

**Analyse der differentiellen Expression von  
Transportfaktoren und deren Funktion bei dem  
nukleocytoplasmatischen Transport von TFIIIA**

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

vorgelegt von  
Jörg Wischnewski  
aus Hannover

Göttingen 2002

D7

Referentin: Prof. Dr. M. Schäfer

Korreferentin: Prof. Dr. C. Gatz

Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2002

---

## INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I	
Abbildungsverzeichnis	VI	
Tabellenverzeichnis	VII	
Abkürzungsverzeichnis	IX	
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Mechanismen des richtungsgebundenen nukleocytoplasmatischen Transports	2
1.2	Signalsequenzen vermitteln den nukleocytoplasmatischen Transport	5
1.3	Transportrezeptoren der Karyopherin $\beta$ Familie	5
1.4	Transportadapter, eine Brücke zwischen Substrat und Rezeptor	7
1.5	Karyopherin $\alpha$ im nukleocytoplasmatischen Transport	8
1.6	Differentielle Expression und Bindungsaffinität von Karyopherin $\alpha$	8
1.7	5S RNA Transport	9
1.8	Ziel der Arbeit	11
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>12</b>
2.1.1	Versuchstiere	12
2.1.2	Bakterienstämme	12
2.1.3	Zelllinien	12
2.1.4	Genbanken	13
2.1.5	Plasmide aus anderen Laboratorien	13
2.1.6	Vektoren	13
2.1.7	Oligonukleotide	14
2.1.8	Enzyme und Reaktionssysteme (Kits)	17
2.1.9	Antikörper	17
2.1.10	Radioisotope	18
2.1.11	Medien und Lösungen	18
2.1.12	Chromatographiematrices	20
2.1.13	Chemikalien	20
2.1.14	Geräte	21
<b>2.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>23</b>

---

2.2.1	DNA-Methoden	23
2.2.1.1	Plasmidpräparation im präparativen Maßstab	23
2.2.1.2	Plasmidpräparation im analytischen Maßstab	23
2.2.1.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren durch UV-Spektroskopie	24
2.2.1.4	Agarosegelelektrophorese	24
2.2.1.5	Manipulation von DNA	25
2.2.1.6	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen	25
2.2.1.7	Dephosphorylierung von Vektoren	25
2.2.1.8	Einfügen von Schnittstellen	25
2.2.1.9	Ligation	26
2.2.1.10	Reinigung von präparativen PCR-Ansätzen	26
2.2.1.11	Reisolierung von DNA-Fragmenten mit TaKaRa Recochips	27
2.2.1.12	Sequenzierung von DNA	27
2.2.1.13	DNA-Fällung mit Ethanol	28
2.2.2	RNA-Standardmethoden	28
2.2.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Xenopus</i> Embryonalstadien	28
2.2.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus adulten Geweben und Organen	29
2.2.2.3	Total-RNA Präparation von embryonalem Augengewebe	29
2.2.2.4	Poly-A <sup>+</sup> -RNA Isolierung	31
2.2.2.5	Northern Blot	31
2.2.2.6	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	32
2.2.2.7	Smart RACE-Ready cDNA	33
2.2.2.8	<i>In vitro</i> -Synthese markierter RNA-Sonden	33
2.2.2.9	Aufreinigung synthetischer RNA mit "RNeasy Mini Kits"	34
2.2.2.10	Aufreinigung synthetischer RNA mit Sephadex-G50 Säulen	34
2.2.3	Protein-Standardmethoden	35
2.2.3.1	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	35
2.2.3.2	Expression von GST-Fusionsproteinen	36
2.2.3.3	TFIIIA Induktion	37
2.2.3.4	Präparation von Glutathion Agarose und Bindungsprotein	37
2.2.3.5	„Pull-down assay“ für <i>in vitro</i> translatierte Proteine	37
2.2.3.6	Fluoreszenzdetektion von transient transfizierten HeLa Zellen	37
2.2.4	Bakterien und Zellkultur	38

---

2.2.4.1	Elektrokompetente Zellen	38
2.2.4.2	Elektrotransformation	38
2.2.4.3	alpha-Komplementation	39
2.2.4.4	Gewinnung von HeLa Zellen für transiente Transfektion	39
2.2.4.5	Transiente Transfektion von HeLa Zellen durch Elektroporation	39
2.2.4.6	Transiente Transfektion von HeLa Zellen durch Lipofektion	40
2.2.5	Erstellung einer Lamda-cDNA-Bank aus embryonalem Augengewebe	40
2.2.6	Arbeiten mit Phagen	42
2.2.6.1	Phagenfraktionierung	42
2.2.6.2	Phagenplattierung zur Isolierung von Einzelplaques	43
2.2.6.3	Erstellen einer konzentrierten Phagenlösung	43
2.2.6.4	Exzision des Phageninserts	43
2.2.6.5	Bestimmung des Phagentiters	44
2.2.7	Gewinnung von <i>Xenopus laevis</i> Embryonen	45
2.2.7.1	Stimulation der Eiablage, Befruchtung und Gewinnung von Embryonalstadien	45
2.2.7.2	Fixierung von <i>Xenopus</i> Embryonen	46
2.2.8	„Whole mount“ <i>in situ</i> Hybridisierung	46
2.2.8.1	Rehydrieren der Embryonen	46
2.2.8.2	Proteinase K-Behandlung	47
2.2.8.3	Refixierung und Hybridisierungsreaktion	47
2.2.8.4	Waschen	48
2.2.8.5	Antikörper-Inkubation	48
2.2.8.6	Farbentwicklung	49
2.2.8.7	Abstoppen der Färbung und Auswertung	49
2.2.8.8	Gewebeschnitte mit einem Vibratom	50
2.2.8.9	Maschinelle „Whole mount“ <i>in situ</i> Hybridisierung	51
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>55</b>
<b>3.1</b>	<b>Der Transkriptions-Faktor IIIA</b>	<b>55</b>
3.1.1	Vorarbeiten zur Eingrenzung der Kernlokalisierungssignalsequenz von dem Transkriptions-Faktor IIIA	55
3.1.2	Weitere Arbeiten zur Eingrenzung der Kerntransportsignalsequenzen	56
3.1.3	Analyse von immunfluoreszenzmarkierten TFIIIA Mutanten in HeLa Zellen	61
<b>3.2</b>	<b>Definition einer neuen Synexpressionsgruppe</b>	<b>62</b>

---

3.2.1	Karyopherin $\beta$ 3	62
3.2.2	Isolierung von Karyopherin $\beta$ 3	62
3.2.3	Die nukleocytoplasmatische Verteilung von <i>Xenopus</i> Karyopherin $\beta$ 3 in transfizierten HeLa Zellen	63
3.2.4	Karyopherin $\beta$ 3 ist ein differentiell exprimierter Transportfaktor	64
3.2.5	Ribosomale Proteine und ihre Transportfaktoren definieren eine neue Synexpressionsgruppe	66
<b>3.3</b>	<b>Durchmusterung einer cDNA Bank aus embryonalem Augengewebe</b>	<b>69</b>
3.3.1	Eine cDNA Bank aus embryonalem Augengewebe	69
3.3.2	Statistische Übersicht	70
3.3.3	Sam68, ein Protein, welches möglicherweise am Export von RNA mit CTE oder RRE beteiligt ist	76
3.3.4	Eingrenzung der Kandidatenklone auf putative Ran bindende Proteine	77
3.3.5	Karyopherin $\alpha$ 3 ist ein neues Karyopherin $\alpha$ Homolog	80
<b>3.4</b>	<b>Isolierung der in <i>Xenopus</i> neuen Karyopherin <math>\alpha</math> Homologen <math>\alpha</math>4 und <math>\alpha</math>5</b>	<b>82</b>
3.4.1	<i>In vitro</i> Translation der Konstrukte	84
<b>3.5</b>	<b>TFIIIA und Karyopherin <math>\alpha</math></b>	<b>85</b>
3.5.1	RT-PCR Expressionsanalyse von <i>Xenopus laevis</i> Karyopherin $\alpha$ Varianten im Vergleich zu dem Zinkfingerprotein TFIIIA	85
3.5.2	Expressionsanalyse mit der „whole mount“ <i>in situ</i> Methode der Karyopherin $\alpha$ Varianten im Vergleich zu TFIIIA	89
3.5.3	TFIIIA interagiert mit Karyopherin $\alpha$ , aber nicht mit RanBP7, Karyopherin $\beta$ , Karyopherin $\beta$ 3 oder Transportin	92
3.5.4	Interaktionsstudien von verschiedenen Karyopherin $\alpha$ Varianten	94
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>98</b>
4.1	Die Minimalstruktur der zwei NLS von TFIIIA	98
4.2	TFIIIA bindet spezifisch an Karyopherin $\alpha$ 1 und $\alpha$ 2	100
4.3	Definition der Karyopherin $\beta$ 3 Synexpressionsgruppe	103
4.4	Die Karyopherin $\alpha$ Varianten	104
4.5	Durchmusterung einer cDNA Bank aus embryonalem Augengewebe	106
4.6	Ausblick	109
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>111</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>112</b>

---

<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>120</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>152</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>153</b>

---

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Grundprinzip des nukleocytoplasmatischen Transports.	3
Abbildung 2: Modell zum nukleocytoplasmatischen Transport von 5S RNA.	10
Abbildung 3: Analyse zur NLS Identifizierung von N-terminalen Zinkfingern.	58
Abbildung 4: Analyse zur NLS Identifizierung von C-terminalen Zinkfingern.	59
Abbildung 5: Deletionsmutanten zur Eingrenzung der Kernlokalisierungssignalsequenz.	60
Abbildung 6: Subzelluläre Lokalisation der transportkompetenten Minimalstrukturen von TFIIIA in somatischen Zellen.	62
Abbildung 7: Vergleich von <i>Xenopus</i> Karyopherin $\beta 3$ mit anderen verwandten Proteinen.	63
Abbildung 8: Transfektion von Hela-Zellen mit <i>Xenopus</i> Karyopherin $\beta 3$ .	64
Abbildung 9: „Whole mount“ <i>in situ</i> Hybridisierung mit <i>Xenopus</i> Karyopherin $\beta 3$ antisense RNA.	65
Abbildung 10: Vergleichende Expressionsmusteranalyse.	68
Abbildung 11: Schematische Übersicht der Expressions- und Sequenzdaten der Durchmusterung einer cDNA-Bank aus embryonalem Augengewebe.	71
Abbildung 12: Auszug einer Dialign Analyse der abgeleiteten Sequenz des 3p4g2 Klons.	78
Abbildung 13: Sequenzvergleich von <i>Xenopus</i> Karyopherin $\alpha 3$ mit dem humanem $\alpha 1$ Homolog.	81
Abbildung 14: Phylogenetischer Stammbaum der Karyopherin $\alpha$ Proteinfamilie.	82
Abbildung 15: Sequenzvergleich von <i>Xenopus</i> Karyopherin $\alpha 4$ mit dem humanen Karyopherin $\alpha 4$ Homolog.	83
Abbildung 16: Sequenzvergleich von <i>Xenopus</i> Karyopherin $\alpha 5.1$ und $5.2$ mit dem humanen Karyopherin $\alpha 7$ Homolog.	84
Abbildung 17: Analyse der Karyopherin $\alpha 1$ , $\alpha 3$ , $\alpha 4$ und $\alpha 5$ Primärklone.	85
Abbildung 18: Vergleichende Expressionsanalyse der Karyopherin Varianten $\alpha 1$ , $\alpha 2$ , $\alpha 3$ , $\alpha 4$ , $\alpha 5$ und TFIIIA während der Oogenese.	86
Abbildung 19: Vergleichende Expressionsanalyse der Karyopherin Varianten $\alpha 1$ , $\alpha 2$ , $\alpha 3$ , $\alpha 4$ , $\alpha 5$ und TFIIIA während der frühen Embryonalentwicklung von <i>Xenopus laevis</i> .	87
Abbildung 20: Vergleichende Expressionsanalyse der Karyopherin Varianten $\alpha 1$ , $\alpha 2$ , $\alpha 3$ , $\alpha 4$ , $\alpha 5$ und TFIIIA in adulten Geweben von <i>Xenopus laevis</i> .	89

---

Abbildung 21 : Expressionsmusteranalyse mit der „whole mount“ <i>in situ</i> Technik zur räumlich-zeitlichen Auflösung in der Oogenese und den frühen Entwicklungsstadien von <i>Xenopus laevis</i> .	91
Abbildung 22 : Zur Interaktion verwendete GST-Fusionsproteine.	93
Abbildung 23 : TFIIIA interagiert mit Karyopherin $\alpha$ .	94
Abbildung 24 : Bakterielle Expression der GST-Fusionsproteine mit Nukleoplasmin und TFIIIA- $\Delta$ 56.	95
Abbildung 25 : Analyse der Karyopherin $\alpha$ Varianten.	96
Abbildung 26 : Bindungsanalyse von GST-TFIIIA- $\Delta$ 56 an verschiedene Karyopherin $\alpha$ Varianten.	96
Abbildung 27 : Die Aminosäuresequenz von TFIIIA.	98
Abbildung 28 : Die TFIIIA Kerntransportsignale überlappen mit der 5S RNA bindenden Domäne.	99
Abbildung 29 : Karyopherin $\beta$ 3 Sequenz.	121
Abbildung 30 : Nukleotidsequenz mit abgeleiteter Proteinsequenz der kodierenden Nukleotide von Karyopherin $\alpha$ 3 aus <i>Xenopus laevis</i> .	122
Abbildung 31 : Nukleotidsequenz mit abgeleiteter Proteinsequenz der kodierenden Nukleotide von Karyopherin $\alpha$ 4 aus <i>Xenopus laevis</i> .	123
Abbildung 32 : Nukleotidsequenz mit abgeleiteter Proteinsequenz der kodierenden Nukleotide von den Karyopherin $\alpha$ Varianten $\alpha$ 5.1 und $\alpha$ 5.2 aus <i>Xenopus laevis</i> .	124

---

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 : Standard Sequenzierprimer.	14
Tabelle 2 : TFIIA spezifische Primer mit eingefügten Schnittstellen.	14
Tabelle 3 : Karyopherin $\beta 3$ spezifische Sequenzierprimer.	14
Tabelle 4 : Primer für Transportfaktoren und transportassoziierte Proteine mit eingefügten Schnittstellen.	15
Tabelle 5 : Karyopherin $\alpha$ spezifische Sequenzierprimer.	16
Tabelle 6 : Sonstige Oligonukleotide.	16
Tabelle 7 : Exemplarisches Programm für eine maschinelle „whole mount“ <i>in situ</i> Hybridisierung.	53
Tabelle 8 : Primerkombinationen, Schnittstellen und Matrizen für die Klonierung von Zinkfingerfusionsmutanten.	57
Tabelle 9 : Verteilung der gefundenen Funktionsgruppen.	72
Tabelle 10 : Identifizierung homologer Sequenzen von Klonen der Karyopherin $\beta 3$ Synexpressionsgruppe und Klonen sonstiger Expressionsmuster.	75
Tabelle 11 : Tabellarische Auflistung der Kandidatengene.	79
Tabelle 12 : Mehrfach auftretende Proteine.	120
Tabelle 13 : Auszug aus der Rohdatentabelle zur Durchmusterung einer cDNA Bank aus embryonalem Augengewebe.	151
Tabelle 14 : Zur Gruppierung der Karyopherin $\beta 3$ Synexpressionsgruppe verwendete Vektoren.	151
Tabelle 15 : Zur Gruppierung von Genen mit anderen Expressionsmustern verwendete Vektoren.	151

---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
Cy3	Carboxymethylindocyanin
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DNA	„Desoxyribonucleic Acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
kb	Kilobasen
kd	Kilodalton
M	Molar
min	Minuten
NP-40	Nonidet P-40
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase „Chain Reaction“
pH	pondus Hydrogeni, Protonenaktivitätsexponent
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Ran	Ras related nuclear protein
RanBP	Ran Binding Protein
RNA	„Ribonucleic Acid“ (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
ssDNA	einzelsträngige Didesoxyribonukleinsäure
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tri(hydroxymethyl)aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
U	Unit, Einheit für Enzymaktivität
Upm	Umdrehungen pro Minute

---

UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-Indolyl- $\beta$ -D-galactosid

## 1 Einleitung

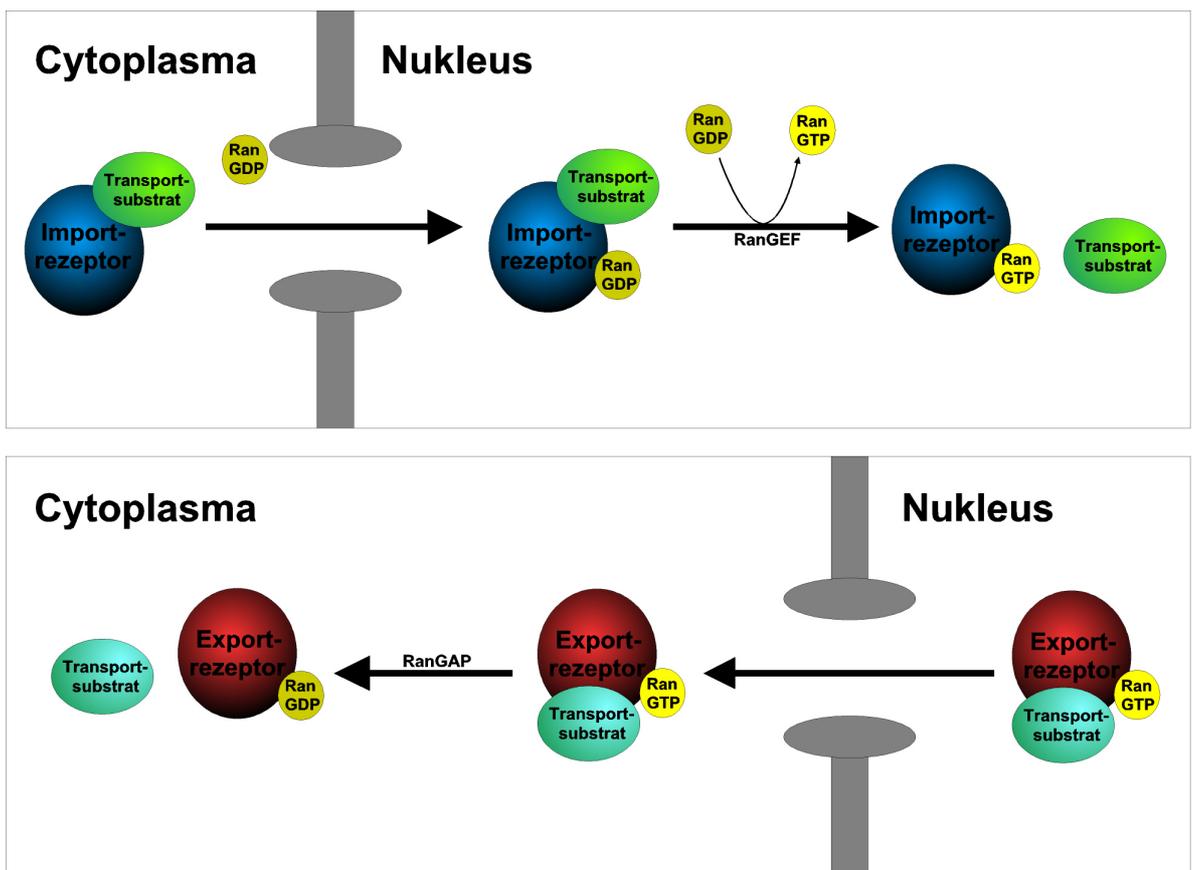
Die Eukaryontenzelle ist in verschiedene membranumhüllte Kompartimente unterteilt, die auch als Organellen bezeichnet werden. Jedes Organell besitzt eine bestimmte Funktion. Für die Ausübung seiner Funktion benötigt es spezifische Enzyme, Substrate oder Milieus, die es Enzymen erlauben, Stoffwechselreaktionen durchzuführen. Der Transport von kleinen Molekülen kann entweder durch Diffusion direkt durch die Membran oder ein Kanalprotein hindurch erfolgen oder wie bei der  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  Pumpe der Plasmamembran als aktiver energieverbrauchender Transportprozess. Die Energie für Transportprozesse wird wie im Fall von  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  Pumpen oder auch einigen  $\text{Ca}^+$  Pumpen durch Hydrolyse von ATP gewonnen. Andere Transportsysteme können die für den Transport benötigte Energie auch aus einem Ionengradienten beziehen. Die Synthese von neu gebildeten Proteinen erfolgt fast immer im Cytosol, dem die Organellen umgebenden allgemeinem Zellinnenraum. Eine Ausnahme bilden hier einige Proteine, die von den Ribosomen der Mitochondrien und Chloroplasten synthetisiert werden. Um den verschiedenen Organellen zur Verfügung zu stehen, müssen die Proteine transportiert werden, d. h., sie müssen selektiv in das Innere eines Organells und eventuell wieder hinaus gebracht werden. Generell werden zwei Transportwege von neu synthetisierten Proteinen verwendet, um in das Zielkompartiment zu gelangen. Einer führt vom endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat in die Lysosomen zur Zellmembran, oder zu verschiedenen sekretorischen Vesikeln. Dieser Transportweg beruht auf der selektiven Verschmelzung von Membranen und Transportvesikeln oder deren gerichteter Freisetzung. Hier wird das Transportsubstrat im Inneren des Vesikels gehalten und bei der Verschmelzung der Membranen in das Innere des Lumens oder den extrazellulären Raum freigesetzt. Die Signal- und Rezeptormoleküle für diese Transportprozesse müssen sich, um zugänglich zu sein, auf der Rezeptorseite der Kompartimentmembran befinden. Der zweite Transportweg führt durch das Cytosol und mündet direkt in den von nur einer Membran umgebenen Peroxysomen oder den durch eine Doppelmembran abgegrenzten Mitochondrien, Chloroplasten oder dem Zellkern. Für diesen Transportweg müssen die Transportsubstrate selbst eine Signalsequenz besitzen, welche dann von dem Transportsystem der selektiven Barriere des Zielkompartiments erkannt werden kann. Eine solche selektive Barriere stellt auch die Doppelmembran des Zellkerns dar, der in Eukaryonten den Ort der DNA Replikation, RNA Synthese und der Montage der ribosomalen Untereinheiten vom Cytoplasma abgrenzt. Die Ribosomenbiogenese ist ein komplexer Prozess, der mehrfache Passagen durch die Kernmembran erfordert. Zunächst muss die transkribierte mRNA in das

Cytoplasma transportiert werden. Dieser Prozess wird Export genannt. Dort findet im Fall von ribosomaler mRNA die Translation an den Orten der Proteinbiosynthese, den Ribosomen, statt. Auch andere Gruppen von RNA Molekülen wie z.B. die meisten U snRNAs (nicht U6) des Spliceosoms werden zunächst als Teil ihres Reifungsprozesses in das Cytoplasma exportiert. Nach dort erfolgter Modifizierung müssen sie wie auch die Proteine der ribosomalen Untereinheiten wieder in den Zellkern transportiert werden. Dieser Transportschritt aus dem Cytoplasma in das Nukleoplasma des Zellkerns wird als Import bezeichnet. Im Nucleolus erfolgt die Montage der ribosomalen Untereinheiten 40S und 60S, die dann exportiert werden. Im Cytoplasma bilden sie zur Proteinbiosynthese das 80S Ribosom aus.

