assembly initiates cytoplasmic RNA localization. *J Cell Biol*, **165**, 203-211.
- Kroll, T.T., Zhao, W.M., Jiang, C. and Huber, P.W. (2002) A homolog of FBP2/KSRP binds to localized mRNAs in *Xenopus* oocytes. *Development*, **129**, 5609-5619.
- Ku, M. and Melton, D.A. (1993a) Xwnt-11: a maternally expressed *Xenopus* wnt gene. *Development*, **119**, 1161-1173.
- Ku, M. and Melton, D.A. (1993b) Xwnt-11: a maternally expressed *Xenopus* wnt gene. *Development*, **119**, 1161-1173.
- Ladomery, M. and Sommerville, J. (1994) Binding of Y-box proteins to RNA: involvement of different protein domains. *Nucleic Acids Res*, **22**, 5582-5589.
- Landgrebe, J., Bretz, F. and Brunner, E. (2004) Efficient two-sample designs for microarray experiments with biological replications. *In Silico Biol*, **4**, 0038.
- Lehmann, R. and Nusslein-Volhard, C. (1991) The maternal gene nanos has a central role in posterior pattern formation of the *Drosophila* embryo. *Development*, **112**, 679-691.

- Long, R.M., Gu, W., Lorimer, E., Singer, R.H. and Chartrand, P. (2000) She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA. *Embo J*, **19**, 6592-6601.
- Long, R.M., Singer, R.H., Meng, X., Gonzalez, I., Nasmyth, K. and Jansen, R.P. (1997) Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science*, **277**, 383-387.
- MacArthur, H., Bubunenko, M., Houston, D.W. and 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. and 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. and Kerr, K. (1997) Redundant RNA recognition events in bicoid mRNA localization. *Rna*, **3**, 1413-1420.
- Macdonald, P.M. and Kerr, K. (1998) Mutational analysis of an RNA recognition element that mediates localization of bicoid mRNA. *Mol Cell Biol*, **18**, 3788-3795.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., DeWeese-Scott, C., Fedorova, N.D., Geer, L.Y., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Jacobs, A.R., Lanczycki, C.J., Liebert, C.A., Liu, C., Madej, T., Marchler, G.H., Mazumder, R., Nikolskaya, A.N., Panchenko, A.R., Rao, B.S., Shoemaker, B.A., Simonyan, V., Song, J.S., Thiessen, P.A., Vasudevan, S., Wang, Y., Yamashita, R.A., Yin, J.J. and Bryant, S.H. (2003) CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments. *Nucleic Acids Res*, **31**, 383-387.
- Marchler-Bauer, A. and Bryant, S.H. (2004) CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucl. Acids Res.*, **32**, W327-331.
- Matsumoto, K., Meric, F. and Wolffe, A.P. (1996) Translational repression dependent on the interaction of the *Xenopus* Y-box protein FRGY2 with mRNA. Role of the cold shock domain, tail domain, and selective RNA sequence recognition. *J Biol Chem*, **271**, 22706-22712.
- Mosquera, L., Forristall, C., Zhou, Y. and 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. (1996) Complex formation between stage-specific oocyte factors and a *Xenopus* mRNA localization element. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14608-14613.

- Mowry, K.L. and Melton, D.A. (1992) Vegetal messenger RNA localization directed by a 340-nt RNA sequence element in *Xenopus* oocytes. *Science*, **255**, 991-994.
- Nieuwkoop, P.D. and Faber, J. (1967) *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin)*. North-Holland Publ. Co. Amsterdam, Amsterdam.
- Otero, L.J., Devaux, A. and Standart, N. (2001) A 250-nucleotide UA-rich element in the 3' untranslated region of *Xenopus laevis* Vg1 mRNA represses translation both in vivo and in vitro. *Rna*, **7**, 1753-1767.
- Pandur, P., Lasche, M., Eisenberg, L.M. and Kuhl, M. (2002) Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis. *Nature*, **418**, 636-641.
- Pannese, M., Cagliani, R., Pardini, C.L. and Boncinelli, E. (2000) Xotx1 maternal transcripts are vegetally localized in *Xenopus laevis* oocytes. *Mech Dev*, **90**, 111-114.
- Pondel, M.D. and King, M.L. (1988) Localized maternal mRNA related to transforming growth factor beta mRNA is concentrated in a cytokeratin-enriched fraction from *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 7612-7616.
- Rand, K. and Yisraeli, J. (2001) RNA localization in *Xenopus* oocytes. In Richter, D. (ed.), *Results Probl Cell Differ*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, Vol. 34, pp. 157-173.
- Ranjan, M., Tafuri, S.R. and Wolffe, A.P. (1993) Masking mRNA from translation in somatic cells. *Genes Dev*, **7**, 1725-1736.
- Raz, E. (2003) Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective. *Nat Rev Genet*, **4**, 690-700.
- Rebagliati, M.R., Weeks, D.L., Harvey, R.P. and Melton, D.A. (1985) Identification and cloning of localized maternal RNAs from *Xenopus* eggs. *Cell*, **42**, 769-777.
- Ressom, R.E. and Dixon, K.E. (1988) Relocation and reorganization of germ plasm in *Xenopus* embryos after fertilization. *Development*, **103**, 507-518.
- Robb, D.L., Heasman, J., Raats, J. and Wylie, C. (1996) A kinesin-like protein is required for germ plasm aggregation in *Xenopus*. *Cell*, **87**, 823-831.
- Ross, A.F., Olychnikov, Y., Kislauskis, E.H., Taneja, K.L. and Singer, R.H. (1997) Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol Cell Biol*, **17**, 2158-2165.



- Schroeder, K.E., Condic, M.L., Eisenberg, L.M. and Yost, H.J. (1999) Spatially regulated translation in embryos: asymmetric expression of maternal Wnt-11 along the dorsal-ventral axis in *Xenopus*. *Dev Biol*, **214**, 288-297.
- Schupbach, T. and Wieschaus, E. (1986) Germline autonomy of maternal-effect mutations altering the embryonic body pattern of *Drosophila*. *Dev Biol*, **113**, 443-448.
- Schwartz, S.P., Aisenthal, L., Elisha, Z., Oberman, F. and 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.
- Sehgal, A. and Stack, J. (2005) Complex glycerol kinase deficiency: An X-linked disorder associated with adrenal hypoplasia congenita. *Indian J Pediatr*, **72**, 67-69.
- Snee, M.J., Arn, E.A., Bullock, S.L. and Macdonald, P.M. (2005) Recognition of the *bed* mRNA localization signal in *Drosophila* embryos and ovaries. *Mol Cell Biol*, **25**, 1501-1510.
- St Johnston, D., Beuchle, D. and Nusslein-Volhard, C. (1991) *Staufen*, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell*, **66**, 51-63.
- Standart, N. and Jackson, R. (1994) Translational regulation. Y the message is masked? *Curr Biol*, **4**, 939-941.
- Stennard, F. (1998) *Xenopus* differentiation: VegT gets specific. *Curr Biol*, **8**, R928-930.
- Tafari, S.R. and Wolffe, A.P. (1993) Selective recruitment of masked maternal mRNA from messenger ribonucleoprotein particles containing FRGY2 (mRNP4). *J Biol Chem*, **268**, 24255-24261.
- Takizawa, P.A., Sil, A., Swedlow, J.R., Herskowitz, I. and Vale, R.D. (1997) Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature*, **389**, 90-93.
- Takizawa, P.A. and Vale, R.D. (2000) The myosin motor, Myo4p, binds *Ash1* mRNA via the adapter protein, She3p. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5273-5278.
- Thomsen, G.H. and Melton, D.A. (1993) Processed Vg1 protein is an axial mesoderm inducer in *Xenopus*. *Cell*, **74**, 433-441.
- Wagner, C., Palacios, I., Jaeger, L., St Johnston, D., Ehresmann, B., Ehresmann, C. and Brunel, C. (2001) Dimerization of the 3'UTR of *bicoid* mRNA Involves a Two-step Mechanism. *J Mol Biol*, **313**, 511-524.
- Wang, C., Dickinson, L.K. and Lehmann, R. (1994) Genetics of *nanos* localization in *Drosophila*. *Dev Dyn*, **199**, 103-115.



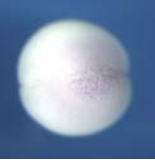
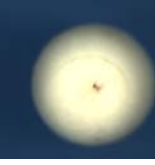


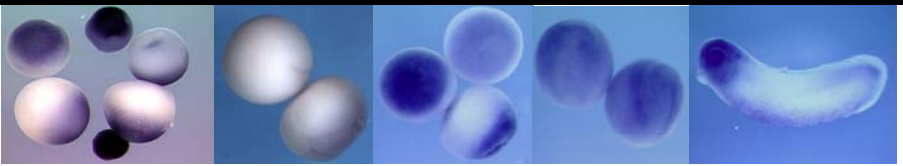
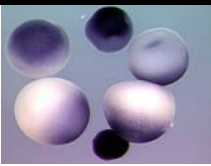











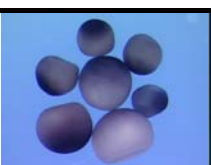




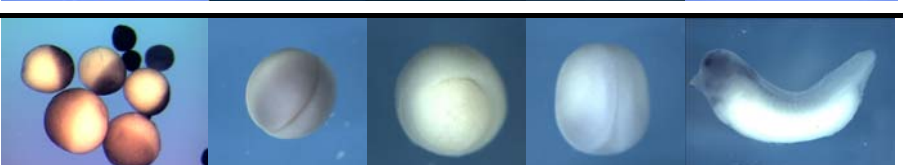
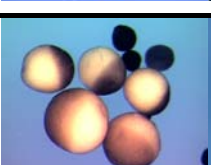





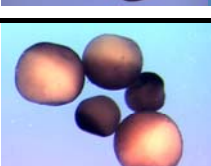
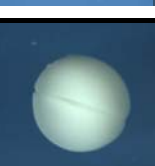