### **1.1 Mechanismen des richtungsgebundenen nukleocytoplasmatischen Transports**

Der bidirektionale Transport von Makromolekülen zwischen dem Cytoplasma und dem Zellkern wird von der Kernpore vermittelt. Die Kernpore ist ein Komplex aus ca. 30 Proteinen in Hefe und 50-100 Proteinen in Vertebraten. Das Molekulargewicht wird auf 55 Megadalton in Hefe und 125 Megadalton in Vertebraten geschätzt. Ionen und kleinere Moleküle bis zu einer Größe von 50 kd können die Kernpore durch Diffusion passieren. Größere Moleküle werden aktiv und energieabhängig transportiert. Die Richtung des Transports wird durch einen Konzentrationsgradienten der kleinen GTPase Ran („Ras-related nuclear protein“, 25 kd) vorgegeben. Ran liegt im Cytoplasma in GDP gebundener Form vor. Im Nukleoplasma ist Ran-GTP die vorwiegend auftretende Form. Karyopherin  $\beta$  verwandte Importrezeptoren binden an das NLS präsentierende Transport-substrat und werden oft auch als Importine bezeichnet. Von Transportinen wird aufgrund ihres sauren Charakters angenommen, dass sie auch in den Export von Substraten involviert sein könnten. Der initiale Andockschritt an die Kernpore kann *in vitro* unabhängig von Ran-GDP vollzogen werden. Um in den Zellkern zu gelangen, wird jedoch Ran-GDP benötigt. Im Zellkern angekommen wird GDP durch den Nukleotidaustauschfaktor RanGEF gegen GTP ausgetauscht, und der Importkomplex zerfällt. Karyopherine, die den Export von Substraten vermitteln, werden auch Exportine genannt. Für die Bindung eines Transportfaktors an ein Exportsubstrat wird im Gegensatz zur Situation im Cytoplasma Ran-GTP benötigt. Auf der cytoplasmatischen Seite wird Ran-GTP vermittelt von RanGAP (GTPase aktivierendes Protein) zu Ran-GDP hydrolysiert und der Exportkomplex zerfällt (Übersicht in Görlich und Kutay, 1999; Mattaj

und Englmeier, 1998; Moore, 1998; Ohno *et al.*, 1998). Die RanGAP Aktivität wird durch das lösliche und Ran-GTP bindende Protein RanBP1 stimuliert. RanGAP1 ist entweder in unmodifizierter Form im Cytoplasma vorhanden, oder es wird modifiziert durch SUMO-1 („small ubiquitin-related modifier“) an die Kernpore gelenkt (Matunis *et al.*, 1998). Es bindet wahrscheinlich mit SUMO-1 an das Ran bindende Protein RanBP2 (Mahajan *et al.*, 1997). Die Ran-GTPase Aktivität kann auch durch RanBP2 induziert werden. Es ist zur Zeit noch nicht klar, ob RanBP1 alleine oder beide Proteine, RanBP1 und RanBP2, an der Induktion von RanGAP beteiligt sind. Die Lokalisation des Ran-GTP hydrolisierenden Komplexes an der Kernpore legt nahe, dass der Exportkomplex sofort bei dem Eintritt in das Cytoplasma dissoziiert. Die Ran-GTP Konzentration im Nukleoplasma wird durch den Nukleären Transport Faktor 2 (NTF2) aufrecht erhalten. NTF2 importiert Ran-GDP. Der Komplex dissoziiert nach Austausch von GDP gegen GTP durch RanGEF (Ribbeck *et al.*, 1998).



**Abbildung 1: Grundprinzip des nukleocytoplasmatischen Transports.**

Im oberen Kasten ist ein Modell des nukleocytoplasmatischen Imports dargestellt. Der Importrezeptor bindet das Substrat. Für die Passage der Kernpore wird Ran-GDP benötigt. Auf der nukleoplasmatischen Seite der Kernpore dissoziiert der Transportkomplex durch Austausch von Ran-GDP gegen Ran-GTP. Der untere Kasten zeigt ein Exportmodell. Die Ausbildung des Exportkomplexes benötigt Ran-GTP. Im Cytoplasma dissoziiert der Exportkomplex durch RanGAP Aktivierung der Hydrolyse von Ran-GTP zu Ran-GDP.

Ein weiterer Mechanismus des richtungsgebundenen Transports durch die Kernpore basiert vermutlich auf den verschiedenen Bestandteilen der Kernpore. Sowohl die repeathaltigen Nukleoporine der cytoplasmatischen Seite der Kernpore, Nup358 (RanBP2) und Nup214, als auch die Nukleoporine Nup153 und Nup98 der nukleoplasmatischen Seite, die Teil des Kernkorbes sind, binden an Karyopherin  $\beta$  (Moroianu *et al.*, 1995). In dem zentralen Teil der Kernpore sind Nup58, Nup54 und Nup45 lokalisiert und bilden den Nup62 Komplex aus. Für den Weg durch die Kernpore wurde eine ansteigende Affinität zu den Nukleoporinen Nup358, dem Nup62 Komplex und Nup153 festgestellt (Ben-Efraim und Gerace, 2001). Dieser zweite Mechanismus könnte eine hohe Bedeutung bei dem in letzter Zeit beschriebenen Ran unabhängigen Import haben. Ran unabhängiger Import kann in *in vitro* Importversuchen mit permeabilisierten HeLa Zellen mit der RanQ69L Mutante nachgewiesen werden, die nicht mehr in der Lage ist, GTP zu hydrolysieren. Der Inhibitor von kappa B alpha ( $I\kappa B\alpha$ ) kann unabhängig von cytosolischen Faktoren und unabhängig von Ran importiert werden (Sachdev *et al.*, 2000). Ein weiteres Beispiel stellt hier das ribosomale Protein L5 dar, von dem das C-terminale dritte NLS von cytosolischen Faktoren und Ran unabhängigen Import vermitteln kann. Der Import benötigt jedoch Zugriff auf die Kernpore. Bei dem Ran unabhängigen Import könnte eine Komponente der Kernpore den Transport vermitteln (Rudt und Pieler, 2001) und müsste somit auch die Richtung des Transportschritts bestimmen.

Dieser Mechanismus von Assoziations- und Dissoziationsschritten innerhalb der Kernpore mündet in ein Modell, das die generelle Durchquerung des zentralen wässrigen Kanals der Kernpore behandelt. Die Spezifität der Translokation wird durch Interaktionen niedriger Affinität zwischen den Transportrezeptoren und Komponenten des Kernporenkomplexes gewährleistet. Die Bewegung beruht im vorgeschlagenen Modell auf freier Diffusion (Rout *et al.*, 2000). Ein zweites Modell geht von einem maschenartigen Netzwerk Phenylalanin reicher Nukleoporine aus, die eine Passage hydrophiler Objekte verhindern, aber die Passage von Transportsubstraten erlauben, deren hydrophile Oberfläche durch Bindung von Transportrezeptoren verdeckt ist und die somit hydrophobe Partikel darstellen (Ribbeck und Görlich, 2001). Beide Modelle erlauben hohe Transportraten und ermöglichen einen energieunabhängigen Transport.

### 1.2 Signalsequenzen vermitteln den nukleocytoplasmatischen Transport

Der Transport von Proteinen in den Zellkern, auch Import genannt, wird Proteinen ermöglicht, welche eine Kerntransportsignalsequenz (NLS) besitzen. Klassische Signalsequenzen wie SV40-artige (simian virus 40 large T-Antigen) (PKKKRKV, (Kalderon *et al.*, 1984)) oder zweigeteilte Kerntransportsignalsequenzen wie beim Nucleoplasmin (KRPAATKKAGQAKKK, (Robbins *et al.*, 1991)) werden von Karyopherin  $\alpha$  auf der cytoplasmatischen Seite der Kernhülle gebunden. Nach Bindung an Karyopherin  $\beta$  wird der trimere Komplex unter Energieverbrauch auf die nukleoplasmatische Seite der Kernhülle transportiert, wo er durch Bindung von Ran-GTP zerfällt. Inzwischen sind weitere Signalsequenzen bekannt. RNA bindende Proteine werden über die 38 Aminosäuren umfassende M9-Sequenz innerhalb des hnRNP A1-Proteins (Pollard *et al.*, 1996), sowie über ein aus 40 Aminosäuren bestehendes Signal in hnRNP K, das KNS (hnRNP K nuclear shuttling domain, (Michael *et al.*, 1997)) in den Zellkern gelenkt. Bei dem U snRNP konnte gezeigt werden, dass das Sm-core-Protein und die Trimethylguanosinkappe als komplexes Kernlokalisierungssignal fungieren (Bordonne, 2000; Mattaj und De Robertis, 1985). Mit hoher Wahrscheinlichkeit existieren weitere, bisher unbekannte Kernlokalisierungssequenzen wie beim Transkriptionsfaktor TFIIIA, der die Kernlokalisierungssequenz innerhalb der Zinkfinger trägt (Rudt und Pieler, 1996 und diese Arbeit). Die HIV-1 Rev Aktivierungsdomäne stellt ein Exportsignal dar, welches vorwiegend aus Leucinen besteht und auch in der C-terminalen Sequenz von TFIIIA zu finden ist (Fischer *et al.*, 1995).

### 1.3 Transportrezeptoren der Karyopherin $\beta$ Familie

Die Superfamilie der Karyopherin  $\beta$  verwandten Proteine umfasst inzwischen 14 putative Transportfaktoren in Hefe, 9 mit Importfunktion und 4 mit Exportfunktion. Vom Mensch sind bisher 22 potentielle Familienmitglieder identifiziert worden. Das relative Molekulargewicht der Familienmitglieder reicht von 90 bis 130 kd, der isoelektrische Punkt ist in der gesamten Familie sauer, aber die Aminosäureidentität liegt bei weniger als 20 % (Übersicht in Ström und Weis, 2001). Für 7 Transportfaktoren konnte eine Importfunktion nachgewiesen werden, und 4 der Transportfaktoren sind nachweislich Exportrezeptoren. Für drei der Exportrezeptoren konnten einzelne spezifische Exportsubstrate identifiziert werden. CAS vermittelt den Export von Karyopherin  $\alpha$ . Exportin-4 vermittelt den Export des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 5A (eIF-5A). Die Exportin-4, eIF-5A

Interaktion benötigt hypusinierte Sequenzmotive und große Teile des eIF-5A Moleküls (Lipowsky *et al.*, 2000). Exportin-t ist Ran-GTP abhängig und transportiert t-RNA. Die Freisetzung des Exportsubstrates benötigt RanBP1 und RanGAP1, welche auf der cytoplasmatischen Seite der Kernpore lokalisiert sind (Kutay *et al.*, 1998). Für Exportin-1 wurde eine Vielzahl von Exportsubstraten nachgewiesen. So vermittelt Exportin-1 den Export von Proteinen mit leucinreichen Exportsignalen und verschiedenen Adapterproteinen.

Eine Importfunktion konnte für 7 der bisher beschriebenen Ran bindenden Proteine nachgewiesen werden. Importin-11 ist ein Ran abhängiger Importrezeptor des ubiquitinkonjugierten Enzyms UbcM2 (Plafker und Macara, 2000). Transportin-SR bindet Arginin-Serin reiche Importsubstrate (Kataoka *et al.*, 1999). Importin  $\beta$ 13 bindet spezifisch an den Translationsinitiationsfaktor eIF1a und weitere putative Importsubstrate wie hUBC9, ein dem Ubiquitin konjugierten E2 Enzym verwandtes Protein, oder MGN, das menschliche Homolog von Mago nashi, welches eine wichtige Rolle in der frühen *Drosophila* Embryogenese spielt. Die Ran-GTP Hydrolyse hat aber nicht automatisch die Freisetzung des Exportsubstrates eIF1a zur Folge. Die Freisetzung scheint die Bindung eines Importsubstrats zu benötigen (Mingot *et al.*, 2001). Eine Ausnahme im Mechanismus des nukleocytoplasmatischen Transports stellen die Proteine RanBP8, für das noch kein Substrat identifiziert wurde, und RanBP7 (Importin  $\beta$ 7) dar. Beide können an Karyopherin  $\beta$  binden (Görlich *et al.*, 1997). RanBP7 kann ribosomale Proteine alleine importieren, aber es ist im Komplex mit Karyopherin  $\beta$  auch in der Lage den Import von Histon H1 zu vermitteln (Jäkel *et al.*, 1999).

Einzelne Transportsubstrate können wahrscheinlich auch von verschiedenen Importrezeptoren transportiert werden. Verschiedene Importrezeptoren können *in vitro* den Import der ribosomalen Proteine L23a, S7 und L5 vermitteln. L23 bindet direkt an RanBP5 (humanes Karyopherin  $\beta$ 3) (Jäkel und Görlich, 1998; Yaseen und Blobel, 1997). Zwei Hefe Homologe von Karyopherin  $\beta$ 3, Kap121p und Kap123p sind beschrieben worden. Kap121 kann die Funktion von Kap123 ersetzen und ist vermutlich in den Transport ribosomaler Proteine involviert (Rout *et al.*, 1997; Seedorf *et al.*, 1999). L5 kann, vermutlich über das C-terminale NLS1, spezifisch an Karyopherin  $\beta$ , Transportin und RanBP7 binden (Claußen *et al.*, 1999). Die Ran Abhängigkeit des L5-NLS1 Imports konnte auch *in vitro* nachgewiesen werden (Rudt und Pieler, 2001).

#### 1.4 Transportadapter, eine Brücke zwischen Substrat und Rezeptor

Karyopherin  $\beta$  verwandte Proteine interagieren direkt mit dem Kernporenkomplex. Der Import oder Export eines Transportsubstrats kann entweder direkt gebunden an Karyopherin  $\beta$  verwandte Proteine erfolgen, oder er wird von einem Adapterprotein vermittelt, welches einerseits an das Transportsubstrat bindet und andererseits an einen Transportrezeptor, der dann den Kontakt zur Kernpore herstellt. Diese Adapterfunktion ist wie in letzter Zeit beschrieben nicht nur auf den Import beschränkt, der durch Karyopherin  $\alpha$  verwandte Proteine vermittelt wird, die sich durch gemeinsame strukturelle Merkmale wie die Importin  $\beta$  bindende Domäne und mehrere aufeinanderfolgende  $\alpha$ -helikale Proteindomänen auszeichnen, sondern kann auch von anderen Proteinen wahrgenommen werden.

Der Import von dem ssDNA bindenden Replikationsprotein A (RPA) wird von XRIP $\alpha$ , aber nicht von Karyopherin  $\alpha$  in *Xenopus* Eiextrakten vermittelt. XRIP $\alpha$  interagiert direkt mit Karyopherin  $\beta$ . Eine Depletion von XRIP $\alpha$  blockiert den Import von RPA (Jullien *et al.*, 1999). Indem es die Komplexbildung eines NLS haltigen Substrats mit Karyopherin  $\beta$  ermöglicht, dient es somit wie die Karyopherin  $\alpha$  Proteine als Adapterprotein für den nukleocytoplasmatischen Transport. Auch der Transport von U snRNPs wird von einem Adapterprotein vermittelt. Snurportin 1 bildet mit Karyopherin  $\beta$  und dem Cargo, einem U snRNP, einen heterotrimeren Importkomplex. Snurportin 1 bindet m3G-Cap Strukturen aber nicht m7G-Cap Strukturen (Huber *et al.*, 1998). Der Export von m7G-Cap U snRNAs wird von dem Adapterprotein PHAX vermittelt, welches die Komplexbildung mit CRM1 (Exportin-1), Ran-GTP und dem „nuclear cap-binding complex“ (CBC) ermöglicht (Ohno *et al.*, 2000).

Die Regulation der nukleocytoplasmatischen Lokalisation ist ein wichtiger Mechanismus bei der Kontrolle der Funktion von dem Tumorsuppressor p53. Karyopherin  $\alpha$ 1 vermittelt den Import von p53, welches dann eine Transaktivierung der p53-Antwort-Apoptose-Faktoren auslöst. Eine Fehlverteilung von p53 konnte in verschiedenen Karzinomen wie Neuroblastomen, Colonkarzinomen und Lungenkarzinomen nachgewiesen werden. In den Lungenkrebszellen ZR-75-1 wurde eine Deletionsmutante von Karyopherin  $\alpha$ 1 nachgewiesen (Kim *et al.*, 2000).

## 1.5 Karyopherin $\alpha$ im nukleocytoplasmatischen Transport

Ist der trimere Komplex aus NLS haltigem Substrat, Karyopherin  $\alpha$  und  $\beta$  über den Kernporenkanal in das Nukleoplasma gelangt, führt eine Ran-GTP Bindung an die  $\beta$  Komponente zur Dissoziation. Als Exportfaktor von Karyopherin  $\alpha$  wurde CAS identifiziert (Kutay *et al.*, 1997). In Hefe wird das freigesetzte Karyopherin  $\alpha$  über die Bindung an das dem CAS homologe Cse1p in das Cytoplasma exportiert. Eine besondere Rolle besitzen hier die beiden FXFG haltigen Nukleoporine Nup2p, welches als einziges Nukleoporin aus Hefe eine RCC1 artige Ran-Bindungsdomäne besitzt, und möglicherweise das verwandte Nup1p. Nup2p wird für die Lokalisation von Cse1p an der inneren Kernhülle benötigt. Eine direkte biochemische Interaktion ist jedoch mit Cse1p bisher nicht nachgewiesen worden, wohl aber mit dem Karyopherin  $\alpha$  homologen Srp1p (Kap60p) (Hood *et al.*, 2000). Nup2p kommt eine bidirektionale Funktion im nukleocytoplasmatischen Transport zu (Solsbacher *et al.*, 2000). Nup60p bindet an Nup2p, das Ran homologe Gsp1p-GTP, den RCC1 homologen Guaninnukleotid Austauschfaktor Prp20p und dient als Anlagerungsstelle für Kap95p, Kap60p Heterodimere und Kap123p. Nup60p reduziert die Aktivität von Prp20p und verankert Nup2p an der Kernpore. Gsp1p-GTP steigert die Affinität von Nup2p an Nup60p und ermöglicht die Bindung von dem Nup2p, Kap60p Komplex an Nup60p (Denning *et al.*, 2001). Auch eine spezifische Modifizierung, die Einfluss auf die Importeffizienz haben kann, ist inzwischen von Karyopherin  $\alpha$  Varianten nachgewiesen worden. Humanes Karyopherin  $\alpha 1$  (Rch 1), Ran BP7 und humanes Karyopherin  $\alpha 7$  sind Substrate für die Acetylase CBP (CREB-binding Protein), nicht aber humanes Karyopherin  $\alpha 3$ . Die Acetylierung des Lys22 (Motiv: G/S K) von Karyopherin  $\alpha 1$  kann von CBP oder der nahe verwandten Acetylase p300 erfolgen und fördert die Bindung an den Transportrezeptor Karyopherin  $\beta$  (Bannister *et al.*, 2000).

## 1.6 Differentielle Expression und Bindungsaffinität von Karyopherin $\alpha$

In der Maus werden Karyopherin  $\alpha 4$  (Q1),  $\alpha 3$  (Q2) und  $\alpha 5$  (S1) in unterschiedlichen Mengen ubiquitär exprimiert. Die Expression von Karyopherin  $\alpha 1$  (P1) und  $\alpha 6$  (S2) ist jedoch auf verschiedene Gewebe beschränkt. Karyopherin  $\alpha 1$  konnte in Testis, Milz, Leber, Herz, Lunge, schwach in Niere, äußerst schwach in Gehirn und nicht in Skelettmuskel oder Kleinhirn nachgewiesen werden. Karyopherin  $\alpha 6$  wurde mit einem 1,8 bp Produkt nur in Testis und mit einem 5,5 bp Produkt in allen untersuchten Geweben, sehr schwach aber in Thymus und

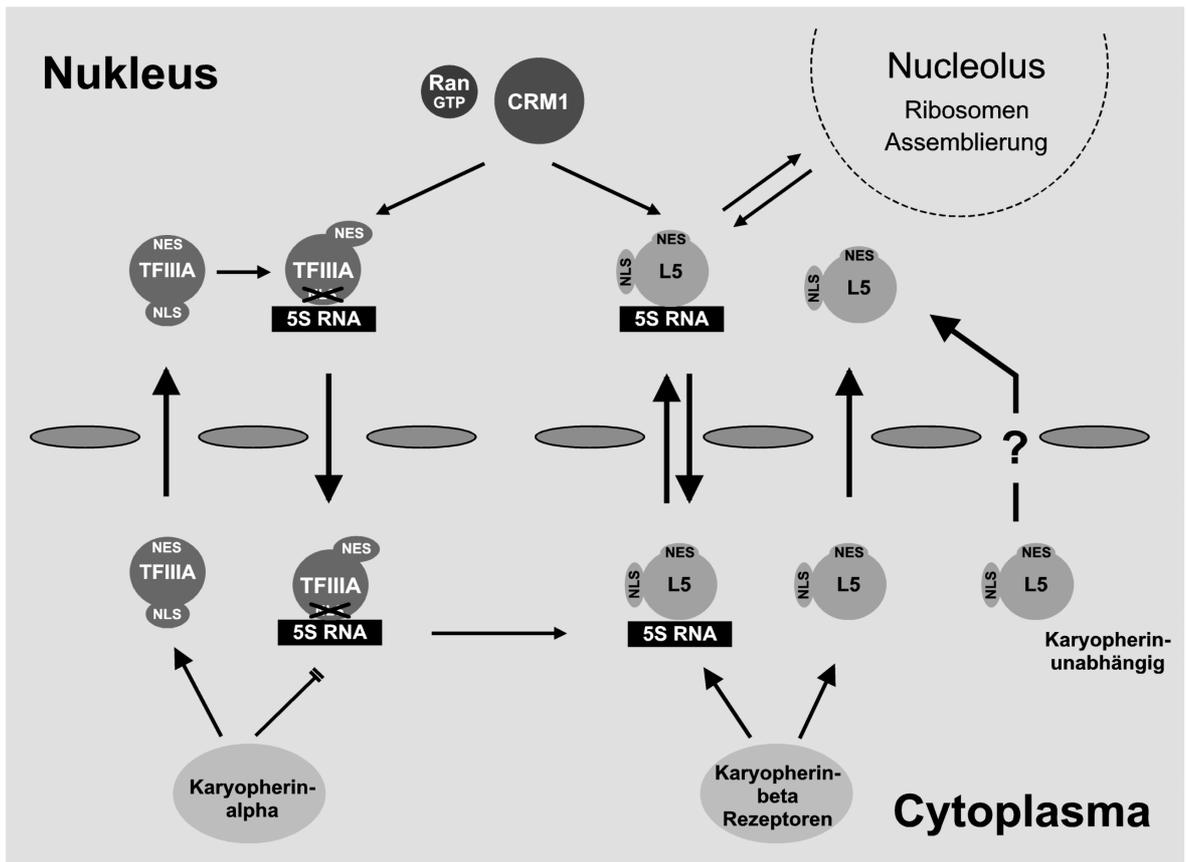
Skelettmuskel nachgewiesen (Tsuji *et al.*, 1997). Die differentielle Expression der humanen Karyopherin  $\alpha$  Varianten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  und  $\alpha 6$  ist ebenso beschrieben (Köhler *et al.*, 1997), wie unterschiedliche Funktionen der Hefe Homologen Srp1p und Sts1p, die einander funktionell nicht ersetzen können (Tabb *et al.*, 2000). Karyopherin  $\alpha$  Varianten zeigen wie die Karyopherin  $\beta$  verwandten Transportrezeptoren ein redundantes Bindungsverhalten an Transportsubstrate. Sie können Substrate aber auch spezifisch binden. So zeigen verschieden lange NLS von Helikase Q, in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Karyopherin  $\alpha$  Varianten unterschiedliches Importverhalten (Miyamoto *et al.*, 1997) oder aber sogar unterschiedliche Bindungsaffinitäten. Humanes Karyopherin  $\alpha 3$  (Qip1) und  $\alpha 1$  (Rch1) können mit der DNA Helikase Q1 interagieren, nicht aber  $\alpha 5$  (hSrp1/NPI1) (Seki *et al.*, 1997).

RanBP3 besitzt ein NLS, welches präferentiell von Karyopherin  $\alpha 3$  in Digitonin permeabilisierten HeLa-Zellen in *in vitro* Import Wettbewerbsstudien importiert wird, aber in GST-Bindungsstudien auch von Karyopherin  $\alpha 4$  und mit sehr niedriger Effizienz von  $\alpha 5$ , nicht aber von  $\alpha 1$  oder  $\alpha 7$ , gebunden werden kann. Ein als Kontrolle verwendetes SV40-nls zeigt keine präferentielle Affinität zu einzelnen Karyopherin  $\alpha$  Varianten (Welch *et al.*, 1999). Die Abweichungen in den NLS Motiven können sehr gering sein, um unterschiedliches Bindungsverhalten von Proteinen an Karyopherin  $\alpha$  Varianten zu zeigen. Das NLS des Lymphoid-Enhancer Faktors-1 (KKKKRKREK) bindet an Karyopherin  $\alpha 5$  und  $\alpha 1$ , das sehr ähnliche Motiv (KKKRRSREK) von dem T-Zell-Faktor-1 jedoch nicht (Prieve *et al.*, 1998).

### 1.7 5S RNA Transport

Einen besonderen Fall im nukleocytoplasmatischen Transport stellt die ribosomale 5S RNA, eine Komponente der großen ribosomalen Untereinheit, in Oocyten dar. Während der Oogenese werden die ca. 20000 Kopien von Oocyten spezifischen 5S RNA Genen transkribiert. In somatischen Zellen sind nur die 800 Kopien somatischer 5S RNA Gene aktiv. Von der 5S RNA in Oocyten unterscheidet sich somatische 5S RNA durch 5 Nukleotidsubstitutionen. Im Gegensatz zu den anderen rRNAs (18S, 28S und 5,8S), die von der RNA-Polymerase I transkribiert werden, wird 5S RNA von der RNA-Polymerase III in den Oocyten vor den anderen ribosomalen Komponenten außerhalb der Nukleoli transkribiert. Es können 4 Proteine an 5S RNA binden, p43, das La Protein, das ribosomale Protein L5 und der Transkriptionsfaktor IIIA. Das La Protein interagiert transient mit allen RNA-Polymerase III Produkten und hat eine Rolle bei der Transkriptionsterminierung. TFIIIA bindet an die 5S RNA und sequenzspezifisch an die interne Kontrollregion des 5S RNA Gens, wo TFIIIA für

die Transkriptionsinitiation benötigt wird. Die 5S RNA wird dann gebunden an L5 (5S RNP) oder an TFIIIA (7S RNP) exportiert. Oocyten spezifische 5S RNA hat eine höhere Affinität zu TFIIIA als zu L5, somatische 5S RNA bindet hingegen präferentiell an L5. Im Cytoplasma liegt die 5S RNA als 7S RNP oder als 42S RNP Vorratspartikel vor. Das 42S RNP ist ein Komplex aus 5S RNA, tRNA und mehreren Proteinen. Das 7S RNP ist ein Partikel im 1:1 Verhältnis aus TFIIIA und 5S RNA. Mit dem Beginn der Vitellogenese beginnt die Ribosomenbiogenese, die L5 Konzentration steigt, und die 5S RNA wird gebunden an L5 in den Zellkern zu den Nucleoli transportiert. Ab diesem Zeitpunkt nimmt die Konzentration der Vorratspartikel ab. Als Teil der großen 60S ribosomalen Untereinheit passiert die 5S RNA dann ein drittes Mal die Kernmembran (Übersicht in Nakielny *et al.*, 1997; Pieler und Rudt, 1997).



**Abbildung 2 : Modell zum nukleocytoplasmatischen Transport von 5S RNA.**  
 Aktuelles Modell zum nukleocytoplasmatischen Transport von 5S RNA in *Xenopus laevis* Oocyten. TFIIIA bildet mit 5S RNA das 7S RNP. Das 7S RNP kann aufgrund einer Maskierung des NLS nicht importiert werden. Der Export von dem 7S RNP und 5S RNP wird von CRM1 vermittelt (K. Murdoch, Publikation in Vorbereitung).

Die mRNA von TFIIIA liegt während der Entwicklungsstadien I, II und III in den Oocyten von *Xenopus laevis* in der höchsten Konzentration vor. Die Konzentration sinkt während der Stadien III und IV um das fünffache und bleibt während der Stadien IV-VI konstant. Erst während der späten Blastula und frühen Neurula sinkt die Konzentration dramatisch auf kaum detektierbare Mengen ab (Ginsberg *et al.*, 1984). Im Gegensatz zur mRNA in den Oocyten ist die TFIIIA mRNA in diesen späteren Entwicklungsstadien heterogen und größer. Die Konzentration des TFIIIA-Proteins sinkt von ca.  $1 \times 10^{12}$  Molekülen pro Oocyte in den Stadien I-IV über  $3 \times 10^{11}$  Moleküle pro Oocyte im Stadium V auf  $5 \times 10^{10}$  Moleküle pro Oocyte im Stadium VI. Im Verlauf der Oogenese wird die Anzahl an TFIIIA-Molekülen um das 20-fache reduziert. Das somatische TFIIIA (TFIIIA') mit 42 kd tritt erst ab der Neurula mit 7000 Molekülen/Zelle auf (Shastry *et al.*, 1984). Oocyten typische 5S RNA interagiert primär mit TFIIIA, somatische 5S RNA hingegen interagiert vorzugsweise mit L5. Eine Reduktion der TFIIIA Konzentration sollte 5S RNA freisetzen, die dann von L5 gebunden, und im 5S RNP in den Zellkern transportiert werden kann. Dieses Modell beinhaltet auch, dass in somatischen Zellen 5S RNA aufgrund der höheren Affinität zu L5 direkt von L5 gebunden werden kann und so eine Passage der Kernpore überflüssig wird (Übersicht in Pieler und Rudt, 1997).

### 1.8 Ziel der Arbeit

In Fortführung der von mir angefertigten Diplomarbeit sollte die Minimalstruktur der N- und C-terminalen Kernlokalisierungssignalsequenzen von TFIIIA weiter eingegrenzt werden. Ausgehend von einer Expressionsmusteranalyse von Transportfaktoren, Transportfaktor assoziierten Proteinen und ribosomalen Proteinen wurde ein neuer Ansatz entwickelt, neue in den nukleocytoplasmatischen Transport involvierte Proteine zu identifizieren. Im Rahmen der Arbeiten zur Identifizierung neuer Transportfaktoren wurden mehrere Transportadapter isoliert. Die Möglichkeit ihrer Funktion im nukleocytoplasmatischen Transport von TFIIIA wurde geprüft.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Versuchstiere

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 den Firmen *Xenopus I* (Ann Arbor, USA) und Nasco (Ft. Atkinson, Wisconsin USA) erworben. Die Frösche wurden gemäß der deutschen Tierschutzbestimmungen behandelt und gehalten. Die Bestimmung der Embryonalstadien erfolgte nach Nieuwkoop und Faber (1967).

#### 2.1.2 Bakterienstämme

Die verwendeten *E. coli*-Stämme (Stratagene GmbH, Heidelberg) besaßen folgende Genotypen:

**GM2163** F' ara14, leuB6, fhuA31, lacY1, tsx78, glnV44, galK2, galT22, mcrA, dcm-6, hisG4, rfbD1, rpsL136, dam13::Tn9, xylA5, mtl-1, thi-1 mcrB1, hsdR2

**NM522** F' proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lac<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15/ Δ(lac-proAB) glnV thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5

**TG1** Δ(lac-proAB), supE44, gthi, hsdD5 {F'traD36 proAB+lacIq lacZΔM15} Variante des K12-Stamms

**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'** D(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>

**XL0LR** D(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>, λ<sup>r</sup>

**BL21 (DE3) plys S<sup>b</sup>** BF<sup>-</sup>, dcm, omp T, hsdS (rb- mb-), gal λ (DE3) {plys S Cam<sup>r</sup>}

#### 2.1.3 Zelllinien

Die verwendeten HeLa-Zellen (humane Portiokarzinom-Zellen, Zugriffsnummer: ACC57) wurden in MEM-Medium kultiviert und stammen vom DSMZ aus Braunschweig.

### 2.1.4 Genbanken

Für die Isolierung der cDNA-Sequenzen von *Xenopus* Karyopherin  $\beta$ 3 und der partiellen Ran-TC4 cDNA-Sequenz wurde eine  $\lambda$ -Zap Express cDNA-Bank (Stratagene GmbH, Heidelberg) benutzt, welche von T. Hollemann (1998) erstellt wurde und cDNA aus präparierten Köpfen von *Xenopus* Embryonen (Stadium 28-31) enthielt.

Zur Isolierung von anderen cDNA-Sequenzen wurde aus ca. 4000 präparierten Augen (200  $\mu$ l) von *Xenopus* Embryonen (Stadium 30-32) eine  $\lambda$ -Zap Express cDNA-Bank (Stratagene GmbH, Heidelberg) erstellt. Die Erststrang-Synthese der cDNA erfolgte mit Hilfe von zufällig zusammengesetzten ("random") hexameren Oligonukleotiden.

### 2.1.5 Plasmide aus anderen Laboratorien

Folgende cDNAs wurden von anderen Laboratorien zur Verfügung gestellt: RanBP1 und RanGAP1 von Mary Dasso, XSUMO-1 von Duncan Sparrow, Importin  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2 (Karyopherin  $\alpha$ ) von Dirk Görlich und Transportin von Gideon Dreyfuss. Das durch eine zusätzliche Klonierungsstelle modifizierte pSVBeta Plasmid ist von Klaus Schwamborn.

### 2.1.6 Vektoren

PBK-CMV	Stratagene GmbH, Heidelberg
pCS2+	Turner und Weintraub, 1994
pCS2+MT	Turner und Weintraub, 1994
pGemT	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
pGex5x1	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
pGex5x3	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
pSVBeta	(modifiziert) Schwamborn <i>et al.</i> , 1998

### 2.1.7 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von den Firmen NAPS (Göttingen), Eurogentech (Searing, Belgien), MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen oder waren Bestandteil der verwendeten Kits. Die Sequenz ist in 5' 3' Orientierung angegeben. Eingefügte Schnittstellen sind unterstrichen dargestellt.

Primer Name	Sequenz in 5' 3' Orientierung
pSV-beta-F1	ACT GCT CCT CAG TGG A
MC002	AAA TAA AGC AAT AGC ATC AC
pAXminus	CCT GGT CTT GCT GGC CAA CAT
CMVr	GCA AGG CGA TTA AGT TGG GTA
CMVf	CGC GCC TGC AGG TCG ACA CTA

**Tabelle 1 : Standard Sequenzierprimer.**

Primer Name	Schnittstelle	Sequenz in 5' 3' Orientierung
UpZF3X	Xba I	ATG <u>CTC TAG</u> ATG TGA CTC GGA TGG A
UpZF2X	Xba I	ATG <u>CTC TAG</u> ATG TAA GGA AGA AGG A
UpZF1X	Xba I	ATG <u>CTC TAG</u> ATG CTC TTT CGC CGA C
UpZf8	Bgl II	ATG <u>CAG ATC ITG</u> CCC TCG AGA TGG C
UpZf6	Bgl II	ATG <u>CAG ATC ITG</u> CAA AAA GGA TGA T
UpZF9	Bgl II	ATG <u>CAG ATC ITG</u> TGA GCA TGC TGG C
ZF4	Nsi I	GAG <u>AAT GCA TGA</u> CTG AAC TGA TGA
ZF9	Pst I	AAC <u>TGC AGC</u> ATG CAC AAC TGA ATG TCT
ZF8	Pst I	AAC <u>TGC AGC</u> ATG AAA TGA TTG TAT
Up3N	Nhe1	TCA <u>GCT AGC</u> TTG TGA CTC GGA TGG
ZF4E	Ecl 136 II	TAA <u>GAG CTC</u> GTG ACT GAA CTG ATG
Up7N	Nhe1	TCA <u>GCT AGC</u> TTG TGA TGT GTG TAA
ZF9E	Ecl 136 II	TAA <u>GAG CTC</u> ATG TAC AAC TGA ATG

**Tabelle 2: TFIIIA spezifische Primer mit eingefügten Schnittstellen.**

Die in Spalte zwei angegebenen Schnittstellen sind in der Oligonukleotidsequenz unterstrichen.

Primer Name	Sequenz in 5' 3' Orientierung
B3DF2	GGT ATT GGT GTA ATG GCA C
B3Seq-f1	TGA GCA CAA TAT TCC CCT
B3Seq-r1	GTG TCT GCA ACA GAT
B3Seq-r2	TGT TTT CTG GCG CCG T
B3Uf1	GGA ATG CGC AAG AGT TCG TGG CC
B3Ur1	GCA GCC ATC ACC CAT TAC CTC
B3Ur3	CTG CTC AAA CCA GGG CAA GAT C
B3UTRr1	GTA CTT CCA GTG CAT GGG

**Tabelle 3 : Karyopherin  $\beta$ 3 spezifische Sequenzierprimer.**

## 2. Material und Methoden

---

cDNA	Primer Name	Schnittstelle	Sequenz in 5' 3' Orientierung
Karyopherin $\beta$ 3	UpIB3E	Eco R I	ATC <u>GAA TTC</u> AGC AAT GGC GGC CGA
	IB3X	Xho I	GTG <u>ACT CGA</u> GTC ACG CAG TGC TGA G
p10	Upp10E	Eco R I	GCG <u>GAA TTC</u> AGA TAT GGC AGA AAA GCC A
	P10X	Xho I	GAG <u>CCT CGA</u> GTC AGC CAA AGT TAT G
Ran BP7	UpRBP7B	Bst 1107	CCG <u>TAT ACG</u> ATA TGG ACC CGG CCC TG
	RBP7X	Xho I	TAT <u>CTC GAG</u> TTA ATT CAT TCC TGG GGC
SUMO-1	UpSUMO1S	Stu I	AGA <u>AGG CCT</u> GGC ATG TCT GAT CAG GA
	SUMO1X	Xho I	GAA <u>TCT CGA</u> GTT AAA ATG TCG AGT GGC C
RanBP1	XIRanBP1E	Eco R I	ATG <u>AAT TCC</u> GCG ATG GCC GAT ACC AAG GAT
	RanBP1X	Xho I	AAT <u>CTC GAG</u> TTA TTG CTT TTC CTC TGC TTT
RanGAP1	UpRanGap1E	Eco R I	AAG <u>AAT TCC</u> GGA ATG GCT GCT GAA GAT ATC
	RanGap1X	Xho I	CAA <u>CTC GAG</u> TTA CAG ATT ATG AAG GTT G
Transportin	UPTranspE	Eco R I	AAG <u>AAT TCC</u> GCG ATG CCG GAT GAA CAG GGC CTC C
	TranspX	Xho I	CTT <u>CTC GAG</u> TTA AAC TCC ATA GTA GGC
RanTC4	UpRanTC4E	Eco R I	AAG <u>AAT TCC</u> GTT ATG GCA CCC AAG GGA GGA
	Ran TC41X	Xho I	ATT <u>CTC GAG</u> TTA GCA AGC CAA AGG AAG GGC
Karyopherin $\alpha$ 1 und $\alpha$ 2	UpAlpa1af1E	Ecl 136 II	AAG <u>GAG CTC</u> GAA ATG CCG ACC ACA AAT G
	Alpa1ar1X	Xho I	TTC <u>TCG AGT</u> CAG AAA TTG AAA GAC TC
Karyopherin $\alpha$ 3	Kalpha3E	Eco R I	GGA <u>ATT CAA</u> TGT CCA ACA ATG AGA ATG GTG CCC GTC TCA CTA GGT TCA AG
	Kalpha3X	Xho I	CGT <u>CTC GAG</u> TTA GAA GTT AAA TGT AGT
Karyopherin $\alpha$ 4	Kalpha4E	Eco R I	GGA <u>ATT CAA</u> TGG CGG ACA ACG CCG GC
	Kalpha4X	Xho I	CGT <u>CTC GAG</u> TTA GAA GTT AAA TTC CTT TG
Karyopherin $\alpha$ 5	Kalpha5E	Eco R I	GGA <u>ATT CAA</u> TGG ACA CCA TGG CAA GC
	Kalpha5X	Xho I	CGT <u>CTC GAG</u> TTA GAG CTG AAA TCC TTC

**Tabelle 4: Primer für Transportfaktoren und transportassoziierte Proteine mit eingefügten Schnittstellen.**  
 In Spalte eins ist die mit den Primern amplifizierbare cDNA angegeben. Die in Spalte drei angegebenen Schnittstellen für Klonierungen sind in der Oligonukleotidsequenz unterstrichen.