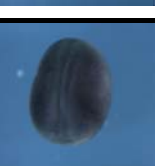

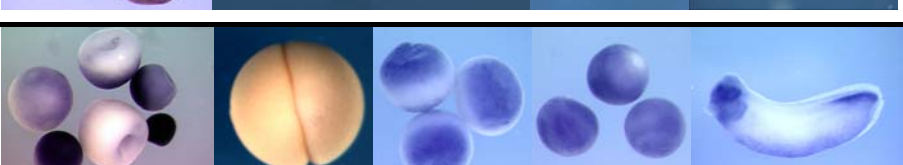

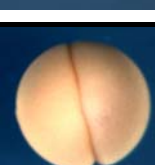


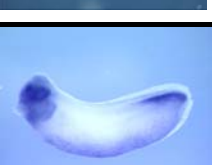
- Weeks, D.L. and Melton, D.A. (1987) A maternal mRNA localized to the vegetal hemisphere in *Xenopus* eggs codes for a growth factor related to TGF-beta. *Cell*, **51**, 861-867.
- Weidinger, G., Stebler, J., Slanchev, K., Dumstrei, K., Wise, C., Lovell-Badge, R., Thisse, C., Thisse, B. and Raz, E. (2003) dead end, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Curr Biol*, **13**, 1429-1434.
- Wessely, O. and 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.
- Whittington, P.M. and Dixon, K.E. (1975) Quantitative studies of germ plasm and germ cells during early embryogenesis of *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol*, **33**, 57-74.
- Wilhelm, J.E. and Vale, R.D. (1993) RNA on the move: the mRNA localization pathway. *J Cell Biol*, **123**, 269-274.
- Wilkie, G.S. and Davis, I. (2001) *Drosophila* wingless and pair-rule transcripts localize apically by dynein-mediated transport of RNA particles. *Cell*, **105**, 209-219.
- Wylie, C.C. and Heasman, J. (1976) The formation of the gonadal ridge in *Xenopus laevis*. I. A light and transmission electron microscope study. *J Embryol Exp Morphol*, **35**, 125-138.
- Wylie, C.C., Holwill, S., O'Driscoll, M., Snape, A. and Heasman, J. (1985) Germ plasm and germ cell determination in *Xenopus laevis* as studied by cell transplantation analysis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **50**, 37-43.
- Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D.M., Peng, V., Ngai, J. and Speed, T.P. (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucl. Acids Res.*, **30**, e15-.
- Yisraeli, J.K., Sokol, S. and 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. and Mowry, K.L. (2004) *Xenopus* Staufen is a component of a ribonucleoprotein complex containing Vg1 RNA and kinesin. *Development*, **131**, 3035-3045.

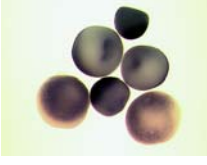


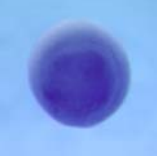

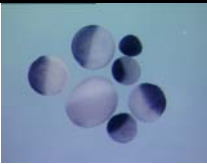




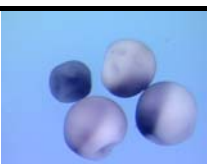









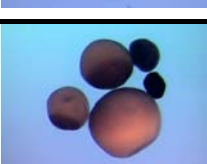
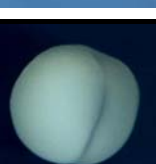

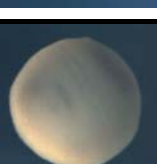
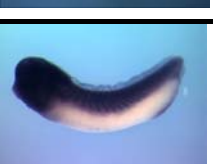
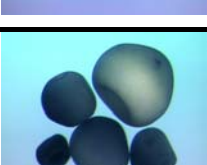


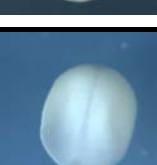

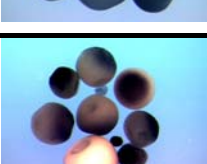

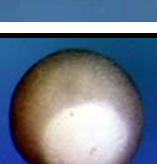
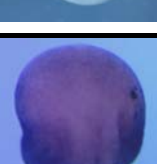

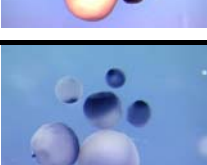

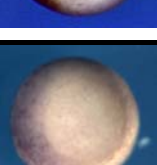
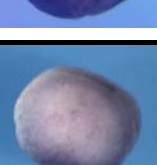

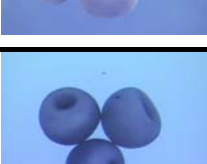
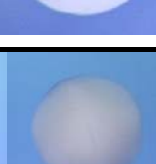



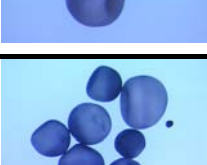
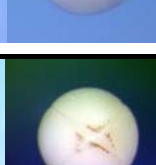


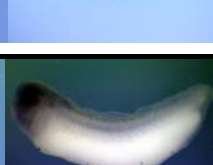
- Zearfoss, N.R., Chan, A.P., Wu, C.F., Kloc, M. and Etkin, L.D. (2004) Hermes is a localized factor regulating cleavage of vegetal blastomeres in *Xenopus laevis*. *Dev Biol*, **267**, 60-71.
- Zhang, J., Houston, D.W., King, M.L., Payne, C., Wylie, C. and Heasman, J. (1998) The role of maternal VegT in establishing the primary germ layers in *Xenopus* embryos. *Cell*, **94**, 515-524.
- Zhang, J. and 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, J. and King, M.L. (1999) PCR based cloning of cortically localized RNAs from *Xenopus* oocytes. In Tuan, R.S. and Lo, C.W. (eds.), *Developmental Biology Protocols*. Humana Press Inc., Totowa, N.J., Vol. II, pp. 301-306.
- Zhao, W.M., Jiang, C., Kroll, T.T. and 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. and King, M.L. (1996a) Localization of Xcat-2 RNA, a putative germ plasm component, to the mitochondrial cloud in *Xenopus* stage I oocytes. *Development*, **122**, 2947-2953.
- Zhou, Y. and King, M.L. (1996b) RNA transport to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Dev Biol*, **179**, 173-183.
- Zhou, Y., Zhang, J. and King, M.L. (2003) *Xenopus* autosomal recessive hypercholesterolemia protein couples lipoprotein receptors with the AP-2 complex in oocytes and embryos and is required for vitellogenesis. *J Biol Chem*, **278**, 44584-44592.

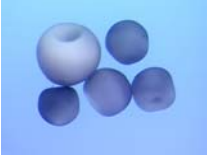




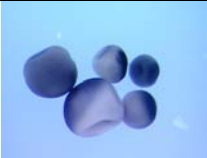




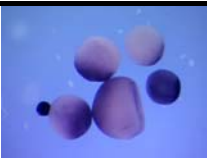

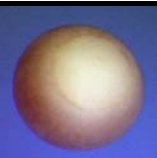


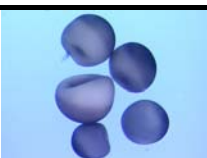


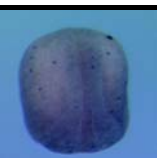

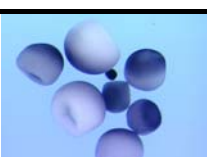

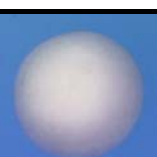




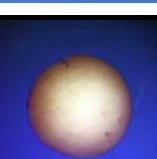
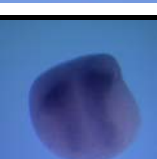