## 2. Material und Methoden

Primer Name	Sequenz in 5' 3' Orientierung
XIAlpha1F1	GAG GAA TAT TAC ATG GAT GC
XIAlpha1R1	CGC AGT GAT GGT GTC ACT
XIAlpha2F1	GAG AAA TAT CAC GTG GAC AC
XIAlpha2R1	CTG GAT TAG ACG TTC CAC AAG
Alp331erR	CCA ACA TGT GGC CAG TGT GCA GTC ACT GAA G
Alp3cds3F	CAT TGG CTC CTG AGA CCA C
Alp3cds3R	CCT GGA TCT GGT CCT GAC GC
Alp3cds4R	CTG GTC TCA TTC CCA AGC TG
lalp33'UTRR	ACA GAC AAG ACA TGG CAG TG
lalp35'UTRF	AGA GCT GTT GTG ACC TGT TC
lalp3CDS1F	TGC TAA AGA GGA GAA ATG TC
lalp3CDS1R	GGT TTG ATC AGA GGT TCC AGA
lalp3CDS2F	AGC TGC CTG GAC ACT GTC CA
lalp3CDSaR	TCT TCT CCA TCC TCT GCA GA
Alp430erF	CGG TAA ACG GGC AGT GGG AAG ACG CAG AAG
Alp4cds3F	ACC TGC TTT GTG TGT CCT CA
Alp4cds4F	GAA GCT AGC ACT ATT GCT GAG
lalp43'UTRR	GCT GTA TGC GGA GGG ACA GA
lalp43'UTRR2	CAG CAC ATG GTG CTG AAT GGA
lalp45'UTRF	GCA GTG GGA AGA CGC AGA AG
lalp4CDS1F	ATG GCG GAC AAC GCC GG
lalp4CDS1R	GCT TGC ACT GCA CTT AGT TG
lalp4CDS2R	CGA GGT TCC TGA TGC TAT GT
Alp533erF	CTG ACA GAC CGG GTG TAA GCA TGG ACA CCA TGG
Alp5cds3F	GTG ACA ACT ATA CAC TAC AG
Alp5cds4F	ACT GCT GGC AAC AGA GGC CA
lalp53'UTRR	TAG CTT GTC CAA CGG ATC A
lalp55'UTRF	CTG ACA GAC CGG GTG TAA G
lalp5CDS1F	GTC GTG AGG AAG AAG GCA TC
lalp5CDS1R	TCA GAG CTG AAA TCC TTC C
lalp5CDSa1R	GGC ATT GAT CAC CTC ATC TAT
lalp5CDSb1R	GTT GTG AGG TTC CAG AAG CT

**Tabelle 5: Karyopherin  $\alpha$  spezifische Sequenzierprimer.**

Primer Name	Sequenz in 5' 3' Orientierung
TFIIIAf1	AAC TGT GGC AAA GCA TTC AAG
TFIIIAr1	AGC GGT CAC AGC CAT CTC
Ran-mut-1 (5')	ATT ATT CTC GAG ATG CCT GCG CAG GGA
Ran-mut-2 (3')	CTC AGC CTC GAG AGC TTA CAG GTC ATC ATC
H4F	CGG GAT AAC ATT CAG GGT ATC ACT
H4R	ATC CAT GGC GGT AAC TGT CTT CCT
3'-CDS	AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA C (T) <sub>30</sub> N <sub>-1</sub> N

**Tabelle 6: Sonstige Oligonukleotide.**

(N = A, C, G, oder T; N<sub>-1</sub> = A, G, oder C)

### 2.1.8 Enzyme und Reaktionssysteme (Kits)

#### **Enzyme:**

Alkalische Phosphatase (1 U/ $\mu$ l) Boehringer Mannheim, Mannheim  
Lysozym Biomol GmbH, Hamburg  
Proteinase K Merck KGaA, Darmstadt  
Restriktionsendonukleasen Boehringer Mannheim, Mannheim  
Restriktionsendonukleasen New England Biolabs GmbH, Schwalbach  
RNase A Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen  
RNasin (40U/ $\mu$ l) Promega Deutschland GmbH, Mannheim  
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  
*Pfu* DNA-Polymerase (2.5 U/ $\mu$ l) Stratagene GmbH, Heidelberg  
*Taq* DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l) Perkin-Elmer, Weiterstadt  
T4 DNA-Ligase (1 U/ $\mu$ l) GibcoBRL, Eggenstein  
T4-Polynukleotidkinase (10 U/ $\mu$ l) New England Biolabs GmbH, Schwalbach

#### **Kits:**

Dye Terminator Cycle Sequencing Kit Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt  
PCR Purification Kit Qiagen GmbH, Hilden  
pGEM-T Kit Promega Deutschland GmbH, Mannheim  
QIAEX Gel Extraction Kit Qiagen GmbH, Hilden  
RNA Transcription Kit Stratagene GmbH, Heidelberg  
RNeasy Mini Kit Qiagen GmbH, Hilden  
RT-PCR Kit Perkin-Elmer, Weiterstadt  
TNT-Coupled Reticulocyte Lysate System Promega Deutschland GmbH, Mannheim  
Rediprime II Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden  
SMART RACE cDNA Amplification Kit Clontech, Palo Alto, USA

### 2.1.9 Antikörper

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

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

**anti-Maus IgG1/Cy<sup>TM</sup>3** (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, Pennsylvania, USA): Fab-Fragmente aus Ziege gegen Maus IgG1-spezifische Antikörper, gekoppelt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3.

### 2.1.10 Radioisotope

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP, 3.000 Ci/mmol Amersham Buchler, Braunschweig

[<sup>14</sup>C]-methylierter Proteinstandard Amersham Buchler, Braunschweig

[<sup>35</sup>S]-Cystein, 1.000 Ci/mmol Amersham Buchler, Braunschweig

[<sup>35</sup>S]-Methionin, 1.000 Ci/mmol Amersham Buchler, Braunschweig

### 2.1.11 Medien und Lösungen

Alle nicht gesondert aufgeführten Medien und Pufferlösungen wurden nach Sambrook *et al.*, 1989 hergestellt. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Lösungen mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt und durch Autoklavieren für 20 Minuten bei 121°C sterilisiert. Hitzelabile Substanzen wurden durch Membranfilter (Porendurchmesser 0.2 µm, Sartorius) sterilfiltriert. Nährmedien wurden nach dem Autoklavieren bis auf ca. 50°C abgekühlt und mit den entsprechenden Selektivantibiotika versetzt.

### Nährmedien

#### Bakterien

**LB-Agar:** 1,5 % (w/v) Agar (DIFCO) in LB-Flüssigmedium

**Luria-Bertani (LB)-Medium:** 1 % (w/v) Bacto-Trypton (DIFCO), 0,5 % (w/v) Hefeextrakt (DIFCO), 1 % (w/v) NaCl, pH 7,5

**NZY-Agar:** 1,5 % (w/v) Agar in NZY-Flüssigmedium

**NZY-Medium:** 1 % (w/v) NZ-Amin (Casein Hydrolysat), 0,5 % (w/v) Hefeextrakt (DIFCO), 0,5 % (w/v) NaCl, 8,1 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7,5

**NZY-Top-Agar:** 0,7 % (w/v) Agar in NZY-Flüssigmedium

### **HeLa-Zellmedium**

**MEM-Medium:** 9,9 g/l MEM-Medium (MEM Earle's, Biochrom KG, Berlin), 0,001 % (w/v) Streptomycin, 10 % FCS (Fötale Kälberserum, PAA Laboratories GmbH, Cölbe; zur Inaktivierung 45 Minuten bei 56 °C vorinkubiert)

### **Antibiotika**

Antibiotika-Stammlösungen wurden aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Ampicillin: 100 mg/ml in dH<sub>2</sub>O, Verdünnung 1:1.000 (Endkonzentration: 100 µg/ml)

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

Tetracyclin: 5 mg/ml in Ethanol, Verdünnung 1: 400 (Endkonzentration: 12,5 µg/ml)

Streptomycin: 10 mg/ml Streptomycin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)

Penstrep: 10mg/ml (Biochrom KG, Berlin)

### **Puffer und Stammlösungen**

DAPI-Einbettungsmedium: 10 % (v/v) PBS, 90 % (v/v) Glycerol, 1 mg/ml Phenylendiamin, 1 µg/ml 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)

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

Di-Natriumhydrogenphosphat-Lösung: 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

DNA-Auftragspuffer: 50 % Glycerin, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau oder Xylencyanol

DTT: 1 M DTT, 10 mM Natriumacetat pH 5,2 20 °C lagern

EDTA: 0,5 M EDTA, pH 8,0

Ethidiumbromid-Lösung: 10 mg/ml Ethidiumbromid

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

GST-Pull-Down Bindungspuffer: 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl 0,5 mM EDTA, 0,5 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0,05 % NP-40

KCl-Lösung: 1 M KCl

LiCl-Lösung: 8 M LiCl

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

MgCl<sub>2</sub>-Lösung: 1 M MgCl<sub>2</sub>

MgSO<sub>4</sub>-Lösung: 1M MgSO<sub>4</sub>

NaCl-Lösung: 5 M NaCl

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

Natriumdihydrogenphosphat-Lösung: 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

PBS (10 x): 8 % (w/v) NaCl, 2 % (w/v) KCl, 65 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2-7,4

PBS-Puffer: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

SDS-Lösung: 20 % (w/v) Natriumdodecylsulfat

SSC (20 x): 3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,2-7,4

TBE: 89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA · NaOH pH 8,0

Tris-HCl-Puffer (pH 7 - 9): 1 M Tris-HCl, pH 7-9

Tween-20-Lösung: 20 % (v/v) Tween-20

ZnSO<sub>4</sub>-Lösung: 1 M ZnSO<sub>4</sub>

Z-Puffer : 25 mM Tris HCl, pH 7,7, 100 mM NaCl, 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 % Glycerol, 0,05 % NP-40

Z-Puffer (für TFIIIA): 25 mM Tris-HCl, pH 7,7, 100 mM NaCl, 12,5 MgCl<sub>2</sub>, 20 % Glycerol, 0,1 % NP-40, 1 mM ZnSO<sub>4</sub>

SDS-PAGE Probenpuffer: 130 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20 % Glycerol, 4 % SDS, 10 % β-Mercaptoethanol, 0,002 % Bromphenolblau

SM-Puffer: 50 mM Tris HCl pH 7,5, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 0,01 % Gelatine, sterilfiltriert (0.45 μm)

### 2.1.12 Chromatographiematrices

Gamabind plus Sepharose Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

Ni-NTA Sepharose Qiagen GmbH, Hilden

Glutathion-Agarose Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Oligo-(dT)-Cellulose Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

### 2.1.13 Chemikalien

Biochemische Feinchemikalien wurden von den Firmen Boehringer Mannheim, Fluka, Roth, Serva und Biomol bezogen. Alle anderen Chemikalien stammten von den Firmen Fluka, Baker, Paesel-Lorei, Calbiochem, Gibco, Sigma oder Merck und wiesen den höchsten Reinheitsgrad (p.A.) auf. Die komplexen Medienbestandteile wurden von DIFCO Laboratories (Detroit, Michigan, USA) bezogen.

### 2.1.14 Geräte

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

#### **Histologie**

Vibratom  
Typ 1000, Pelco International, Redding,  
California, USA

#### **Mikroinjektion**

Microinjector 5242  
Eppendorf, Hamburg  
Nadelzieher  
Leitz, Wetzlar

#### **Optik**

Stereomikroskop  
Stemi SV6, Zeiss, Oberkochen  
Stereomikroskop  
MZFLIII, Leica Microsystems, Wetzlar  
Kameraaufsatz  
MC80, Zeiss, Oberkochen  
Fluoreszenzmikroskop  
Axioplan 2, Zeiss, Oberkochen  
Fotomikroskop  
Axioskop, Zeiss, Oberkochen  
Digitalkamerasystem  
JVC 3CCD KY-F58 Kamera  
mit Kamera Kontroll Einheit  
Digitalkamerasystem  
Sony 3CCD DX950P  
Remote Control Unit RM-C950  
Kamera Adapter CMA-D2

#### **Thermocycler**

UNOII Thermoblock  
Biometra, Göttingen  
TRIO Thermoblock  
Biometra, Göttingen

#### **Sonstige**

Phosphoimager  
Molecular Dynamics, Krefeld  
Zell-Zählgerät CASY 1, Modell TT CAP  
Schärfe System, Reutlingen  
Innova 4230, temerierbarer Zellschüttler  
New Brunswick Scientific, Edison, USA  
Gyrotory Shaker G25  
New Brunswick Scientific, Edison, USA

### Software

Bild/Grafikverarbeitung: Adobe Photoshop Version 5.5 (Adobe Systems Europe Ltd., Edinburgh, Schottland)  
Freehand Version 9.0 (Macromedia Inc., San Francisco, USA)

DNA/Protein-Sequenzverarbeitung:

Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, USA)  
Blast-Suchsystem für Datenbanken (Altschul *et al.*, 1997)

Textverarbeitung: Microsoft Word 2000® (9.0.3821 SR1)

Adobe Acrobat 4.05a (Adobe Systems Europe Ltd., Edinburgh, Schottland)

### Benutzte Datenbanken, DNA- und Protein-Sequenz Analyseprogramme:

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>  
<http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/>  
<http://www.ch.embnet.org/software/BottomBLAST.html?>  
<http://www.celera.com/>

PROSCAN (PROSITE SCAN):

[http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_prosite.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_prosite.html)

Dialign:

[http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/cgi-bin/dialign\\_submit](http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/cgi-bin/dialign_submit)

Predict nls:

<http://maple.bioc.columbia.edu/predictnls/>

PSORT (Prediction of Protein Sorting Signals and Localization Sites in Amino Acid Sequences):

<http://psort.nibb.ac.jp/>

GeneCards:

<http://www.dkfz-heidelberg.de/GeneCards/>

Entrez (a retrieval system for searching several linked databases):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 DNA-Methoden

#### 2.2.1.1 Plasmidpräparation im präparativen Maßstab

Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA (100-600 µg) wurden mit 2 ml Vorkultur 50 ml LB Medium beimpft. Die Kultur wurde 16 Stunden bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden in einem 50 ml Plastikgefäß (Greiner Bio-One GmbH, Solingen) bei 4°C und 5000 Upm 10 Minuten zentrifugiert (Sorvall CL6B-Kühlzentrifuge mit GSA-Rotor DuPont, Bad Homburg). Das Pellet wurde dem Herstellerprotokoll (Qiagen Plasmid Purification Qiagen GmbH, Hilden oder Nucleobond AX, Macherey-Nagel, Düren) entsprechend aufgearbeitet. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in dH<sub>2</sub>O gelöst und auf eine Konzentration von 1µg/µl verdünnt.

#### 2.2.1.2 Plasmidpräparation im analytischen Maßstab

Plasmid-DNA wurde durch alkalische Lyse der Bakterien gewonnen (Birnboim und Doly, 1979). Für die Plasmidpräparation wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur 2 Minuten in einem Eppendorf Mikroreaktionsgefäß bei 14000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Lösung 1 resuspendiert. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden 200 µl Lösung 2 hinzugegeben, und die Proben durch mehrmaliges Schwenken durchmischt. Nach weiteren 5 Minuten RT erfolgte die Zugabe von 150 µl Lösung 3. Die Ansätze wurden kräftig geschüttelt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Durch 15 Minuten bei 14000 Upm wurden die Zelltrümmer und die genomische DNA pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde mit 500 µl Phenol/Chloroform versetzt und 3-10 s gemischt. Nach 2 Minuten Zentrifugation wurde die wässrige Phase in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und mit 2 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen Natriumacetat (3M, pH 5,2) gefällt. Die Ansätze wurden 15-30 Minuten bei 14000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen.

**Lösung 1:** 50 mM Glucose, 25 mM Tris HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0

**Lösung 2:** 0,2 N NaOH, 1 % SDS

**Lösung 3:** 60 ml Kaliumacetat, 11,5 ml Eisessig, 28,5 ml dH<sub>2</sub>O

### 2.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren durch UV-Spektroskopie

Die Konzentration von DNA und RNA wurde in einem Spektralphotometer (Pharmacia Biotech) mit einer Quarzküvette bei 260 nm gegen einen Leerwert bestimmt. Gemessen wurden 1:50-Verdünnungen der DNA Lösungen in H<sub>2</sub>O. Es gelten folgende Beziehungen:

#### DNA

OD<sub>260</sub> = 1 entsprechen 50 µg/ml DNA

OD<sub>260</sub> = 1 entsprechen 40 µg/ml RNA

OD<sub>260</sub> = 1 entsprechen 33 µg/ml Oligonukleotid

#### RNA

OD<sub>260</sub> = 1 entsprechen 40 µg/ml RNA

Als ein Maß für die Qualität der DNA (Reinheit) wurde die OD bei 280 nm bestimmt und der Quotient aus OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> berechnet.

Für reine DNA gilt: OD<sub>260</sub> : OD<sub>280</sub> = 2,0

Für reine RNA gilt: OD<sub>260</sub> : OD<sub>280</sub> = 1,8

Eine OD<sub>260</sub> : OD<sub>280</sub> < 1,8 zeigt an, dass die Präparation mit Proteinen oder aromatischen Substanzen z.B. Phenol kontaminiert ist. Bei einem Quotienten OD<sub>260</sub> : OD<sub>280</sub> > 2,0 ist die Präparation möglicherweise mit RNA kontaminiert.

### 2.2.1.4 Agarosegelelektrophorese

Die Protokolle zur elektrophoretischen Trennung von DNA-Fragmenten sind bei Sambrook *et al.*, 1989 beschrieben. Die Agarose hatte je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente eine Konzentration von 0,7-2 % in TBE-Puffer. Das Gel enthielt zusätzlich 1 µg/ml Ethidiumbromid, um die DNA auf einem UV-Transilluminator (254 nm) sichtbar zu machen. Als Laufpuffer wurde TBE-Puffer verwendet. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen DNA-Auftragspuffer (50 % Glycerin, 0,2 % Bromphenolblau oder Xylencyanol) versetzt. Als Größenmarker wurde eine 1 Kb DNA-Leiter (Life Technologies) verwendet. Die Trennung erfolgte bei ca. 10 V/cm Länge des Gels. Um eine Beschädigung der DNA zu vermeiden, wurde bei präparativen Gelen UV-Auflicht (365nm) zur Detektion der DNA-Fragmente benutzt, und die entsprechenden Vektor- und Insertbanden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Agarosegelstücke wurden mit Qiaex II (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers behandelt. Die DNA-Fragmente wurden mit 2 x 15 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

### 2.2.1.5 Manipulation von DNA

Die verwendeten Plasmide wurden durch Restriktion, Bluntending und Ligation modifiziert. Die Protokolle waren angelehnt an Sambrook *et al.*, 1989 und wurden nach den Herstelleranweisungen bearbeitet.

### 2.2.1.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Die Restriktionsenzyme wurden von verschiedenen Herstellern bezogen (Boehringer, Fermentas, Promega, New England Biolabs). Inkubationen wurden bei Raumtemperatur, 25°C und 37 °C für Zeiten zwischen 2 und 18 Stunden durchgeführt. Die Umwandlung von überhängenden DNA-Enden in stumpfe DNA-Enden („Bluntending“) erfolgte entweder durch eine Auffüllreaktion mit dem Klenow-Fragment (NEB), einem proteolytischen Produkt der DNA-Polymerase I, oder durch Nutzung der 3'-5'- Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase I (Large Klenow Fragment, Stratagene).

### 2.2.1.7 Dephosphorylierung von Vektoren

Nach Inaktivierung der Restriktionsendonucleasen wurde der mit ein oder zwei Restriktionsenzymen linearisierte Vektor in einem Gesamtvolumen von 40 µl aufgenommen. Um die Anzahl falsch positiver Klone zu reduzieren, wurden die 5'-Phosphatgruppen des Vektors mit Alkalischer Phosphatase entfernt. Hierzu wurde der Vektor mit 1/10 Volumen Phosphatase Puffer und 1 µl Alkalischer Phosphatase 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Enzyminaktivierung durch eine Inkubation von 15 Minuten bei 65 °C. Vor Verwendung für eine Ligation wurde der linearisierte und dephosphorylierte Vektor auf ein 0,7 %iges Agarosegel aufgetragen und nach der Elektrophorese reisoliert.

### 2.2.1.8 Einfügen von Schnittstellen

Mit der PCR ist es möglich, DNA-Fragmente mit zwei Oligonukleotiden und einer DNA-Matrize zu amplifizieren (Mullis und Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1985). Die Oligonukleotide bestimmen das zu amplifizierende DNA-Fragment. Die DNA-Polymerase hat Einfluß auf die Qualität, Eigenschaften der Fragmentenden und die maximale Länge des PCR-Produkts. Die Konstrukte 4, 34, 234 und 678 wurden mit Hilfe dieser Technik erstellt. Die Primer sind so gewählt, dass sie mit ihrem 5'-Ende bei der Hybridisierung mit dem Matrizen-Strang im ersten PCR-Zyklus mit mehreren Basen nicht paaren können. An dieser Position wurde die Sequenz so modifiziert, dass in den folgenden PCR-Zyklen an den Fragmentenden Schnittstellen entstehen. Zwei Reaktionsrunden später konnte so an beiden Enden der amplifizierten Fragmente die Sequenz modifiziert werden. In die 5'- und 3'-Bereiche der

Zinkfinger kodierenden Sequenzen sind Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingefügt worden. Durch Verwendung der Taq-Polymerase wurde gewährleistet, dass bei einigen Fragmenten ein 3'-Adenosin-Überhang vorhanden war.