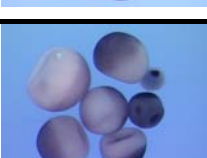
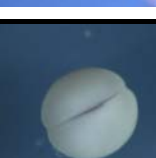

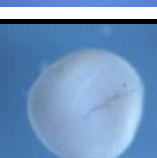

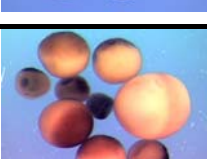
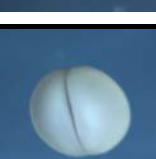
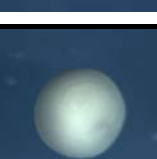
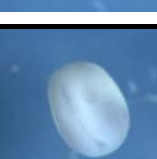
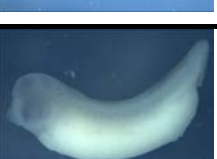
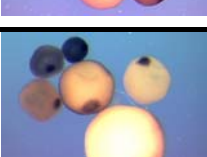
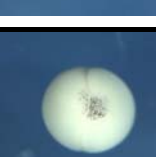
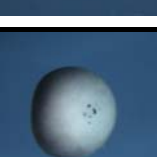
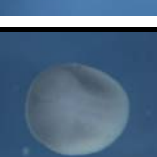
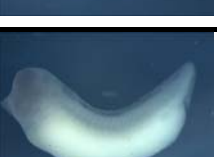
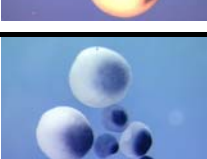


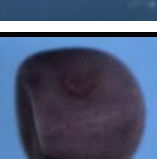
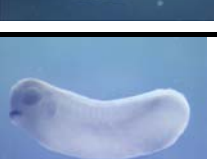
## 7 Anhang

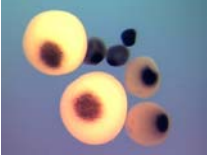









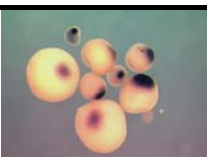




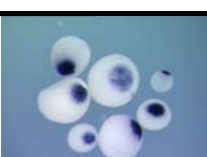




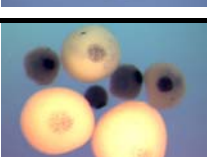
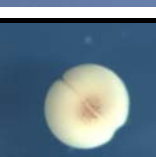



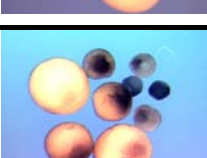
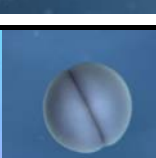
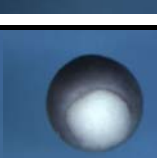
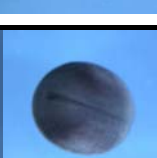
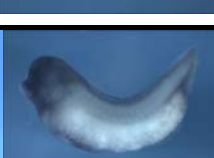


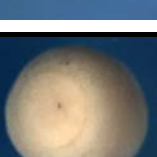
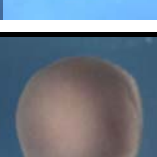

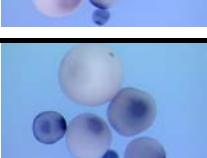





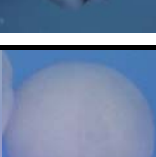

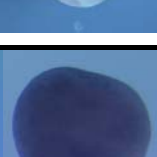


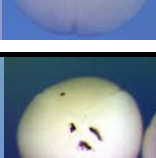
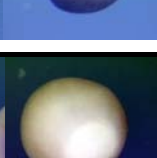
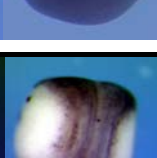

### 7.1 Darstellung aller in der Suche nach vegetal lokalisierten Transkripten neu identifizierten RNAs

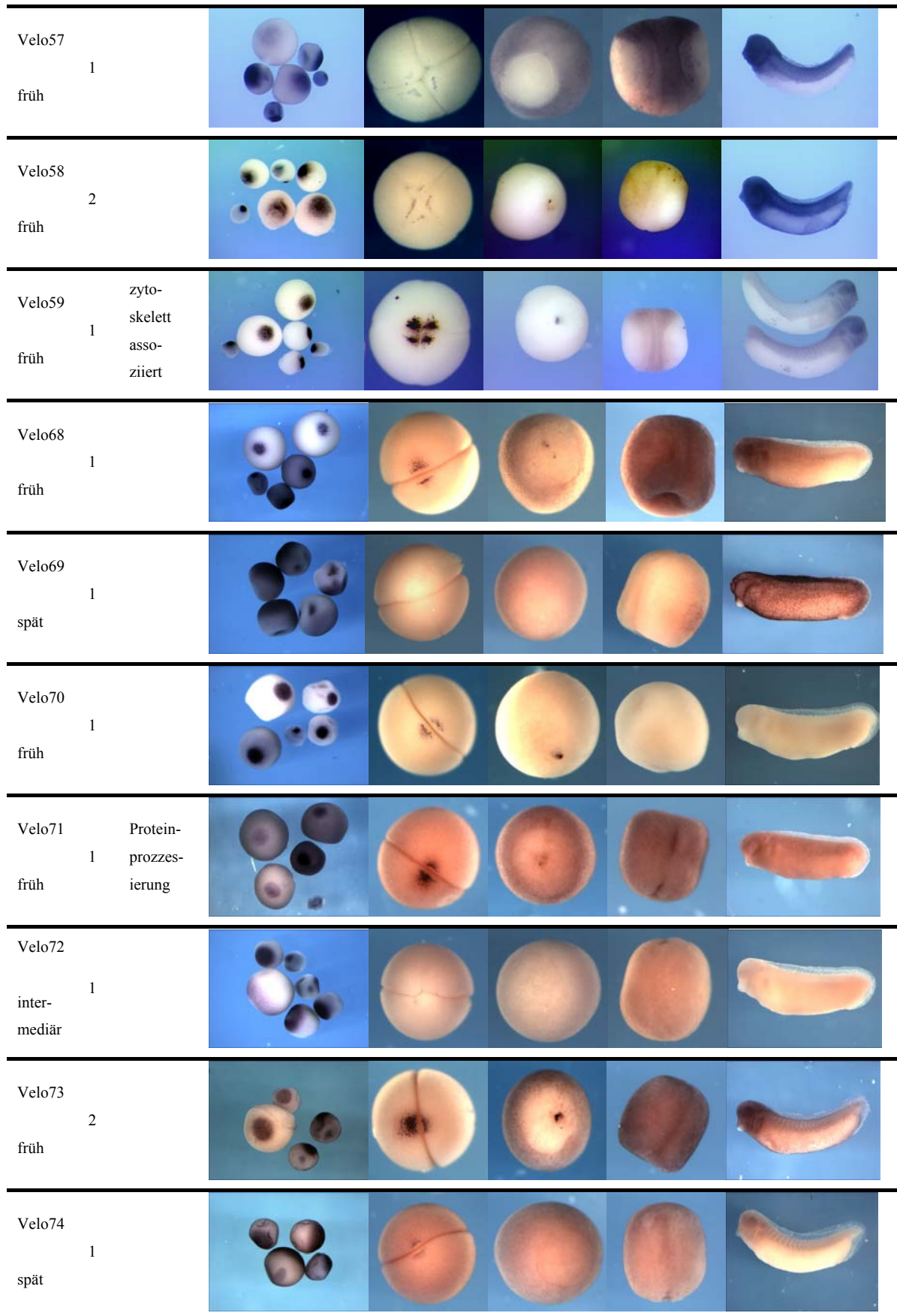
Die Tabelle gibt jeweils die Nummer bzw. Name des identifizierten Klons, den Lokalisationsweg, die Zahl dieser RNA entsprechenden identifizierten unabhängigen Klone, die Einordnung in eine Funktionsgruppe und die erhaltenen Expressionsdaten aus der whole mount *in situ* Hybridisierung an.

Name	Lok. weg	#	Funktion	Expression	Oozyten	Zweizellstad.	Gastrula	Neurula	Schwanz-knospenstad.
XDead end spät		18	RNA- Binde- protein						
XGlk spät		10	Fettstoff- wechsel						
Velo5 spät		4	Vesikel- transport						
Velo6 spät		4							
Velo7 spät		5	Stoff- wechsel- enzym						
Velo8 spät		6	Fett- stoff- wechsel						
Velo9 spät1		1							

Velo11 spät	4	RNA- DNA Binde- Protein					
Velo12 spät	7						
Velo13 spät	1	Signal- trans- duktion					
Velo14 spät	1	Protein- kinase					
Velo16 spät	1						
Velo17 spät	1						
Velo18 spät	2						
Velo19 spät	1	hypo- thet- isches Protein					
Velo20 spät	2						
Velo21 spät	2						

Velo24 spät	1	Vesikel- transport					
Velo26 spät	1						
Velo27 spät	1						
Velo28 spät	1						
Velo29 spät	1	Rezeptor protein					
Velo31 spät	2						
Velo39 inter- mediär	2	Fett- stoff- wechsel					
Velo40 inter- mediär	1	Protein- kinase					
Velo44 früh	5						
Velo45 früh	4	DNA/ RNA Binde- protein					

Velo46	1	zyto- skelett asso- ziiert					
Velo47	1						
Velo48	3						
Velo49	1						
Velo50	2	Protein- prozess- ierung					
Velo51	1						
Velo52	1						
Velo53	1						
Velo55	1						
Velo56	1	Vesikel- trans- port					







## 7.2 Nukleotid- und Aminosäuresequenz des XGlk (Kl 22) Klons.

Die aus der cDNA Sequenz des Transkriptes XGlk (Kl 22) (KH9) abgeleitete Aminosäuresequenz des offenen Leserasters ist unterhalb der Nukleotidsequenz dargestellt. Die Positionszahlen der Nukleotidsequenz sind am linkem Rand, die der Aminosäuresequenz am rechten Rand dargestellt. Durch Fettdruck hervorgehoben ist das Startkodon und Stopkodon. Die in der vorhergesagten Proteinsequenz identifizierte Glycerolkinase Domäne ist grau unterlegt.