Für jedes Konstrukt wurde folgender Ansatz erstellt:

1 µl 10 x Taq-Puffer  
0,9 µl MgCl<sub>2</sub> 25 mM  
0,8 µl dNTP 2,5 mM  
0,25 µl Taq Polymerase 5U/µl  
10 ng Matrizen-DNA  
1,25 µl 1. Primer 2,5 µM  
1,25 µl 2. Primer 2,5 µM  
ad 75 µl

Folgendes Protokoll wurde für die PCR erstellt : 3 min bei 94°C, 30 Zyklen: 60 s bei 95°C, 60 s bei 48°C, 60 s bei 72°C , und 10 min 72°C. Die PCR-Produkte wurden nach Aufreinigung mit dem PCR-Purification Kit nach Herstellerprotokoll (Qiagen) in den pGEM-T Vektor ligiert (Promega). Dieser Klonierungsvektor zeichnet sich durch seine überhängenden Desoxythymidine aus und ist speziell für den Zweck, PCR-Produkte aufzunehmen, erstellt worden. Die DNA wurde in den *E. coli*-Stamm TG1 transformiert. Nach Blau-/Weiß-Selektion auf X-Gal-Platten wurden weiße Kolonien, welche das Insert enthalten können, in 3 ml LB/Ampicillin überimpft. Nach Verifizierung der positiven Klone mittels PCR oder DNA-Minipräparation und Restriktionsanalyse wurden sie in 50 ml LB/Ampicillin vermehrt und die Plasmide präparativ aufgearbeitet.

### 2.2.1.9 Ligation

Ligationen wurden mit der T4-DNA-Ligase (NEB) in einem 10 µl Ligationsansatz durchgeführt. Vektor und Fragment wurden nach Abschätzung auf einem Agarosegel oder photometrischer Bestimmung der DNA Konzentration im molaren Verhältnis 1:3 eingesetzt. Die Ligationsansätze wurden bei 16°C für 12-16 Stunden bei überhängenden Enden oder bei Raumtemperatur für 16 Stunden bei glatten DNA-Enden inkubiert.

### 2.2.1.10 Reinigung von präparativen PCR-Ansätzen

Die präparativen PCR-Ansätze für die Klonierungen der Konstrukte 4, 34, 234 und 678 wurden nach einem Kontrollgel über eine Silica-Gel-Membran gereinigt. Der PCR-Ansatz wurde ölfrei in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und mit dH<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt.

5 Volumen Puffer PB wurden zugefügt und auf die Säule gegeben. Nach 1 Minute Zentrifugation bei 6000 Upm wurde mit 750 µl Puffer PE gewaschen und zentrifugiert. Die Elution erfolgte mit zweimal 15 µl dH<sub>2</sub>O in ein neues Mikroreaktionsgefäß. 5 µl des Eluats wurden auf ein Kontrollgel gegeben, um das molare Verhältnis des PCR-Produktes zum Vektor für die folgende Ligationsreaktion abschätzen zu können.

### **2.2.1.11 Reisolierung von DNA-Fragmenten mit TaKaRa Recochips**

Die Recochip-Technologie basiert auf 0,5 x 1 cm großen Cellulose Plättchen, mit denen ohne weitere Reagenzien DNA-Fragmente mit einer Ausbeute von 70-80 % aus Agarosegelen isoliert werden. Zur Reisolierung von DNA-Fragmenten wurde die Probe (Karyopherin  $\alpha$ 4 Magen-spezifisches PCR Produkt, 450 bp) auf einem 1 % Gel aufgetrennt. Auf einem UV-Transilluminator wurde das Gel kurz hinter der zu isolierenden Bande, auf der Anodenseite, eingeschnitten und der Recochip in den Gelschlitz in vorgegebener Orientierung eingeführt. Nach weiterer Elektrophorese für 5 Minuten wurde der Chip in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation 5 s bei 14000 Upm in einer Eppendorf Tischzentrifuge wurden 30 µl DNA-Lösung erhalten. Die erhaltene DNA hatte einen Reinheitsgrad der ausreichte, um Sequenzier- oder PCR-Reaktionen zur weiteren Amplifikation des Fragments durchzuführen.

### **2.2.1.12 Sequenzierung von DNA**

Sequenzierungen erfolgten nach einem modifizierten Verfahren der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977). Im Ansatz sind Didesoxyanaloga der vier verschiedenen dNTP enthalten, die je nach Base, mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. In der Reaktion führt die Verwendung eines ddNTP zum vorzeitigen Abbruch der Reaktion. Durch Auftrennung der verschiedenen Abbruchprodukte auf einem Polyacrylamidgel können die Farbstoffe der unterschiedlichen Fragmente mit einem Laser angeregt werden. Das emittierte Licht, der verschiedenen Succenylfluorescine hat eine spezifische Wellenlänge. Die über Photomultiplier verstärkten und anschließend detektierten Signale werden während des Gellaufs erfasst und mit geeigneter Software ausgewertet. Die Sequenzierungen wurden entsprechend dem mitgelieferten Protokoll zum "Dye Terminator Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems) in einer Einzelreaktion für jedes Konstrukt angesetzt. In diesem Kit wird eine modifizierte Form der *Taq*-Polymerase verwendet, die keine 5'→3' Exonucleaseaktivität mehr aufweist und zwischen Didesoxy- und Desoxynukleotiden kaum unterscheidet.

Außerdem wird anstelle von dGTP in diesem Kit dITP verwendet, um Haarnadelschleifenbildung der ssDNA zu vermeiden.

In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden 0,2 µg DNA, 4 µl Terminator Mix und 5 pmol Primer für den Reaktionsansatz verwendet. Die Proben durchliefen im Thermal Cycler (Perkin Elmer DNA Thermal Cycler, TC1/480) folgendes Programm: 96°C 30 s, 60°C 15 s, 60°C 4 min, 25 Zyklen. Der Reaktionsansatz wurde mit 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2), 80 µl H<sub>2</sub>O und 2,5 Volumen Ethanol p.a. versetzt, gemischt und für 30 Minuten bei 14.000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 250 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet, in 3 µl Formamid /10 mM EDTA resuspendiert und bei -20°C bis zum Gellauf (durchgeführt von einem Mitarbeiter des Instituts) mit dem DNA-Sequenziergerät der Firma ABI (Modell 373A) aufbewahrt.

### 2.2.1.13 DNA-Fällung mit Ethanol

Die in Lösung befindliche zu fällende DNA wurde mit 1/10 Volumen Natriumacetat und 2,5 Volumen Ethanol versetzt, gemischt und anschließend 30 Minuten bei 4°C und 14000 Upm sedimentiert. Nach zweimaligem Waschen mit 70 % Ethanol wurde das Pellet bei RT 5 Minuten luftgetrocknet und anschließend in dem gewünschtem Volumen Wasser resuspendiert.

### 2.2.2 RNA-Standardmethoden

Zur Inaktivierung von RNasen wurden die zum Arbeiten mit RNA bestimmten Gefäße und Lösungen mit 1ml DEPC pro l versetzt und für 2-13 h bei 37°C inkubiert. Das DEPC wurde durch anschließendes Autoklavieren für 30 Minuten bei 121°C inaktiviert. Hitzelabile Substanzen wurden in DEPC-dH<sub>2</sub>O gelöst. Geräte, welche nicht autoklaviert werden konnten, wurden für 2 h in 0.5 M NaOH inkubiert und gut mit DEPC-dH<sub>2</sub>O gespült. Beim Arbeiten mit RNA wurden Einmalhandschuhe getragen.

**DEPC-dH<sub>2</sub>O:** 0.1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat in dH<sub>2</sub>O, Inkubation für 4-12 h bei 37°C und anschließendes Autoklavieren für 30 Minuten bei 121°C.

### 2.2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus *Xenopus* Embryonalstadien

Für Expressionsstudien und cDNA-Klonierungen wurde DNA-freie Gesamt-RNA aus *Xenopus* Embryonalstadien isoliert. 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 8faches Auf- und Absaugen der Probe in einer 1 ml-Einmalspritze mit G24-Kanüle wurden die Embryonen homogenisiert. Der Extrakt wurde bei 45°C für 45 Minuten inkubiert und phenolextrahiert (1 x 1 Vol. Phenol, 3 x 1 Vol. Phenol/Chloroform, 1 x 1 Vol. Chloroform). Nach der Zugabe von 1 Volumen 8 M LiCl wurde die RNA über Nacht bei –20°C gefällt. Das Pellet wurde nach der Zentrifugation (14.000 Upm, 10 min) in 100 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die RNA wurde durch Zugabe von 0,1 Volumen 10 M NH<sub>4</sub>-Acetat und 2,5 Vol. Ethanol durch Zentrifugation in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (14.000 Upm, 30 min, RT) gefällt und in 40 µl DEPC-dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Um kontaminierende genomische DNA zu degradieren, wurde die RNA-Lösung nach Zugabe von 2 µl RNase-freier DNase (20 U/µl, Boehringer), 5 µl 10 x DNase-Puffer, 2 µl 20 mM Dithiothreitol und 1 µl RNasin (40 U/µl, Stratagene) 30 Minuten 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 behandeltem H<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 behandeltem dH<sub>2</sub>O

### 2.2.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus adulten Geweben und Organen

Die entnommenen Gewebe und Organe wurden mit 1 x MBSH gewaschen (blutfrei). Die Gewebe und Organe wurden 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 unter 2.2.2.1 beschrieben durchgeführt.

### 2.2.2.3 Total-RNA Präparation von embryonalem Augengewebe

Da das SDS im Extraktionspuffer ausfallen kann, wurde dieser bei 45°C für 1 Stunde vorgewärmt. Mit Kanülen verschiedener Größe wurden 200 µl embryonales Augengewebe in 2 ml Extraktionspuffer homogenisiert und die Resuspension bei 45 °C für 5 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml RNase freiem dH<sub>2</sub>O wurden 800 µl Proteinase K Lösung

(Merk 0,1 mol/l in Tris-HCl pH 7,5) hinzugefügt und der Ansatz für 30 Minuten bei 45° C inkubiert. Anschließend wurden dem Ansatz erneut 800 µl Proteinase K Lösung hinzugefügt und der Ansatz für 30 Minuten bei 45° C inkubiert. Der Ansatz wurde auf 6 ml mit DEPC behandeltem dH<sub>2</sub>O aufgefüllt und mit 1 Volumen Phenol 5 Minuten bei 12000 Upm (Sorval SS34) zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine 5 malige Phenol / Chloroform Extraktion, gefolgt von mehrfacher Chloroform Extraktion bis keine Interphase mehr zu sehen war. Die obere Phase wurde mit 1 Volumen 8M LiCl über Nacht bei -20°C gefällt und 20 Minuten bei 12000 Upm und 4°C pelletiert. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 400 µl TE-Puffer gelöst und mit 1/10 Volumen Natrium-Acetat Lösung und 2,5 Volumen Ethanol bei -70 °C für 15 Minuten erneut gefällt. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 14000 Upm zentrifugiert, einmal mit 70 % Ethanol gewaschen und das trockene Pellet in 168 µl DEPC-dH<sub>2</sub>O gelöst. Die DNA wurde durch DNase 30 Minuten bei 37°C verdaut und der Ansatz auf 1 ml mit DEPC behandeltem H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Nach erneuter Phenol-, zweimaliger Phenol / Chloroform- und Chloroform-Extraktion, bis keine Interphase mehr zu sehen war, wurde die obere Phase von ca. 500 µl mit 1/10 Volumen Ammoniumacetat und 2,5 Vol. Ethanol für 2 Stunden bei -20°C gefällt und 15 Minuten bei 14000 Upm pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit 70 % Ethanol gewaschen und in 200 µl DEPC behandeltem H<sub>2</sub>O aufgenommen.

<b>DNA-Verdau:</b>	168 µl DEPC H <sub>2</sub> O 20 µl DNase Puffer 2 µl RNAsin 40 U/µl (Promega) 4 µl DTT 20 mM 6 µl DNase 10 U/µl (Roche Diagnostics)
<b>DNase-Puffer (10 x):</b>	400 mM Tris-HCl (pH 7,9), 100 mM NaCl, 60 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 1 ml DEPC-dH <sub>2</sub> O
<b>Extraktionspuffer (2 x):</b>	20 mM EDTA, 200 mM Tris (pH 7,6), 200 mM NaCl, 2 % SDS

### 2.2.2.4 Poly-A<sup>+</sup>-RNA Isolierung

Die verwendeten Puffer wurden auf 40°C vorgewärmt. Für 10 mg Total-RNA wurden 0,5 g Oligo(dT)-Cellulose mit 0,1 N NaOH vorgequollen und anschließend mit DEPC behandeltem H<sub>2</sub>O gewaschen. Eine 1 ml Spritze wurde mit 0,5 ml Oligo(dT)-Cellulose gefüllt und mit 3 Volumen DEPC behandeltem H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Säule wurde mit RNA-Säulenpuffer gespült bis der pH kleiner als 8 war. Präparierte Total-RNA wurde auf 70 °C für 5 Minuten erhitzt und anschließend auf Eis bis auf Raumtemperatur abgekühlt. Die RNA wurde mit 1 Volumen 2x RNA-Säulenpuffer auf die Säule gegeben und das Eluat aufgefangen. Das Eluat wurde 5 Minuten auf 70°C erhitzt und dann erneut auf die Säule geben. Die Säule wurde mit 1x RNA-Säulenpuffer gewaschen bis die gesammelten Fraktionen (0,5-1 ml) eine OD<sub>260</sub> von 0 hatten. Anschließend wurde die poly A<sup>+</sup>-RNA mit 0,5 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert. Nach OD<sub>260</sub> gesammelte positive 50 µl Fraktionen wurden zusammengefügt und mit 1/10 Volumen 10 M Ammoniumacetat, 1 µl Glycogen und 2,5 Volumen Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Das Pellet wurde mit 80 % Ethanol gewaschen und in 200 µl DEPC behandeltem H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Integrität der isolierten RNA wurde durch einen Northern Blot getestet.

**RNA-Säulenpuffer (2x):** 40 mM Tris HCl (pH 7,6), 1 M NaCl, 2 mM EDTA (pH 8,0),  
0,2 % SDS

**Elutionspuffer für poly A<sup>+</sup>-RNA :** 10 mM Tris HCl (pH 7,6), 1 mM EDTA (pH 8,0),  
0,5 % SDS

### 2.2.2.5 Northern Blot

Die Probe wurde mit Formamid Loading Dye auf einem 100 ml Formaldehyd-Agarosegel bei 100 V, 200 mA aufgetrennt. Nach Abschluß der Elektrophorese wurde das Formaldehyd durch 15 Minuten DEPC H<sub>2</sub>O, 15 Minuten 10x SSC, 15 Minuten 10x SSC Behandlung rausgewaschen. Die RNA wurde in einer gesockelten Wanne mit 20x SSC über Nacht auf eine Hybond-N Membran (Amersham) geblottet. Die Fixierung der RNA erfolgte im UV Crosslinker mit dem Standardprogramm. Die fixierte RNA wurde mit 0,04 % Methyleneblau in 0,5 M Natriumacetat (pH 5,2) unter 10-15 minütigem Schwenken angefärbt.

**Formaldehydgel-Laufpuffer (5x):** 0,1M MOPS (pH 7,0), 40 mM Natriumacetat,  
5 mM EDTA

**100 ml Formaldehyd-Agarosegel:** 1g Agarose in 60 ml DEPC behandeltem H<sub>2</sub>O

kurz aufkochen,

20 ml 5x Puffer hinzufügen,

wenn die Agarose handwarm ist, wird unter dem Abzug

22 ml 37 %ige Formaldehydlösung hinzugefügt und das

Gel anschließend gegossen.

### 2.2.2.6 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Zur Analyse der Expression klonierter Gene in Embryonalstadien, adulten Geweben und Organen oder zur Klonierung von cDNA wurde mRNA revers transkribiert und die erhaltene cDNA in der PCR amplifiziert. Hierbei wurde mit dem "RT-PCR Kit" (Perkin-Elmer) gearbeitet. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden bei allen Schritten filtergestopfte Pipettenspitzen verwendet. Die reverse Transkription von RNA wurde in einem Ansatz des RT-PCR Kits (Perkin Elmer) durchgeführt, der wie folgt zusammengesetzt war:

2 µl 10 x 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)

ad 20 µl RNase-freies dH<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde gemischt und mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Die reverse Transkription erfolgte in einem PCR-Gerät (Trio, Biometra) mit dem folgenden 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 einer PCR-Reaktion eingesetzt, jedem Ansatz wurden folgende Komponenten hinzugefügt:

8 µl 10 x 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, Perkin-Elmer)

ad 80 µl dH<sub>2</sub>O (Gesamtvolumen der Reaktion: 100 µl)

Die gewählte Zyklenzahl der analytischen RT-PCR befand sich möglichst im Bereich des linearen Anstiegs der Produktmenge. Die Produkte wurden im Agarosegel analysiert.

### 2.2.2.7 Smart RACE-Ready cDNA

Die Karyopherin  $\alpha$  Varianten 4, 5.1 und 5.2 wurden mit der 3' RACE Methode auf Testis Gesamt-RNA isoliert. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben (Clontech, SMART RACE cDNA Amplification Kit User Manual PT3269-1). Die Karyopherinvariante  $\alpha 4$  wurde mit dem Ialp431F und die Karyopherin  $\alpha 5.1$  und 5.2 Varianten mit dem Ialp533F Primer in der PCR amplifiziert. Für die Erststrangsynthese wurde folgender Ansatz erstellt:

1  $\mu$ l Testis Gesamt RNA  
1  $\mu$ l 3'-CDS Primer  
3  $\mu$ l H<sub>2</sub>O bei 70 °C  
für 2 Minuten auf 70°C erhitzt  
auf Eis 2 Minuten  
2  $\mu$ l Erststrangsynthesepuffer (5x)  
1  $\mu$ l DTT 20 mM  
1  $\mu$ l dNTP 10 mM  
1  $\mu$ l MMLV Reverse Transkriptase  
2 Stunden 42 °C  
50  $\mu$ l Tricine-EDTA Puffer  
7 Minuten 72 °C  
34,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O  
5  $\mu$ l Advantage PCR-Puffer 2  
1  $\mu$ l dNTP 10 mM  
1  $\mu$ l Karyopherin  $\alpha$  Primer 1 pmol/ $\mu$ l

Es wurde folgendes Programm für die PCR verwendet:

5 Zyklen: 5 Sekunden 94°C, 3 Minuten 72 °C  
5 Zyklen: 5 Sekunden 94°C, 10 Minuten 70 °C  
32 Zyklen: 5 Sekunden 94°C, 10 Minuten 68 °C  
3 Minuten 72°C

Die PCR Produkte wurden in den pGEM-T Klonierungsvektor ligiert und in *E. coli* TG1 transformiert.

### 2.2.2.8 *In vitro*-Synthese markierter RNA-Sonden

Zur Synthese von markierten antisense-RNA-Sonden für *in situ* Hybridisierungen wurden *in vitro* Transkriptionen in Anwesenheit von Digoxigenin-markiertem rUTP durchgeführt. Als "template" für die RNA-Polymerase diente linearisierte Plasmid-DNA, die mit dem "RNeasy

Mini Kit" (Qiagen) aufgereinigt worden war. Ein Transkriptionsansatz (RNA Transkriptions-Kit, Stratagene) setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

5  $\mu$ l 5 x Transkriptionspuffer  
je 1  $\mu$ l 10 mM rATP, rCTP, rGTP, 0.64  $\mu$ l 10 mM rUTP  
0.36  $\mu$ l 10 mM Digoxigenin-rUTP (Boehringer)  
1  $\mu$ l 0.75 M DTT, 1  $\mu$ l RNAsin (40 U/ $\mu$ l)  
5  $\mu$ l linearisierte Matrizen-DNA (0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l, in RNase-freiem dH<sub>2</sub>O)  
1  $\mu$ l T3, T7 oder SP6-RNA-Polymerase (10 U/ $\mu$ l)  
ad 25  $\mu$ l RNase-freies dH<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend die DNA-Matrize durch Zugabe von 2  $\mu$ l RNase-freier DNase I (Boehringer) 15 min bei 37°C verdaut. Die RNA-Sonde wurde mit Hilfe des Reaktionssystems "RNeasy Mini Kit" oder im 96er Maßstab mit Sephadex G50 Säulen aufgereinigt.

### **2.2.2.9 Aufreinigung synthetischer RNA mit "RNeasy Mini Kits"**

Um synthetische RNA von Salzen, Enzymen und Nukleotiden abzutrennen, wurden die Ansätze mit Hilfe des "RNeasy Mini Kits" (Qiagen) aufgereinigt. Der Reaktionsansatz wurde dazu mit RNase-freiem dH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 100  $\mu$ l aufgefüllt und 350  $\mu$ l Puffer RLT sowie 250  $\mu$ l Ethanol wurden hinzupipettiert. Nach dem Mischen wurde die Lösung auf eine RNeasy-Säule übertragen und 15 s bei 10.000 Upm zentrifugiert. Es wurde zweimal mit je 500  $\mu$ l Puffer RPE gewaschen und die Säule trocken zentrifugiert. Die RNA wurde zweimal mit 15  $\mu$ l RNase-freiem dH<sub>2</sub>O in ein frisches Eppendorfgefäß eluiert.