1	CCA CGC GTC CGG TAA CAG TGT GCT GCT GAC AGT <b>ATG</b> GCC GCG TCC AAC	
		<b>m</b> a a s n 6
49	AGA GTT ATT CTG GGA CCT CTG GTG GGA GCC ATT GAC CAA GGA ACG AGT	
	r v i l g p l v g a i d q g t s	22
97	TCG ACA CGA TTT CTG GTT TTT AAT GCA AAA ACA GCA GAA CTG CTA AGC	
	s t r f l v f n a k t a e l l s	38
145	CAC CAT CAA GTA GAA ATC AAA CAA AAG TTT CCA AAA GAA GGA TGG GTA	
	h h q v e i k q k f p k e g w v	54
193	GAG CAA GAT CCA AAG GAA ATT TTA CGG TCT GTT TAT GAA TGT GTA GAG	
	e q d p k e i l r s v y e c v e	70
241	AAG ACG TGT GAG AAG CTG ACC CAA CTA AAC ATT GAC ATC ACA AAT ATC	
	k t c e k l t q l n i d i t n i	86
289	AAA GCA ATT GGA GTC AGT AAC CAA AGG GAA ACA ACT GTG GTG TGG GAC	
	k a i g v s n q r e t t v v w d	102
337	AAG ACA ACA GGA GAG CCT CTG TAC AAT GCT ATT GTT TGG CTA GAT TTG	
	k t t g e p l y n a i v w l d l	118
385	AGA ACA CAA TCA ACT GTA GAA CGA CTT TTA AAA AGA ATT CCA GGC AAA	
	r t q s t v e r l l k r i p g k	134
433	AAT AAG AAT TTT TTC AAG AGT CGG ACT GGT CTT CCA CTT AGC ACT TAC	
	n k n f f k s r t g l p l s t y	150
481	TTC AGT GCA GTG AAA ATT CGA TGG CTT CTA GAC AAT GTG GAA GAG ATT	
	f s a v k i r w l l d n v e e i	166
529	AGA CAT GCT GTT TCA GAG GGA AGA GCA ATG TTT GGA ACA GTT GAT TCC	
	r h a v s e g r a m f g t v d s	182
577	TGG ATC ATT TGG AGT CTT ACT GGT GCA AAG AAT GGA GGG GTG CAT TGT	
	w i i w s l t g a k n g g v h c	198
625	ACA GAT GTG ACC AAT GCC AGC AGA ACA ATG CTG TTT AAT ATT CAT ACA	
	t d v t n a s r t m l f n i h t	214
673	TTG GAA TGG GAC ACA GAG CTC TGC CAG TTT TTT GAT ATA CCT ATG GAA	
	l e w d t e l c q f f d i p m e	230
721	TTA TTG CCA AAA GTG AGA AGT TCA TCA GAG ATC TAC GGT CTT ATG AAA	
	l l p k v r s s s e i y g l m k	246
769	ATC TGT CCT AGC CTG AAG TCT GGA GCT TTG ACT GGA GTT CCA ATA TCT	
	i c p s l k s g a l t g v p i s	262
817	GGG TGT TTA GGA GAC CAG TCA GCT GCT TTA GTA GGA CAA ATG TGT TTC	
	g c l g d q s a a l v g q m c f	278
865	CAA GAT GGA CAA GCT AAA AAT ACA TAT GGT ACA GGC TGC TTT TTG CTG	
	q d g q a k n t y g t g c f l l	294

913	TGC AAC ACA GGC TCA AAG CCT GTG CTC TCT GAC CAT GGC CTT TTG ACA	
	c n t g s k p v l s d h g l l t	310
961	ACT GTT GCT TAC AAG CTA GGA AGG GAT ACA CCT GCA TGT TAT GCC CTC	
	t v a y k l g r d t p a c y a l	326
1009	GAG GGT TCA GTT GCC ATA GCA GGA GCA GTA GTA CGC TGG TTG AGA GAC	
	e g s v a i a g a v v r w l r d	342
1057	AAT CTT GGA ATT GTG AAG ACT ACT GAG GAA GTA GAA AAA CTC GCT GCT	
	n l g i v k t t e e v e k l a a	358
1105	GAA GTT GGG ACG TCA TAT GGC TGC TAC TTT GTT CCT GCA TTT TCA GGT	
	e v g t s y g c y f v p a f s g	374
1153	TTA TAC GCT CCC TAT TGG GAG CCG AGT GCC AGA GGT ATC ATC TGT GGC	
	l y a p y w e p s a r g i i c g	390
1201	CTC ACC CAG TTT ACA AAC AGA AAC CAT ATT GCA TTT GCT GCT CTT GAA	
	l t q f t n r n h i a f a a l e	406
1249	GCT GTG TGT TTC CAG ACT AGA GAG ATT CTG GAT GCT ATG AAC CAA GAT	
	a v c f q t r e i l d a m n q d	422
1297	TGT GGC ATT CCT CTC AAT CAA CTT CAG GTT GAT GGG GGT ATG ACA AGC	
	c g i p l n q l q v d g g m t s	438
1345	AAC AAA ATC CTA ATG CAG TTG CAG GCT GAT ATA CTG TGC ATT CCA GTA	
	n k i l m q l q a d i l c i p v	454
1393	GTG AAA CCA TCC ATG CCT GAA ACA ACT GCA CTG GGT GCT GCT ATG GCT	
	v k p s m p e t t a l g a a m a	470
1441	GCA GGC GCT GCT GAA GGT GTT GGC GTC TGG AGC CTA AAT CCT GGA GAT	
	a g a a e g v g v w s l n p g d	486
1489	TTA ACT GCT GTA ACA TGT GAA CGG TTT GAA CCA CAA ATC AAC CCA GAA	
	l t a v t c e r f e p q i n p e	502
1537	GAA AGT GAA TTT CGA TAT GCT AGA TGG AAA AAG GCA GTG TTG AAA TCA	
	e s e f r y a r w k k a v l k s	518
1585	ATG GAC TGG GAA TCA GCA GAG CCT ACC TCC AAT GGA AAT GGT GAC TGT	
	m d w e s a e p t s n g n g d c	534
1633	AGT ATC TTC TGT AGT CTT CCT CTG GGG CTT TAT ATA GTG AGT AGC ATG	
	s i f c s l p l g l y i v s s m	550
1681	GTA TTA TTA ATC GGA GCA AAG TAC ATC TCA GGT CTT AAT AAA <b>TAA</b> CCA	
	v l l i g a k y i s g l n k -	563
1729	TTC ATG GAC GTC TGC TCT TTT TCG GCC ACT GGT TTT ATT GAA TTC TTA	
1777	TGT TGC CCA TAA GAA GAT ATA AAT TAC TGC TGT GAA CTG CTT CAT GAC	
1825	AGA TGG AAA ATG ACG TGC AAG GGT AGA ATG ACG GAA ACC CGC CAT TTA	
1873	ATT ACA CTG CTT CTC TGT CCA GTA ATC GGT GAG AAG GAC AAT TCC TGT	
1921	GCA ACA CTT GTC GCC ATG TTT GTG AAC TGG ATG CTG CAA CCA ATC TCT	
1969	CTG CTG GTC ATA TGT TCC TGA ATC ATC CTT AAC TAT GGG AAG GAA GAG	
2017	GTT TTA AAT AAG TAG ATT GCT CAT TCA TGT CTT AAA AGG ACT GAC TTG	
2065	CAC TTT GGA GAT TAT AAA TCT CCT CAG AAT TAT TCA GTT ACA TTT TTC	
2113	AGA AAT GTA TTG ATA AAA CAT GTA CAG GGG TTT TTG AAG GTT TTT TTT	
2161	CTT TTC AAT TTT AAA TGA ATG CAC ATT TTG TTT ATA GTA AAA TCA ATT	
2209	CTA ACT TAA TTT TTT TTA AAT GCA AAG GGT AAA TAA TGA AAT TAA TTT	
2257	TAT TTA AAG AAA GTC ACC ATT TTT GTT GCG GTT CTT TTG CAT GCA CCA	
2305	TTT CTA CTA TGC TCT GTG CTT ACT GTT GTC TGT AGT CTT GTT ATT GGA	
2353	GCG CCC AAT AGA ATT AGC ACA GTG TTT CAC CAA AAT AAT CTA TAA TAC	
2401	AAA TGA TCA CAA CCA CTG GTT TTC TAA AGG AAT TCA AAG AAA TAT GTT	
2449	TTT CAT ACC TTG TTG CAG TCA TTC TTC ACA AAT TCT CAA GGC TTT TTT	
2497	CAA GTC CTT TTT ATT TCC TTT GTG GTA ATC ATG CAG AAA TCT TCT ATT	
2545	AAA AAA AAT TTG GGG CAA AAA AAA AAA AA	