### **2.2.2.10 Aufreinigung synthetischer RNA mit Sephadex-G50 Säulen**

Für die Durchmusterung einer cDNA-Bank aus embryonalem Augengewebe wurde synthetische RNA im 96er Platten Maßstab angefertigt und mit Säulen chromatographisch aufgetrennt. Für die Trennung der synthetischen RNA wurden Plastikplatten mit 96, 2 cm Vertiefungen, die unten mit einem Celluloseflies abschließen, mehrmals mit DEPC behandeltem Wasser gespült und anschließend mit in G50-Lagerlösung vorgequollenem Sephadex-G50 aufgefüllt. Die G50-Matrix wurde bei 1200 Upm für 30 Sekunden sedimentiert und mit je 50  $\mu$ l 1x STE-Puffer äquilibriert. Nach erneuter Zentrifugation für 2 Minuten bei 1200 Upm wurde eine neue Auffangplatte mit 96 Vertiefungen unter die Säulen gestellt und die Proben (ca. 20  $\mu$ l) wurden auf die Säulen geladen. Die Elution erfolgte bei

1200 Upm für 4 Minuten. Das Eluat wurde sofort mit 25 µl Formamid versetzt. Davon wurden 5 µl für ein 1 %iges Agarosekontrollgel verwendet.

**G50-Lagerlösung:** 0,3 M NaCl, 0,1 % SDS, 50 mM Tris (pH 7,5)

**10x STE Puffer:** 20 mM Tris (pH 7,5), 2 mM EDTA, 50 mM NaCl

### 2.2.3 Protein-Standardmethoden

#### 2.2.3.1 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

SDS-Gele wurden nach Laemmli *et al.*, 1970 gegossen. Sie waren 8 x 10 cm groß und 1 mm dick. Durch die Verwendung von zwei aufeinanderfolgenden Gelsystemen (Sammelgel und Trenngel) mit unterschiedlichem Vernetzungsgrad kann ein erhöhter Trenneffekt erzielt werden.

<b>Trenngel:</b> 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8)	<b>Sammelgel:</b> 0,125 M Tris-HCl (pH 6,8)
0,1 % SDS	0,1 % SDS
10 % Acrylamid	5 % Acrylamid
0,2 % Bisacrylamid	0,2 % Bisacrylamid

Die Polymerisation fand in Gegenwart von APS (Ammoniumpersulfat) und TEMED bei Raumtemperatur statt. Die Proben wurden in 20 bis 30 µl SDS-PAGE Proben Puffer verdünnt, 3 min gekocht und vor dem Auftragen auf das Gel 4 min in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Elektrophorese erfolgte mit 100 V und 35 mA, bis das Bromphenolblau die Phasengrenze zum Sammelgel erreichte, dann erfolgte die Trennung bei 300 V und 35 mA. Als Laufpuffer wurde Laemmli-Puffer (25 mM Tris·HCl, 192 mM Glycerin und 1 % SDS) verwendet. Gele für die Trennung von radioaktiv markierten Proteinen wurden auf einem Gelrockner unter Vakuum bei 65°C getrocknet und zur Exposition in Kassetten für den Phosphoimager (Molecular Dynamics) eingelegt. Gele für unmarkierte Proteinproben wurden mit Coomassie-Färbelösung 1 h angefärbt. Die Hintergrundfärbung der Gele wurde durch mehrmaliges Erhitzen auf ca. 60°C und wechseln der Entfärbelösung (10 % Essigsäure und 35 % Methanol) aus dem Gel herausgewaschen. Das Gel mit den jetzt sichtbaren Proteinbanden wurde dann zwischen zwei Zellglasfolien eingespannt und in einem Heißluftofen der Firma Bio-Rad getrocknet. Zur Dokumentation wurden die Gele mit einem handelsüblichen Scanner eingescannt.

### **Proteingrößenstandard für Gele mit unmarkierten Proteinproben "Broad Range**

**Marker" (Biorad):** Myosin 200 kd,  $\beta$ -Galactosidase 116,25 kd, Phosphorylase B 97,4 kd, BSA 66 kd, Ovalbumin 45 kd, Carboanhydrase 31 kd, Trypsininhibitor 21,5 kd, Lysozym 14,3 kd

### **Proteingrößenstandard für Gele mit radioaktiv markierten Proteinproben <sup>14</sup>C-**

**methyliert:** (5  $\mu$ Ci/ml, Amersham): Myosin 200 kd, Phosphorylase B 97,4 kd, BSA 69 kd, Ovalbumin 46 kd, Carboanhydrase 30 kd, Lysozym 14,3 kd (0,833  $\mu$ Ci/ ml Protein)

#### **2.2.3.2 Expression von GST-Fusionsproteinen**

Für Interaktionsstudien von Transportfaktoren und verschiedenen Substraten wurden die jeweiligen Gene in den pGex5x3 bzw. pGex5x1 kloniert. Beide Expressionsvektoren besitzen direkt hinter der kodierenden Sequenz von GST eine MCS. Für die Expression der GST-Fusionsproteine wurden BL21 (DE3) Zellen verwendet. Zur Induktion der Expression wurde dem Medium 1mM IPTG hinzugefügt. Mit einer frischen Einzelkolonie wurden 10 ml Vorkultur in einem 12 ml PPN-Röhrchen (Greiner) mit LB/Ampicillin und 2 % Glucose inokuliert und in einem Rundschüttelinkubator (New Brunswick Scientific, Edison, NY, USA) bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 100 ml LB/Ampicillin mit 10 ml der Vorkultur angeimpft und bis zur logarithmischen Wachstumsphase  $OD_{550} = 0,7$  unter Schütteln bei 37°C angezogen. Durch Zusatz von 1 mM IPTG (200 mM Stocklösung) wurde die Expression der GST-Fusionsmutanten gestartet. Nach weiterer Kultivierung für 3h bei 30°C wurden die Zellen geerntet und bei 5000 Upm in einer Sorvall CL6B-Kühlzentrifuge mit GSA-Rotor (DuPont, Bad Homburg) 10 min pelletiert. Die Zellen wurden in Z-Puffer mit 1  $\mu$ g/ml Pepstatin A (Stocklösung: 1 mg/ml in EtOH), 10  $\mu$ g /ml Aprotinin (Stocklösung: 10 mg/ml in H<sub>2</sub>O), 1  $\mu$ g/ml Leupeptin (Stocklösung: 1 mg/ml in H<sub>2</sub>O), 1 mM PMSF (frische Stocklösung: 1 M in Isopropanol) und 1 mM DTT resuspendiert. Alternativ zu den einzelnen Proteaseinhibitoren wurde eine Tablette „Complete, EDTA-free“ (ein Proteasen-Inhibitoren-Gemisch der Firma Roche) auf 50 ml Puffer verwendet. Bei einem Resuspensionsvolumen von 5 ml erfolgte die Zugabe von 1 ml Lysozym (10 mg/ml frisch angesetzt in 10mM Tris, pH 8,0), 2  $\mu$ l DNase und 5  $\mu$ l RNase. Nach einer Inkubation von 30 - 60 Minuten auf Eis wurden die Zellen durch Sonifikation (Leistung 3, Puls 60, 4x 30 s) auf EtOH-Eis aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 10 g (12000 Upm, Sorvall CL6B-Kühlzentrifuge, SS43 Rotor) pelletiert, der Überstand in 2 ml Aliquots aufgeteilt, mit flüssigem N<sub>2</sub> Schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

### 2.2.3.3 TFIIIA Induktion

Die Induktion der TFIIIA-GST-Fusionsmutante erfolgte mit 1 mM IPTG und zusätzlich 100  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>.

### 2.2.3.4 Präparation von Glutathion Agarose und Bindungsprotein

Für die Herstellung von GST-Pellets wurden 20 mg GT-Agarose (Sigma, G4510) pro 100 ml Kulturvolumenäquivalent in 2 ml Z-Puffer pro 10 mg GT-Agarose 1 Stunde bei 4°C rotiert. Die aufgequollene GT-Agarose wurde 1 Minute bei 800 Upm und 4 °C abzentrifugiert und zweimal mit Z-Puffer gewaschen, bevor geeignete Mengen an *E. coli* Proteinextrakt hinzugefügt wurden. Das Gesamtvolumen wurde mit Z-Puffer (1mM DTT und Proteaseinhibitoren) auf 0,5-1 ml eingestellt. Nach 2h Rotation bei 4°C wurden die Pellets zweimal mit Bindungspuffer gewaschen und in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße aliquotiert. Je ein Ansatz der aliquotierten Pellets wurde für eine Kontrolle der GST-Fusionsproteinbindung an die GT-Agarose verwendet.

### 2.2.3.5 „Pull-down assay“ für *in vitro* translatierte Proteine

Den Pellets aus 2.2.3.2 wurde 1 ml Bindungspuffer mit 1 mM DTT, Proteinaseinhibitoren und 2 mg/ml BSA hinzugefügt. Nach Zugabe von normierten Mengen an *in vitro* TNT-Ansätzen wurden die Bindungsansätze 1 Stunde bei 4 °C rotiert. Die Pellets wurden sechsmal mit Bindungspuffer gewaschen, bevor die gebundenen Proteine in 20  $\mu$ l SDS-PAGE Proben Puffer gelöst wurden. Die Proben wurden bei 100 °C für 5 Minuten gelöst, abzentrifugiert und der Überstand auf ein 10 %iges Polyacrylamidgel auftragen.

### 2.2.3.6 Fluoreszenzdetektion von transient transfizierten HeLa Zellen

Zwei Tage nach der Transfektion erfolgte die Detektion der Genprodukte. Die adhären auf den Glasplättchen gewachsenen Zellen wurden zweimal in 6-Well-Kulturschalen mit PBS-Puffer gewaschen und mit 3 ml 3 % Paraformaldehyd in PBS für 10 Minuten bei RT fixiert. Nachdem die Zellen zwei mal mit 5 ml PBS gewaschen wurden, erfolgte eine Inkubation mit 3 ml 0,5 % Triton X-100 in PBS für 10 Minuten bei RT. Die Tritonlösung wurde durch zweimaliges Waschen mit 5 ml PBS entfernt. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation in 3 ml 3 % Bovine Albumin Fraktion V in PBS (Blocklösung) für 10 Minuten bei RT abgedeckt. Um Verdunstung der Reaktionslösungen während der Antikörperinkubationen zu verhindern, erfolgte eine Überführung der Deckgläser in eine feuchte Inkubationskammer. Der Primär-Antikörper wurde in einer

Verdünnung von 1:1000 in Blocklösung für 1 h bei 37°C mit einem Volumen von 100 µl auf die Zellen gegeben. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Carboxymethylindocyanin (Cy3) gekoppeltem Antikörper in einer Verdünnung von 1:200. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in DAPI-Einbettungsmedium auf einem Objektträger eingebettet und die Kanten der Glasplättchen mit Nagellack versiegelt. Nachdem der Nagellack ausgehärtet war, erfolgte die Visualisierung am Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2). Das Anregungsmaximum von Cy3 liegt bei 553 nm, das Emissionsmaximum im Bereich der roten Farbe bei 575 nm. Die Zellkerne wurden durch den DNA-bindenden DAPI-Farbstoff sichtbar gemacht.

### **2.2.4 Bakterien und Zellkultur**

#### **2.2.4.1 Elektrokompente Zellen**

Die verschiedenen *E. coli* Stämme wurden auf nicht selektivem Minimal- oder LB-Agar ausplattiert und 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Von einer Einzelkolonie wurden 5ml LB-Medium beimpft und 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 800 ml LB-Medium in einem sterilen Erlenmeyerkolben beimpft und bei 37°C und 200 rpm geschüttelt, bis die Kultur zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 angewachsen war. Die Zellen wurden dann im Eisbad gekühlt und bei 5000 rpm 10min zentrifugiert (Sorvall CL6B-Kühlzentrifuge mit GSA-Rotor DuPont, Bad Homburg). Die Zellen wurden mehrmals mit 10%igem sterilen Glycerin gewaschen und konzentriert. Für die Waschschritte wurde 1 Volumen, ½ Volumen und 1/20stel des Ausgangsvolumens eingesetzt. Die Zellen wurden nach den Waschgängen in 2 ml 10%igem Glycerin resuspendiert und in 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -70°C aufbewahrt.

#### **2.2.4.2 Elektrotransformation**

Die Zellsuspension wurde auf Eis aufgetaut und mit 1/5 Volumen des Ligationsansatzes versetzt. Nach Resuspension wurde der Transformationsansatz luftblasenfrei in Elektroporationsküvetten (Eurogentech) mit einem Elektrodenabstand von 1 mm überführt. Die Suspension wurde vollständig auf den Küvettenboden zwischen die beiden Aluminium-Elektroden mit einem Abstand von 2 mm geklopft. Die Küvette wurde verschlossen in das Elektrotransformationsgerät („E. coli Pulser“, BIORAD Laboratories GmbH München)

gestellt. Der Strompuls erfolgte bei 2,5 kV, 25  $\mu$ F und 200  $\Omega$  parallel zur Probe. Die Pulsdauer lag zwischen 4,0 und 4,9 ms. Unmittelbar nach erfolgtem Strompuls wurden die transformierten Bakterien mit 500  $\mu$ l LB-Medium aus der Küvette herausgespült und in ein 1,5 ml Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden 15-30 min unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Auf Selektiv-LB-Agar wurden 50-100  $\mu$ l ausplattiert und 12-16 Stunden bei 37°C inkubiert.

### 2.2.4.3 alpha-Komplementation

Pro Selektiv-Platte (LB-Agar, 100  $\mu$ g Ampicillin/ml) wurde ein Mix aus 30  $\mu$ l IPTG-Lösung und 30  $\mu$ l X-Gal-Lösung ausplattiert. Nach einer Stunde wurden 50  $\mu$ l des Transformationsansatzes auf den Platten ausplattiert. Nach 16 Stunden Inkubationszeit wurden die weißen Kolonien, welche ein Insert aufgenommen hatten und somit das lacZ-Gen des Vektors unterbrochen hatten, mit sterilen Zahnstochern in 3 ml Vorkultur überführt.

**IPTG-Lösung:** 0,24g IPTG / 10 ml H<sub>2</sub>O nach Sterilfiltration in 1 ml Aliquots bei -20°C gelagert.

**X-Gal-Lösung:** 2 % 5-Chlor-4-Brom-3-Indodyl-b-D-Galactosid in Dimethylformamid gelöst und bei -20°C gelagert.

### 2.2.4.4 Gewinnung von HeLa Zellen für transiente Transfektion

Um Zellen für Tranfektionen zu gewinnen, wurden zwei Tage alte HeLa-Zellkulturen in 250 ml Kulturschalen einmal mit 5 ml PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin-Lösung (0,05 % Trypsin w/v und 0,2 % EDTA w/v in PBS, Biochrom KG, Berlin), versetzt. Unter leichten Schwenken wurden die Zellen 2 Minuten lang gelöst und 4 Minuten bei 1000 Upm abzentrifugiert. Die Zellen wurden mit 10 ml PBS gewaschen und auf  $1 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml MEM-Medium eingestellt. Die Zellzahl wurde mit einem Zell-Zählgerät CASY 1 (Schärfe System, Reutlingen) bestimmt. Dazu wurde das Gerät 3 mal vorgespült, anschließend wurden 10  $\mu$ l der Zellsuspension in 10 ml Isoton (Schärfe System) ausgezählt.

### 2.2.4.5 Transiente Transfektion von HeLa Zellen durch Elektroporation

Durch Elektroporation werden die Zellen, welche DNA aufnehmen sollen, durch einen Stromstoß kurzzeitig permeabilisiert, so dass die Plasmide in die Zelle gelangen können. 20

$\mu\text{l}$  der zu transfizierenden DNA wurden in einer Konzentration von  $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  zu  $5 \times 10^4$  bis  $5 \times 10^5$  HeLazellen in  $500 \mu\text{l}$  MEM-Medium in eine Elektroporationsküvette mit  $4 \text{ mm}$  Elektrodenabstand gegeben. Die Elektroporation erfolgte bei  $240\text{V}$  mit einer Kapazität von  $1350 \mu\text{F}$  und einem Ableitungswiderstand von  $156 \text{ Ohm}$  (Schwamborn, 1998). Lag die Pulsdauer über  $20 \text{ ms}$  und die Differenz von Ableitungswiderstand (gemessen) zum Impuls-widerstand bei mindestens  $25 \text{ kOhm}$ , wurden die Zellen nach Zugabe von  $2 \text{ ml}$  MEM-Medium auf  $4$  bis  $5$  mit UV-Licht sterilisierten Glasplättchen in Kulturschalen ( $6$  Vertiefungen) mit  $3 \text{ ml}$  vorgelegtem MEM-Medium ausgebracht. Die Zellen wurden bei  $37^\circ\text{C}$  unter  $5 \%$   $\text{CO}_2$  Begasung (v/v) inkubiert. Nach  $24 \text{ h}$  wurde das Medium mit den toten Zellen abgesaugt. Die Zellen wurden mit  $5 \text{ ml}$  PBS gewaschen und in MEM-Medium weitere  $24 \text{ h}$  inkubiert. Dann wurde die immunologische Fluoreszenzdetektion des Genprodukts der transient mit Plasmiden transfizierten HeLa Zellen wie in 2.2.3.6 durchgeführt.

### **2.2.4.6 Transiente Transfektion von HeLa Zellen durch Lipofektion**

Einführung von DNA mit bis zu  $130 \text{ kb}$  in die Zellen mit Liposomen ist ein Verfahren bei dem  $0,025$  bis  $5 \mu\text{m}$  große Phospholipidvesikel mit DNA beladen werden, und die dann bei der Transfektion mit der Zellmembran der Zielzelle fusionieren und ihren Inhalt in das Cytoplasma freisetzen. Wie die DNA in den Zellkern gelangt ist z.Z. noch ungeklärt.

Für die Transfektion wurden am Vortag  $5 \times 10^4$  HeLa Zellen auf  $4$  bis  $5$  Glassplättchen mit  $1 \text{ cm}$  Durchmesser in Kulturschalen ausgesät. Die Zellen wurden einmal mit Medium gewaschen, optisch auf die Zelldichte kontrolliert (ca.  $1,25 \times 10^4$ ) und mit  $2 \text{ ml}$  MEM-Medium überschichtet. Um die Liposomen zu beladen, wurden  $94 \mu\text{l}$  serumfreies MEM-Medium mit  $6 \mu\text{l}$  Fugene 6 für  $5$  Minuten bei RT vorinkubiert. Diese Suspension wurde tropfenweise auf die in einem zweiten Mikroreaktionsgefäß vorgelegte DNA ( $2 \mu\text{l}$ ,  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) gegeben. Nach  $15$  Minuten Inkubation bei RT wurden die beladenen Liposomen auf die adhären auf Glasplättchen gewachsenen Zellen gegeben. Das Medium wurde nach  $6$  bis  $10 \text{ h}$  Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5 \%$   $\text{CO}_2$  (v/v) gewechselt. Nach weiteren  $24 \text{ h}$  Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  wurden die Zellen mit PBS gewaschen und das Genprodukt wie unter 2.2.3.6 beschrieben nachgewiesen.

### **2.2.5 Erstellung einer Lamda-cDNA-Bank aus embryonalem Augengewebe**

Zur Erstellung der cDNA-Bank aus embryonalem Augengewebe wurde poly-A<sup>+</sup>-RNA wie unter 2.2.2.4 angegeben weiterverwendet. Für die Synthese der cDNA und die anschließende Größenfraktionierung, die Überführung in Phagen und folgendem Transfer in Bakterien wurde streng nach Herstellerprotokoll verfahren. Verwendet wurde das ZAP Express cDNA

Synthesis Kit und das Gigapack III Gold Cloning Kit von Stratagene in der Revision #200403-12.

**ZAP Express Primer:** 5' -GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAGTACTAG**TCTCGA**GTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

**ZAP Express Linker:** 5' -OH-**AATTC**GGCACGAGG-3'  
3' -**GCCGTGCTCC**p-5'

**Vorgehensweise:** Die Erststrangsynthese erfolgte auf poly-A<sup>+</sup>-RNA, die wie in 2.2.2.4 angegeben isoliert wurde, in einer RT-Reaktion mit einem Primer der in 5'→3' Orientierung GA-Sequenzwiederholungen gefolgt von einer Xho I Schnittstelle und einer 18 Basen langen poly dT Sequenz enthält. Der verwendete Nukleotidmix enthielt 5-Methyl-dCTP. In der Zweitstrangsynthese wird dem Ansatz RNase H in geringer Konzentration zugegeben, so dass mehrere Unterbrechungen der an den Erststrang gebundenen RNA entstehen. Die Fragmente dienen der Polymerase I als Primer für die Zweitstrangsynthese („Nick“-Translation). In der Zweitstrangsynthese wird dem Ansatz dCTP zugesetzt, um den Einbau von 5-Methyl-dCTP zu reduzieren. Anschließend wurden die Enden des hemimethylierten DNA Doppelstrangs mit *Pfu* DNA Polymerase geglättet. Nach Phenol und Phenol / Chloroformextraktion wurde ein Eco RI Oligonukleotid, kompatibel zu einer geschnittenen Eco RI Schnittstelle an die hemimethylierte DNA ligiert. Nach Hitzeinaktivierung der Ligase erfolgte eine Phosphorylierung der Eco RI Enden mit der T4 Polynukleotidkinase. Das Enzym wurde ebenfalls hitzeinaktiviert. Der folgende Xho I Verdau sollte vorwiegend an der Stelle des ersten Primers stattfinden, da nur dort der hemimethylierte Doppelstrang kein 5-Methyl-dCTP enthalten sollte. Die DNA Fragmente mit Xho I und Eco RI kompatiblen überhängenden Enden wurden über eine CL-2B Sepharose (in STE-Puffer) Säule größenfraktioniert, Phenol / Chloroform extrahiert und gefällt. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 5 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Fraktionen mit den gewünschten cDNA Fragmenten wurden durch Auftropfen eines 0,5 µl Aliquots auf 0,8 % Agarose mit 1 ng/ml Ethidiumbromid und anschließender Transillumination unter UV-Licht im Vergleich zu einem Standard identifiziert und quantifiziert. Die erhaltenen Mengen (weniger als 10 ng/Fraktion) wurden über Nacht in einem 5 µl Ansatz bei 12°C in den pBK-CMV Phagemid Vektor ligiert. Je ein Aliquot von 3 µl des Phagemidvektors wurde in die Hüllproteine von Phagen verpackt (2 Stunden, 22°C). Mit den Phagen wurden XL1Blue MRF' Zellen wie unter 2.2.6.1 infiziert.