### 7.3 Nukleotid- und Aminosäuresequenz des XDead end (KI 20) Klons.

Die aus der isolierten cDNA (KH7) abgeleitete Aminosäuresequenz ist unterhalb der Nukleotidsequenz angegeben. Die Nukleotidposition ist am linken Rand und die Aminosäureposition am rechten Rand dargestellt. Start- und Stopkodon sind jeweils durch Fettdruck hervorgehoben. Die für ein RNA Bindeprotein charakteristische RRM („RNA recognition motif“) Domäne ist grau unterlegt.

1	TTC	GGC	ACG	AGA	GCT	GCT	TTT	CTT	AAG	GGA	GAT	TTC	AAA	CGC	ACA	GGG	AAA	
52	<b>ATG</b>	GAG	CTG	TCA	GAC	GAG	CAG	AAG	AGT	CAG	ATG	TGG	ATC	AAT	TCC	GTC	AAT	
	<b>m</b>	e	l	s	d	e	q	k	s	q	m	w	i	n	s	v	n	17
103	AGT	GAA	AAC	AAA	GAA	GCC	CTC	CTT	GCA	TGG	GTT	AAG	GAA	ACT	GGA	ATT	GAA	
	s	e	n	k	e	a	l	l	a	w	v	k	e	t	g	i	e	34
154	TTG	GTT	CAA	ATT	AAT	GGT	CAG	CGG	AAA	TAT	GGT	GGT	CCA	CCT	CCA	GGA	TGG	
	l	v	q	i	n	g	q	r	k	y	g	g	p	p	p	g	w	51
205	ATT	GGT	AAT	GCT	CCA	GTC	AGT	GGG	TCA	GAG	GTT	TTT	ATT	GGT	AAA	ATA	CCA	
	i	g	n	a	p	v	s	g	s	<b>e</b>	<b>v</b>	<b>f</b>	<b>i</b>	<b>g</b>	<b>k</b>	<b>i</b>	<b>p</b>	68
256	CAA	GAT	ATT	TAT	GAA	GAC	AAA	CTA	ATT	CCG	CTT	TTC	CAG	AGT	GTT	GGA	AAA	
	<b>q</b>	<b>d</b>	<b>i</b>	<b>y</b>	<b>e</b>	<b>d</b>	<b>k</b>	<b>l</b>	<b>i</b>	<b>p</b>	<b>l</b>	<b>f</b>	<b>q</b>	<b>s</b>	<b>v</b>	<b>g</b>	<b>k</b>	85
307	CTG	TAT	GAG	TTT	CGT	CTG	ATG	ATG	ACA	TTT	AGT	GGC	CTG	AAT	CGA	GGG	TTC	
	<b>l</b>	<b>y</b>	<b>e</b>	<b>f</b>	<b>r</b>	<b>l</b>	<b>m</b>	<b>m</b>	<b>t</b>	<b>f</b>	<b>s</b>	<b>g</b>	<b>l</b>	<b>n</b>	<b>r</b>	<b>g</b>	<b>f</b>	102
358	GCT	TAT	GCT	CGC	TAT	ATA	AGC	AGA	CGG	CAG	GCT	ATC	AGC	GCT	ATT	ATG	TCT	
	<b>a</b>	<b>y</b>	<b>a</b>	<b>r</b>	<b>y</b>	<b>i</b>	<b>s</b>	<b>r</b>	<b>r</b>	<b>q</b>	<b>a</b>	<b>i</b>	<b>s</b>	<b>a</b>	<b>i</b>	<b>m</b>	<b>s</b>	119
409	CTT	AAC	GGT	TTT	GAG	ATA	ACA	AAG	GGA	TGT	TGT	ATT	GTG	GTC	TGT	CGG	AGC	
	<b>l</b>	<b>n</b>	<b>g</b>	<b>f</b>	<b>e</b>	<b>i</b>	<b>t</b>	<b>k</b>	<b>g</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>i</b>	<b>v</b>	<b>v</b>	<b>c</b>	<b>r</b>	<b>s</b>	136
460	ACA	GAA	AAA	AGT	GAG	CTT	GCG	CTG	GAC	GGG	CTT	CCT	GGT	AAT	TTT	GAT	GAA	
	<b>t</b>	<b>e</b>	<b>k</b>	<b>s</b>	<b>e</b>	l	a	l	d	g	l	p	g	n	f	d	e	153
511	AAC	ATG	CTG	AAA	AAT	GTT	TTG	GAT	GAG	GTG	ACT	TCA	GGA	GTG	TCT	TCA	ATT	
	n	m	l	k	n	v	l	d	e	v	t	s	g	v	s	s	i	170
562	TCT	TTG	CAT	CCA	AGT	CCC	ACA	AAA	GAG	AGC	CAG	GTT	TTG	GCT	GTA	GTG	AAG	
	s	l	h	p	s	p	t	k	e	s	q	v	l	a	v	v	k	187
613	TAC	GAC	TCA	CAC	CGG	GCA	GCT	GCA	ATG	GCT	AAA	AAG	ACC	CTT	TGT	GAA	GGG	
	y	d	s	h	r	a	a	a	m	a	k	k	t	l	c	e	g	204
664	TCT	CCC	ATT	CTT	CCT	GGG	CTT	CCT	CTT	ACT	GTA	AAT	TGG	CTG	AAA	ACA	GAC	
	s	p	i	l	p	g	l	p	l	t	v	n	w	l	k	t	d	221
715	ATG	CGA	CAG	AAG	CTT	CGT	AGC	ACT	GAT	AAG	CTC	CAG	CAG	ACC	AAA	GAC	CTA	
	m	r	q	k	l	r	s	t	d	k	l	q	q	t	k	d	l	238