### 2.2.6 Arbeiten mit Phagen

#### 2.2.6.1 Phagenfraktionierung

Für dieses Verfahren wurden 5 ml LB, Tetracyclin 12,5 µg/ml, 0,2 % Maltose, 10 mM MgSO<sub>4</sub> mit einer XL1Blue MRF' Einzelkolonie von einer frischen Kulturplatte inokuliert. Nach 12 h Inkubation der Vorkultur bei 37°C wurden 20 ml LB, 0,2 % Maltose, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, Tetracyclin 12,5 µg/ml mit 20 µl der frischen Vorkultur inokuliert und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub>=1 inkubiert. Die Kultur wurde in 10 mM MgSO<sub>4</sub> auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 eingestellt und bis zur Verwendung (maximal 2 Tage) bei 4°C gelagert. Für die Phagenanheftung wurden 2,5 µl und 25 µl einer Phagenverdünnung von 1:100 und 1:1000 auf 200 µl SM Puffer gegeben, mit 200 µl der eingestellten XL1Blue MRF' Zellen versetzt und für 15 Minuten bei 37°C mit 80 Upm geschwenkt. Nach Aufnahme der Zellen in 7,6 ml NZY wurden sie zu je 100µl auf 96-er Mikrotiterplatten aliquotiert und über Nacht bei 37°C und 100 Upm geschwenkt. Die Identifikation von Fraktionen mit durch den Verdünnungsschritt angereichertem Phagenmaterial erfolgte durch PCR-Analyse mit geeignet niedriger Zyklenzahl. Um die Fraktionen mit dem anzureicherndem Phagenmaterial zu identifizieren, wurden zunächst die Vereinigungen (Pool) aus 8 Reihen einer Platte für eine PCR-Analyse eingesetzt. Von den vereinigten Fraktionen, die ein positives Signal in der Analyse zeigten, wurde eine PCR-Analyse der Einzelfraktionen vorgenommen. Positive Einzelfraktionen wurden zur Konservierung der Phagen mit 5 µl Chloroform versetzt, gemischt und, um die Zelltrümmer und Bakterien abzutrennen, kurz anzentrifugiert. Die obere phagenhaltige Phase wurde in 1:100 oder nach mehreren Anreicherungschritten auch in einer 1:1000 Verdünnung für eine weitere Amplifikationsrunde eingesetzt.

Ansatz (1x) für eine PCR-Analyse auf Phagen:

- 2,3 µl 10 x PE-Puffer (Perkin Elmar)
- 1,8 µl dNTP 2,5 mM
- 3,4 µl Primer 1 (1 pmol/µl)
- 3,4 µl Primer 2 (1 pmol/µl)
- 11,1 µl H<sub>2</sub>O
- 0,1 µl Ampli-Taq-Polymerase (Perkin Elmer)
- 0,5 µl Phagenlösung
- 22,5 µl Ansatz

PCR-Programm: 2 min 96 °C, dann 42 Zyklen: 1 min 96 °C, 45 s 48 °C, 30 s 72 °C, abschließend 2 min 72 °C

### 2.2.6.2 Phagenplattierung zur Isolierung von Einzelplaques

Für die Isolierung einer homogenen Phagenpopulation wurden 2 µl einer Phagenverdünnung von 1: 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 2 x 10<sup>3</sup> oder 2 x 10<sup>4</sup> in 200 µl SM Puffer aufgenommen und mit 200 µl vorbereiteter XL1Blue MRF<sup>+</sup> Zellen OD<sub>600</sub>=0,5 (siehe 2.2.6.1) versetzt. Nach 15 Minuten Inkubation bei 37°C und 80 Upm wurden die Zellen mit 3 ml Topagar (48°C) versetzt, durch rollen gemischt und auf RT vorgewärmte NZY-Agarplatten (d=9.5 cm) gegeben, durch Schwenken gleichmäßig verteilt und nach Erstarren des Topagars über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelne Phagenplaques von ca. 1 mm Durchmesser wurden mit der Spitze einer Pasteurpipette ausgestochen und in je 100 µl SM-Puffer überführt und bei 4°C über Nacht geschwenkt. Die Plaque-Suspensionen wurden durch PCR getestet. Positive Einzelplaques wurden nach Zugabe von 50 µl Chloroform bei 4°C in 1,5 ml-Eppendorfgefäßen gelagert. Um die Reinheit des Phagen sicherzustellen, wurden Aliquots der positiven Einzelphagensuspension erneut ausplattiert und ausgestochen. Da die ausgestochenen Phagenplaques in der PCR erneut positiv waren, wurde davon ausgegangen, dass ein homogener Klon vorlag.

### 2.2.6.3 Erstellen einer konzentrierten Phagenlösung

Für die Exzision eines Phagemids samt cDNA-Insertionsfragment aus einem Phagen wurde eine hohe Konzentration des Phagen („high titer“) benötigt. Dazu wurden solche Phagenmengen plattiert, die ein konfluentes Wachstum der Phagenklone erzielten. Zur Isolierung der Phagen aus dem Agar wurden 15 ml SM-Puffer auf den Top-Agar einer Platte gegeben. Um die Phagen zu lösen, wurden die Platten 3 h bei RT geschwenkt und der Überstand in ein 15 ml Falcongefäß (Falcon 2096) überführt. Nach Zugabe von 450 µl Chloroform wurde der Ansatz gemischt und über Nacht bei 4°C gelagert. Die Röhrchen wurden für 10 Minuten bei 10.000 Upm zentrifugiert und der Überstand in neue Gefäße überführt. Nach Zugabe von Chloroform zu einer Endkonzentration von 0,3 % wurde der Phagenüberstand bei 4°C gelagert.

### 2.2.6.4 Exzision des Phageninserts

Zur Exzision des Phageninserts wurden XL1Blue MRF<sup>+</sup> Zellen wie unter 2.2.6.1 beschrieben vorbereitet. Für die verwendeten XL1LR-Zellen wurde am Vortag NZY Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert. Aus der Übernachtskultur wurde eine Hauptkultur angeimpft und bis zum Erreichen von einer OD<sub>600</sub>=1 kultiviert. In einem 12 ml-PPN-

Röhrchen wurden 200 µl der XL1Blue MRF' Zellsuspension in 10 mM MgSO<sub>4</sub> zusammen mit 250 µl der konzentrierten Einzelphagensuspension (2.2.6.3) und 1 µl ExAssist-Helferphage 15 Minuten 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 filamentösen M13 Helferphagen einzelsträngig amplifiziert, zirkularisiert und als Phagemid verpackt aus dem Wirtbakterium ausgeschleust. Zum Abtöten des Wirtsbakteriums wurde anschließend der Ansatz für 15 Minuten auf 70°C erhitzt, die Bakterien abzentrifugiert und der Phagemid-Überstand in ein neues 12 ml-PPN-Röhrchen überführt. Um den XLOLR *E. coli* Stamm mit dem Phagemid zu infizieren, wurden 10 µl oder 100 µl Phagemid-Überstand mit 200 µl frischen XLOLR-Zellen (OD<sub>600</sub>=1.0 in NZY-Medium) 15 Minuten bei 37°C geschwenkt. Nach Zugabe von 300 µl LB-Medium wurde für weiter 45 Minuten unter Schwenken bei 37°C inkubiert. Aus jedem Ansatz wurden 2 x 200 µl auf LB-Agarplatten mit Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit den erhaltenen Einzelkolonien wurden Flüssigkulturen angeimpft und das isolierte Plasmid mit der gesuchten cDNA amplifiziert.

### 2.2.6.5 Bestimmung des Phagentiters

Zur Bestimmung des Titers einer Phagensuspension wurde in SM-Puffer eine Verdünnungsreihe der Phagen erstellt (10<sup>-1</sup>-10<sup>-10</sup>). Diese Verdünnungen wurden auf NZY-Agarplatten wie oben beschrieben ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die entstandenen Plaques (plaque forming units = pfu) wurden ausgezählt und auf die unverdünnte Phagensuspension hochgerechnet (pfu/ml).

**SM-Puffer:** 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 0.01 % Gelatine, sterilfiltriert (0.45 µm)

### 2.2.7 Gewinnung von *Xenopus laevis* Embryonen

#### 2.2.7.1 Stimulation der Eiablage, Befruchtung und Gewinnung von Embryonalstadien

Da die natürliche Pigmentierung von *Xenopus laevis* die Detektion schwacher Signale in der *in situ* Hybridisierung unterdrücken würde, wurden Albino-Frösche für die Präparation von Oocyten oder Embryonalstadien verwendet. Um die Frösche künstlich zum Laichen zu stimulieren wurde zu folgenden Zeiten HCG (humanes chorionisches Gonadotropin) in einem Volumen von bis zu 400 µl in den abdominal gelegenen dorsalen Lymphsack des Frosches injiziert: 18<sup>00</sup> 50 Units (Stock 500 Units/ml) HCG, 24<sup>00</sup> 500 Units (Stock 2000 Units/ml) HCG. Nach weiteren acht Stunden konnte mit dem Beginn des Ablai chens gerechnet werden. Zur Vorbereitung wurde von einem männlichen Frosch das Testisgewebe präpariert und auf Eis in 1x MBS bis zur weiteren Verwendung gelagert. Der Frosch wurde durch Massage des dorsalen Lymphsacks zum Ablai chen stimuliert und die Eier in einer Petrischale aufgefangen. Anschließend wurde vorhandenes Spritzwasser abgesaugt. Ein Hodenstück wurde auf Eis in 100 µl 1 x MBS mazeriert. Um die Motilität der Spermien zu induzieren, wurde durch Zugabe von 900 µl H<sub>2</sub>O der Puffer auf 0,1 x MBS eingestellt. Anschließend wurde die Hodensuspension in mehreren 100 µl Portionen mit einer abgeschnittenen 1 ml Pipettenspitze zur Befruchtung über die Eier gegeben. Nach 5 Minuten RT wurden die Eier mit 0,1 x MBS übergossen und weitere 55 Minuten bei RT inkubiert. Durch Inkubation für ca. 3 Minuten in 2 % Cystein wurde die Gallerthülle der befruchteten Eier entfernt. Anschließend wurden die Embryonen fünfmal mit 0,1 x MBS gewaschen und mit 0,01 % Nilblauschwarz 5 bis 10 Minuten gefärbt. Der ungebundene Farbstoff wurde durch dreimaliges Waschen mit 0,1 x MBS entfernt, und die Embryonen wurden bei 16-18 °C inkubiert, bis das gewünschte Stadium erreicht war. Um Infektionen zu verhindern, wurde bei der Gewinnung von späteren Stadien zum MBS am zweiten Tag Penicillin / Streptomycin (1:10000) zugesetzt. Die Stadien 16 bis 26 wurden durch Behandlung mit Proteinase K von ihrer Vitellinmembran befreit. Hierzu wurden die Embryonen in 20 ml 0,1 x MBS überführt und mit 5 µl einer 20 mg/ml Proteinase K Lösung (Merck) versetzt (Endkonzentration 10 µg/ml). Der Verdau wurde unter einem Binokular kontrolliert. Währenddessen wurde die Vitellinmembran mit Pinzetten entfernt. Die Embryonen wurden dann mehrmals mit 0,1 x MBS gewaschen. Zur Fixierung wurden die Embryonen anschließend in frischem MEMFA für 1 h in 5 ml Glasröhrchen auf einem Drehrad bei Raumtemperatur inkubiert, in 100 % Ethanol entfärbt und bei -20 °C in 100 % Ethanol bis zur Verwendung gelagert.

**Benötigte Lösungen:** 0,1 x MBS  
1 x MBS  
2 % (w/v) Cysteinhydrochlorid pH 8.0

**MBS (5x):** 88 ml 5M NaCl  
12 ml 1M NaHCO<sub>3</sub>  
5 ml 1M KCl  
50 ml 1M HEPES pH 7,4  
4,1 ml 1M MgSO<sub>4</sub>  
800 ml H<sub>2</sub>O  
2,0 ml 1M CaCl<sub>2</sub>  
3,3 ml 1M KNO<sub>3</sub>  
ad 1 l sterilfiltrieren

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

**MEMFA (1 x):** 1 x MEM, 3.7 % Formaldehydlösung

### 2.2.7.2 Fixierung von *Xenopus* Embryonen

Waren die Embryonen für "whole mount" *in situ* Färbungen bestimmt, wurden sie in 5 ml Schraubdeckelglasröhrchen auf einer Wippe für eine Stunde in 1 x MEMFA fixiert und anschließend in 100 % Ethanol bei -20°C gelagert. Wurde eine größere Anzahl an Embryonen benötigt, konnten sie wie unter 2.2.8.1 bis 2.2.8.3 beschrieben bis zur Prähybridisierung vorbereitet und bis zu zwei Monate verwendet werden.

### 2.2.8 „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung

Um die räumliche und zeitliche Expression von Genen zu analysieren, wurde die endogene mRNA von *Xenopus*-Embryonen oder Oocyten *in situ* mit komplementären, Digoxigenin-markierten „antisense“-RNA (Gegenstrang-RNA) Sonden hybridisiert und in einer Färbereaktion detektiert. Zur Kontrolle der Spezifität wurde markierte "sense"-RNA eingesetzt. Für die Durchmusterung der cDNA-Bank aus embryonalem Augengewebe wurden die Embryonen nach der Prähybridisierung 2.2.8.3 bis zum Start der Färbereaktion maschinell behandelt.

#### 2.2.8.1 Rehydrieren der Embryonen

Soweit nicht anders erwähnt, wurden bei jedem Schritt 5 ml Lösung verwendet. Pro 5 ml-Schraubdeckelröhrchen wurden nicht mehr als 30 Embryonen gleichzeitig behandelt.

## 2. Material und Methoden

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

@=kopfüber (Drehrad)

### 2.2.8.2 Proteinase K-Behandlung

Um die Embryonen oder Oocyten durchlässig für die RNA-Hybridisierungs sonden zu machen, wurden sie bis zu 25 Minuten 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). Zeigten sich unter optischer Kontrolle leichte Schäden, wurde die Behandlung sofort abgebrochen.

### 2.2.8.3 Refixierung und Hybridisierungsreaktion

Die durch Proteinase K-Behandlung fragilen Embryonen und Oocyten wurden durch Acetylierung und Inkubation in PTw/Formaldehydlösung refixiert. Die Embryonal- und Oocyten-Stadien wurden in 0,1 M Triethanolamin-Lösung (pH 7,5) umgepuffert, durch zweimalige Zugabe von Acetanhydrid acetyliert und anschließend in PTw + 3,7 % Formaldehyd refixiert.

	Puffer	Zugabe von	Dauer (min)	Anzahl
1.	0,1 M Triethanolamin		5	2 x @
2.	0,1 M Triethanolamin	12,5 µl Acetanhydrid	5	1 x @
3.		12,5 µl Acetanhydrid	5	1 x @
4.	PTw		5	2 x @
5.	PTw + 3,7 % FA		20	1 x @
6.	PTw		5	5 x @

Anschließend wurde der PTw-Puffer bis auf 1 ml entfernt und 250 µl Hybridisierungs-Lösung zugegeben. Nach dem Absinken der Stadien in die Hybridisierungslösung wurde der

Überstand abgenommen, durch 500 µl Hybridierungslösung ersetzt und 10 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Die Hybridierungslösung wurde erneut ausgetauscht und die Embryonen für mindestens 6 h bei 60°C prähybridisiert. Nach dem Abnehmen des Überstands und Zugabe der RNA-Sonde (Endkonzentration 1 µg/ml) in 500 µl Hybridierungslösung wurde über Nacht unter leichtem Schütteln bei 60°C hybridisiert.

### 2.2.8.4 Waschen

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

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

### 2.2.8.5 Antikörper-Inkubation

Die Hybride aus digoxigeninmarkierter Sonden-RNA und endogener mRNA konnten mit einem Digoxigenin-spezifischen Antikörper, an den alkalische Phosphatase gekoppelt war, nachgewiesen werden. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Embryonen vor Zugabe des Detektions-Antikörpers in einer Block-Lösung aus 2 % Boehringer Mannheim Blockierungs-Reagenz und 20 % hitzeinaktiviertem Pferdeserum (Biochrom KG, Berlin) inkubiert.

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

– = horizontale Wippe

#### 2.2.8.6 Farbentwicklung

Alkalische Phosphatase setzt die Substrate NBT/BCIP zu einem dunkelvioletten Farbstoff um. Die Färbereaktion wurde im Dunkeln durchgeführt bis der gewünschte Kontrast mit 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

#### 2.2.8.7 Abstoppen der Färbung und Auswertung

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 Stadien in einer absteigenden Methanolreihe rehydriert und in 1 x MEMFA fixiert und bei 4°C gelagert. Zur Dokumentation wurde die MEMFA Lösung gegen 1 x MEM-Puffer ausgetauscht.

	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

Mit Hilfe eines Stereomikroskops (Stemi SV6, Zeiss) mit Kameraaufsatz wurden die Ergebnisse zu Beginn der Arbeit auf Ektachrome 64T Kunstlichtdiafilmen (Kodak) dokumentiert. Später erfolgte die Dokumentation mit einer Digitalkamera.

### 2.2.8.8 Gewebeschnitte mit einem Vibratom

Der Embryo wurde zunächst in Gelatine-Albumin Einbettungsmedium ca. 10 Minuten äquilibriert. In einem Wägeschälchen wurden auf Eis 1,5 ml Einbettungsmedium mit 105 µl 25 % Glutaraldehyd-Lösung (Sigma) vermischt und möglichst luftblasenfrei in eine Silikonform gegossen. Nach dem Verfestigen wurde der Embryo auf dem Sockel ausgerichtet. Erneut wurden 1,5 ml Einbettungsmedium und 105 µl 25 % Glutaraldehyd-Lösung gemischt und der Embryo mit der Mischung überschichtet. Nach 10 Minuten 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. Die in H<sub>2</sub>O angefertigten Schnitte in 30 µm Dicke wurden mit Hilfe eines feinen Pinsels auf mit Seife gespülte Objektträger überführt und bis zum Abschluss des Schneidens mit H<sub>2</sub>O feucht gehalten. Nach kurzem Trocknen wurden die Schnitte in Moviol-Lösung eingebettet.

**Gelatine-Albumin Einbettungsmedium:** 1 x 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) aliquotiert und bei -20°C gelagert.

**Moviol-Lösung:** 9.6 g Moviol in 19.35 ml 100 % Glycerin 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 Minuten Erhitzen auf 50°C, 15 Minuten bei 5.000 Upm abzentrifugieren. Überstand aliquotiert bei -20°C lagern.

### 2.2.8.9 Maschinelle „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung

Die maschinelle „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung wurde das Insitu pro Gerät von Abimed verwendet. Die Maschine besteht aus einem Reservoirschlauch, der an einer Hebelpumpe mit vorgeschaltetem Verteilerelement angeschlossen ist. Über den Schlauch werden Flüssigkeiten aufgenommen und über eine doppelwandige Nadel in das Inkubationsgefäß, in dem sich die Embryonen befinden, gegeben. Die Inkubationsgefäße tauchen mit einer nadelförmigen Verlängerung in ein flüssigkeitsgefülltes Sammelbecken ein (zu Beginn mit Wasser gefüllt). Durch den Wasserdruck wird die Flüssigkeit im Inkubationsgefäß gehalten. Das Sammelbecken ist mit einem Überlaufabführungsschlauch versehen, der in einem Abfallsammelgefäß mündet. Soll ein Wechsel der Inkubationslösung erfolgen, wird die Lösung aus dem entsprechenden Vorratsgefäß in den Reservoirschlauch gesaugt, das Reaktionsgefäß mit dem Roboterarm angesteuert, die im Gefäß vorhandene Flüssigkeit über Luftzufuhr durch die äußere Nadel und den so entstehenden Überdruck nach unten in das Sammelbecken ausgeblasen. Die äußere Nadel schließt mit der Öffnung der Inkubationsgefäße ab. Die innere längere Nadel hat einen geringeren Durchmesser, so dass über sie definierte Flüssigkeitsmengen in den Inkubationsraum gegeben werden können. Da die Embryonen sehr fragil sind, wird zunächst eine geringe Flüssigkeitsmenge mit niedrigem Druck in das Inkubationsgefäß gegeben. Sind die Embryonen vollständig bedeckt, kann das Gefäß mit höherem Druck bis zum angestrebten Volumen gefüllt werden. Um den Temperaturbereich für Hybridisierungsreaktionen einstellen zu können, sind die Inkubationsgefäße in einen Heizblock mit 8 mal 12 Vertiefungen eingefasst. Die Steuerung von Hebelpumpe, Heizblock und Roboterarm erfolgt über eine vom Hersteller mitgelieferte Software (Abimed *in situ* Software 4.0), die entweder über eine zum Gerät gehörende DOS basierte Steuerkonsole oder über eine Windows basierte Eingabeoberfläche angepasst werden kann.