766	TCT	CCA	TTG	CCT	CTG	CTT	TAT	ACT	GAC	CGC	CCA	GAT	CTT	CCA	AAA	GAG	ACC	
	s	p	l	p	l	l	y	t	d	r	p	d	l	p	k	e	t	255
817	CTG	CTA	AGT	GCT	GTC	GGC	TGC	CTT	AAT	ATG	CTG	TGC	CAG	GAG	ATG	AAG	CTG	
	l	l	s	a	v	g	c	l	n	m	l	c	q	e	m	k	l	272
868	GGC	CGT	CCT	GTC	TTC	TTA	ATA	AAG	CTT	TTT	AGC	GTA	ACC	TCA	TTT	GGA	TGG	
	g	r	p	v	f	l	i	k	l	f	s	v	t	s	f	g	w	289
919	ATT	CGA	TTT	TGG	TAC	CAA	GTA	GTC	ATA	CCA	ACG	TAC	CCA	ACC	CCA	TTT	TGT	
	i	r	f	w	y	q	v	v	i	p	t	y	p	t	p	f	c	306
970	GGC	TAT	GCC	TGG	ATG	ATT	GGT	GAA	AAT	CTG	GAG	CTA	AAT	GAA	AAA	TAT	GAG	
	g	y	a	w	m	i	g	e	n	l	e	l	n	e	k	y	e	323
1021	CAT	GCA	AGG	CAA	GTT	GTT	GCT	ATG	AAG	ATC	CTA	TCT	GCT	CTT	GGG	TAC	ATT	
	h	a	r	q	v	v	a	m	k	i	l	s	a	l	g	y	i	340
1072	CCA	GAT	TTC	TCA	CTG	GGA	GAC	GTC	ACT	GCA	AGG	AAT	GCC	CTG	<b>TGA</b>	TTG	TTT	
	p	d	f	s	l	g	d	v	t	a	r	n	a	l	-			354



## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Tomas Pieler für die interessante Themenstellung und die Betreuung dieser Arbeit.

Für die freundliche Übernahme des Korreferats bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wimmer.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Prof. Dr. T. Pieler möchte ich für die stete Hilfsbereitschaft, wertvollen Tips und Diskussionen danken. Ein besonderer Dank gilt den jetzigen sowie auch ehemaligen Mitgliedern der „Transportgruppe“: Dr. Susanne Loop, Jana Löber, Patrick Arthur, Katsiaryna Tarbashevich, Dr. Katja Koebernick, Katja Ditter, Gudrun Kracht, Ines Eckhardt sowie Dr. Maike Claußen, Dr. Jörg Wischnewski und Christian Heinen.

Ein großes Dankeschön geht an die Mitarbeiter des Transkriptomanalyse Labors: Dr. Mathias Katzer, Dr. Jobst Landgrebe, Dr. Bettina Spielbauer, Dr. Rainer Hitt, Katharina Nau und Christiane Lach für die stete Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Ich danke meiner Familie, meinen Eltern, Großeltern und Geschwistern, und meinem Freund Andreas Stasch, für die ständige liebevolle Unterstützung und Zuwendung, die für eine erfolgreiche Durchführung dieser Arbeit unerlässlich waren.

# LEBENS LAUF

## **Katja Horvay**

Geboren am 05.09.1976 in Lüz

Eltern: Gerd Horvay, Mechaniker  
Annelie Horvay, geb. Wahl, Lehrerin

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schulische Ausbildung:**

1983–1990 Polytechnische Oberschule Karbow  
1990–1995 Gymnasium Lüz  
06.95 Abitur

### **Universitäre Ausbildung:**

10.95 Immatrikulation an der Georg-August-Universität  
Göttingen

04.97 Diplomvorprüfung in Biologie

02.00 Diplomprüfung in Biologie

05.00–02.01 Diplomarbeit im Albrecht-von-Haller Institut;  
Abteilung Entwicklungsphysiologie der Pflanze

seit 05.01 Anfertigung der Dissertation im Zentrum für  
Biochemie und Molekularbiologie, Abteilung  
Entwicklungsbiologie

Göttingen, den 14.03.05