Vor Benutzung des Gerätes wurde frisches, destilliertes Wasser in das Vorratsgefäß für Spülschritte gegeben. Wurde die Anlage längere Zeit nicht benutzt, erfolgte eine Reinigung des Systems mit 3 % Wasserstoffperoxidlösung und zweimaligem Spülen mit frischem, destilliertem Wasser unter Verwendung eines Herstellerprogramms. Vorrats- und

Inkubationsgefäße wurden bei erstmaliger Benutzung mit 3 % Wasserstoffperoxidlösung und zweimaligem Spülen mit frischem, destilliertem Wasser gereinigt. Nach Verwendung in einer „whole mount“ *in situ* Hybridisierungsprozedur wurden die Gefäße 5 x mit deionisiertem Wasser gespült und anschließend zur Inaktivierung möglicher RNase Kontaminationen für 24 Stunden in 0,1 N Natronlauge eingelegt. Nachdem die Natronlauge durch fünfmaliges Spülen mit deionisiertem Wasser vollständig entfernt wurde, erfolgte eine weitere Spülung mit 3 % Wasserstoffperoxidlösung. Anschließend wurde verbleibende Flüssigkeit durch dreimaliges Waschen der Gefäße mit technischem Ethanol entfernt und die Gefäße bei 80°C für 30 bis 60 Minuten getrocknet.

Für die maschinelle „whole mount“ *in situ* Hybridisierung wurden bei -20°C gelagerte prähybridisierte Embryonalstadien wie unter 2.2.8.3 beschrieben verwendet. Der Transfer der Embryonen in die Inkubationsgefäße erfolgte mit einer aufgeschmolzenen Pasteurpipette in Prähybridisierungslösung. Anschließend wurde nach folgendem exemplarischem Programm verfahren:

## 2. Material und Methoden

Schritt	Funktion	Aktion	Erklärung
1	SetTempReg	T0 (OFF)	Heizblock der Gefäßhalterung aus
2	Rinse	5000 / 5000 µl	Spülen des Reservoirs mit 5 ml dH <sub>2</sub> O
3	SetTempReg	T2 (HIGH)	Erhitzen der Gefäßhalterung auf 65°C
4	Incubate	1 h 150 C-SAMPLE_A	Wechseln der Hybridisierungslösung 150 µl und Inkubation für 1h
5	Incubate	16 h 150 Probe-SAMPLE_A	Inkubation mit der RNA Sonde 150 µl für 16h
6	Incubate	15 min 150 C-SAMPLE_A	Waschen mit 150 µl Hybridisierungslösung und Inkubation für 15 min
7	Incubate	15 min 150 D-SAMPLE_A	Waschen mit 150 µl 2 x SSC und Inkubation für 15 min
8	Incubate	20 min 150 D-SAMPLE_A	Waschen mit 150 µl 2 x SSC und Inkubation für 20 min
9	Incubate	20 min 150 E-SAMPLE_A	Waschen mit 150 µl 0,2 x SSC und Inkubation für 20 min
10	Incubate	20 min 150 E-SAMPLE_A	Waschen mit 150 µl 0,2 x SSC und Inkubation für 20 min
11	SetTempReg	T0 (OFF)	Heizblock der Gefäßhalterung aus
12	Wait	20 min	Abkühlen des Heizblocks der Gefäßhalterung auf RT
13	Incubate	15 min 150 A-SAMPLE_A	Waschen mit 150 µl MAB-Puffer und Inkubation für 15 min
14	Incubate	15 min 150 A-SAMPLE_A	Waschen mit 150 µl MAB-Puffer und Inkubation für 15 min
15	Incubate	20 min 150 A-SAMPLE_A	Waschen mit 150 µl MAB-Puffer und Inkubation für 20 min
16	Incubate	60 min 150 L-SAMPLE_A	Abdecken unspezifischer Bindungsstellen mit 150 µl Block-Lösung und Inkubation für 1h
17	Incubate	6 h 150 M-SAMPLE_A	Antikörperinkubation mit 150 µl für 6h
18	Incubate	20 min 150 A-SAMPLE_A	Waschen mit 150 µl MAB-Puffer und Inkubation für 20 min
19	Incubate	20 min 150 A-SAMPLE_A	Waschen mit 150 µl MAB-Puffer und Inkubation für 20 min
20	Incubate	20 min 150 A-SAMPLE_A	Waschen mit 150 µl MAB-Puffer und Inkubation für 20 min
21	Incubate	40 min 150 A-SAMPLE_A	Waschen mit 150 µl MAB-Puffer und Inkubation für 40 min
22	Incubate	40 min 150 A-SAMPLE_A	Waschen mit 150 µl MAB-Puffer und Inkubation für 40 min
23	Incubate	40 min 150 A-SAMPLE_A	Waschen mit 150 µl MAB-Puffer und Inkubation für 40 min
24	Incubate	60 min 150 A-SAMPLE_A	Waschen mit 150 µl MAB-Puffer und Inkubation für 60 min
25	Incubate	60 min 150 A-SAMPLE_A	Waschen mit 150 µl MAB-Puffer und Inkubation für 60 min
26	WaitForKey	APB in Position F	Vorratsgefäß mit frischem APB-Puffer auf Position F Stellen und Programm fortsetzen
27	Incubate	15 min 150 F-SAMPLE_A	Waschen mit 150 µl APB-Puffer und Inkubation für 15 min
28	Incubate	15 min 150 F-SAMPLE_A	Waschen mit 150 µl APB-Puffer und Inkubation für 15 min
29	Rinse	5000 / 5000 ul	Spülen des Reservoirs mit 5 ml dH <sub>2</sub> O
30	SetTempReg	T0 (OFF)	Ende des Programms

**Tabelle 7: Exemplarisches Programm für eine maschinelle „whole mount“ *in situ* Hybridisierung.**

Spalte eins gibt den jeweiligen Programmschritt an. In Spalte zwei ist die aufgerufene Funktion aufgelistet. Hier bedeutet SetTempReg: Ansteuerung des Temperaturreglers der Heizplatte, Rinse: Spülvorgang ohne Ansteuerung von Inkubationsgefäßen, Wait: Warteposition für einen bestimmten Zeitraum, WaitForKey: eine Tastatureingabe ist zur Programmfortführung notwendig, Incubate: Wechsel der Inkubationslösung. In Spalte drei ist die auszuführende Aktion in Folgender Reihenfolge aufgelistet: Zeit in Minuten oder Stunden, das hinzugefügte Volumen der Inkubationsflüssigkeit, die Position des Vorratsgefäßes der Puffer (A, C, D, E, F, oder Probe), die anzusteuern den Proben (hier wurde nur ein Bereich von 1-96 Inkubationsgefäßen definiert) in dem jeweiligen Programmschritt. In Spalte vier ist eine kurze Erklärung der jeweiligen Programmschritte aufgelistet. Die verwendeten Lösungen sind anhand ihrer Positionsangabe unten aufgelistet.

### Lösungen für "whole mount" *in situ* Hybridisierung:

**A:** MAB-Puffer (Maleinsäurepuffer):

		500 ml	5 x Stock	1 L
Maleinsäure	100 mM	5,8 g	58 g	
NaCl	150 mM	4,4 g	44 g	
	pH 7,5			

**D:** 2 x SSC

**E:** 0,2 x SSC

**F:** APB-Puffer (Alkalischer Phosphatase Puffer):

Tris-HCl pH 9,5	100 mM	50 ml	Tris 1M
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	25 ml	MgCl <sub>2</sub> 1M
NaCl	100 mM	10 ml	NaCl 5M
Tween 20	0,1 %	2,5 ml	20 % Tween
		ad 500 ml	

pH 9,5; bei 4°C maximal 14 Tage aufbewahren

**L:** Block-Lösung: MAB + 2 % BMB + 20 % Pferde-Serum

1 Teil 5 x MAB + 1 Teil 10 % BMB + 1 Teil Serum + 2 Teile H<sub>2</sub>O (6,6 ml 5 x MAB + 6,6 ml 10 % BMB + 6,6 ml Serum + 13,2 ml H<sub>2</sub>O = 33 ml)

**M:** Anti Digoxigenin- oder Fluorescein-Antikörper: 15 ml Block-Lösung + 3 µl AK (1/5000)

**C:** Hybridisierungs-Lösung:

Formamid	50 %	500 ml	deionisiert (BRL 5515UB)
SSC	5 x	250 ml	20 x Stock-Lsg.
Torula RNA	1 mg/ml	20 ml	50 mg/ml Stock-Lsg. (SIGMA R6625)
Heparin	100 µg/ml	100 mg	10 mg /ml (Sigma H-9399)
Denhart's	1 x	1 ml	100 x Stock-Lsg.
Tween-20	0.1 %	1 g	20 % Stock-Lsg. (Sigma P-1379)
CHAPS	0.1 %	1 g	Einwaage (Sigma C-3023)
EDTA	10 mM	20 ml	0.5 M-Stock-Lsg. (MW 292,2)
DEPC-H <sub>2</sub> O		ad 1 L	

Die Hybridisierungslösung wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

**Probe:** Digoxigenin oder Fluorescein markierte RNA-Sonde: 20 µl RNA Probe (in Formamid, H<sub>2</sub>O 1:1)  
150 µl Hybridisierungslösung

**RNasen:** 20 µg/ml RNase A, 10 U/ml RNase T1 (manuelle „whole mount“ *in situ* Hybridisierung)

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Der Transkriptions-Faktor IIIA

TFIIIA ist ein Zinkfingerprotein mit neun aufeinanderfolgenden Zinkfingern. In der frühen Phase der Oogenese wird der Transkriptionsfaktor bei der 5S RNA-Synthese benötigt. Diese Funktion erfordert den Kernimport von TFIIIA und damit ein Kernlokalisierungssignal. In der Oogenese hat TFIIIA im Cytoplasma eine Speicherfunktion für 5S RNA. Diese Funktion erfordert die Inaktivierung des Kerntransportsignals von TFIIIA. Vermutlich führt die 5S RNA-Bindung an TFIIIA zu einer Maskierung des Kernlokalisierungssignals. An TFIIIA gebundene 5S RNA liegt im Cytoplasma von Oocyten als 7S-Vorratspartikel vor. In somatischen Zellen tritt solch ein Vorratspartikel nicht auf. Nach Deletion der 5S RNA bindenden Zinkfinger 5 und 6 wird TFIIIA in den Zellkern transportiert. Eine Maskierung des NLS durch 5S RNA Bindung könnte die zugrunde liegende Transporthemmung erklären (Rudt *et al.*, 1996; Rudt und Pieler, 1996). In den Zinkfingersequenzen könnte ein weiteres neues Motiv für den Import von Proteinen lokalisiert sein, welches durch die Bindung von 5S RNA an TFIIIA maskiert wird. In diesem Projekt sollen als Beitrag zur Aufklärung des nukleocytoplasmatischen Transports von 5S RNA die NLS-Funktion innerhalb der Sequenz von TFIIIA lokalisiert werden und potentielle Importfaktoren von TFIIIA identifiziert werden.

#### 3.1.1 Vorarbeiten zur Eingrenzung der Kernlokalisierungssignalsequenz von dem Transkriptions-Faktor IIIA

Im Rahmen der von mir angefertigten Diplomarbeit wurden verschiedene Fusionsmutanten von TFIIIA mit einem  $\beta$ -Galaktosidaseanteil erstellt und die Importkompetenz dieser Mutanten durch Mikroinjektion in das Cytoplasma von Oocyten der Stadien V und VI ermittelt. Durch verschiedene Mutationen konnten die N- und C-terminalen Sequenzen, welche keine Zinkfinger kodierenden Sequenzen enthalten, als Träger einer Kerntransportsignalsequenz ausgeschlossen werden. Durch weitere Deletionsmutanten der Zinkfinger kodierenden Sequenz wurde je eine N- und C-terminal lokalisierte Kerntransportsignalsequenz nachgewiesen. Deletionsmutanten, denen zusätzlich zu den Fingern 5 und 6 ein weiterer Finger fehlte, wiesen auf eine besondere Bedeutung der Zinkfinger 4 und 9 hin. Deletionsmutanten, denen zusätzlich innerhalb der N- bzw. C-terminalen Kerntransportsignalsequenz der vierte oder neunte Zinkfinger fehlte, wurden

schlechter in den Zellkern transportiert als Mutanten, denen zusätzlich andere Zinkfinger fehlten. Bis zum Abschluss der Arbeit wurden die Zinkfinger 789 für das C-terminale NLS und die Zinkfinger 1 bis 4 mit N- und C-terminaler Sequenz von TFIIIA (N1234C) als kürzeste importkompetente TFIIIA Sequenzen identifiziert. Unter diesem Aspekt wurde in der vorliegenden Arbeit die NLS-Sequenz von TFIIIA weiter eingegrenzt und die strukturelle Einbettung der NLS Funktion analysiert.

#### **3.1.2 Weitere Arbeiten zur Eingrenzung der Kerntransportsignalsequenzen**

Zur weiteren Eingrenzung des essentiellen Sequenzelementes für den Kerntransport von TFIIIA wurden neue Fusionsmutanten bestehend aus sechs myc-Epitopen, einem  $\beta$ -Galaktosidaseanteil und den jeweiligen TFIIIA Deletionsmutanten erstellt. Die myc-Epitope dienten der Präzipitation injizierter Proteine. Der  $\beta$ -Galaktosidaseanteil wurde verwendet, um das Protein zu vergrößern und so passive Diffusion in den Zellkern zu verhindern (Wischnewski, 1997).

Die den Zinkfingern 124, 234, 34, 4, 678, 789, 89 und 9 entsprechenden Sequenzen wurden über PCR („polymerase chain reaction“) amplifiziert. Die Produkte wurden mit dem Qiaquick PCR Purification Kit gereinigt und soweit nicht anders angegeben in den pGemT Vektor kloniert. Durch Verwendung von eingefügten Schnittstellen wurden die Sequenzen mit einem Restriktionsverdau geschnitten und nach Reinigung (siehe Material und Methoden) in den 1/3-beta-Gal Vektor (Wischnewski, 1997) kloniert. Für Klonierungen mit dem Restriktionsenzym Xba I wurde das aus *E. Coli* TG1 stammende 1/3-beta-Gal Vektorplasmid mit Xba I verdaut, die Schnittstelle mit Klenow Polymerase aufgefüllt, das Plasmid religiert und in *dam* und *dcn* Methylase negative *E. Coli* GM2163 transformiert. Durch Zerstörung der 3' von der Pst I gelegenen Xba I Schnittstelle konnte so die jetzt nicht mehr methylierte 5' Xba I Schnittstelle in dem resultierenden 1/3-beta-Gal-X<sup>2</sup> Vektor verwendet werden.

Für die Klonierung von Konstrukten mit der Sequenz des vierten Fingers wurden neben Xba I, die Schnittstellen Nsi I für die Inserts und Pst I für den Vektor benutzt. Aus einem Verdau mit diesen Restriktionsenzymen gehen überhängende Enden hervor, die zueinander kompatibel sind. Die verwendeten Matrizen, Primerkombinationen und Schnittstellen sind in Tabelle 8 angegeben. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die Mutante mit dem Zinkfinger 4 wurde durch Bgl II Verdau der 34 Mutante aus dem pGemT Vektor, anschließender Auffüllreaktion mit Klenow Polymerase und folgendem Nru I, Nsi I Verdau in den Nru I, Nsi I geschnittenen 1/3-beta-Gal-X<sup>2</sup> Vektor kloniert. Zur Überprüfung

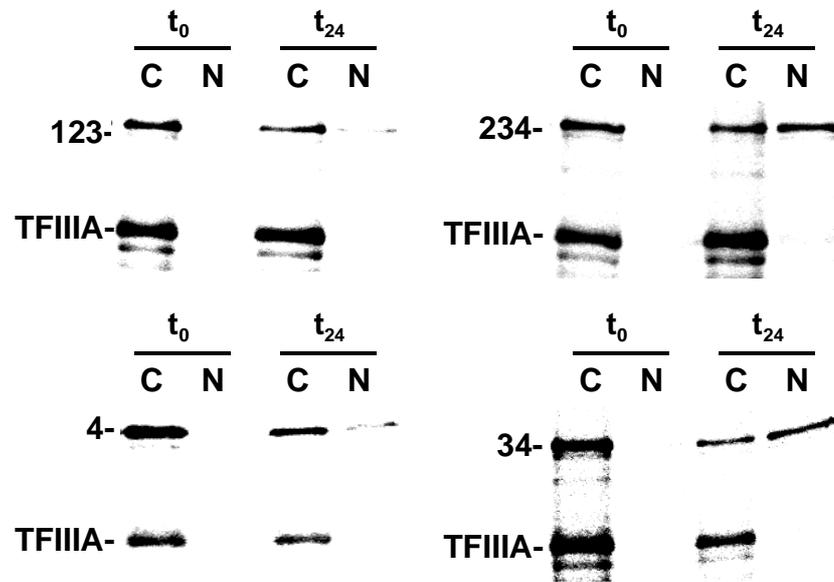
der korrekten Integration der Sequenzelemente wurden Sequenzierungen mit den Primern pAXminus und MC002 durchgeführt.

Kodierende Sequenz	Matrize	Schnittstellen		5' Primer	3' Primer
		Insert	Vektor		
34	T3pmTFIIIA	Xba I / Nsi I	Xba I / Pst I	UpZF3X	ZF4
234	T3pmTFIIIA	Xba I / Nsi I	Xba I / Pst I	UpZF2X	ZF4
124	pAX4C+ TFIIIA-Δ3	Xba I / Nsi I	Xba I / Pst I	UpZF1X	ZF4
89	T3pmTFIIIA	Bgl II / Pst I	Bgl II / Pst I	UpZf8	ZF9
678	T3pmTFIIIA	Bgl II / Pst I	Bgl II / Pst I	UpZf6	ZF8
9	T3pmTFIIIA	Bgl II / Pst I	Bgl II / Pst I	UpZF9	ZF9

**Tabelle 8: Primerkombinationen, Schnittstellen und Matrizen für die Klonierung von Zinkfingerfusionsmutanten.**

In der ersten Spalte ist der jeweilige Klon aufgelistet. Spalte 2 gibt das Matrizen-Plasmid an, in Spalte vier sind die für das Insert verwendeten Restriktionsenzyme und in Spalte fünf die für den Vektor verwendeten Schnittstellen aufgelistet. Die Sequenz der verwendeten 5' und 3' Primer ist in Tabelle 2 angegeben.

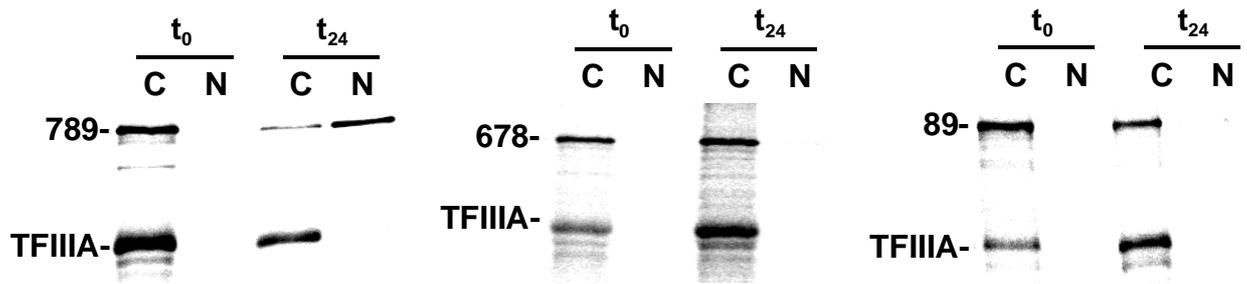
Innerhalb der N-terminalen Zinkfingersequenzen sind die Fusionsmutanten zu einem hohen Anteil im Kern lokalisiert, welche den vierten Zinkfinger als Sequenzelement besitzen. Eine Mutante mit den Zinkfingern 123 wird nicht in den Zellkern importiert. Ein 234 Zinkfingererelement besitzt ein starkes Kernlokalisierungssignal. Eine Reduktion dieses Dreifingererelementes auf die Finger 34 ist transportkompetent. Im Gegensatz zu den Mutanten mit den Zinkfingern 34, 234 bzw. 124 mit einem starken NLS tritt bei einer Fusionsmutante mit dem vierten Zinkfinger alleine oder den Zinkfingern 123 keine signifikante Kernlokalisierung auf.



**Abbildung 3: Analyse zur NLS Identifizierung von N-terminalen Zinkfingern.**

Radioaktiv markiertes *Xenopus* TFIIIA und Deletionsmutanten mit  $\beta$ -Galaktosidase und myc Fusionsanteil wurden in das Cytoplasma von Stadium VI Oocyten injiziert. Kern und Cytoplasmafraktionen wurden sofort ( $t_0$ ) oder 24 Stunden ( $t_{24}$ ) nach der Injektion manuell separiert. Die eingesetzten Proteine wurden immunpräzipitiert und elektrophoretisch auf einem PAGE-Gel aufgetrennt. Die myc-tag Fusionsmutanten mit den Zinkfingern 234 oder 34 werden importiert. Die Zinkfinger 123 oder der Zinkfinger 4 alleine sind nicht kernlokalisierungskompetent. Die myc-Fusionsmutanten mit der vollständigen TFIIIA-Sequenz werden nicht importiert und dienen als Injektionskontrolle. Links von den Gelabbildungen ist die jeweilige Mutante angegeben, die Bahnen zeigen von links nach rechts: Ct<sub>0</sub> Cytoplasma- und Nt<sub>0</sub> Kernfraktion unmittelbar nach der Injektion, Ct<sub>24</sub> Cytoplasma- und Nt<sub>24</sub> Kernfraktion 24 Stunden nach der Injektion.

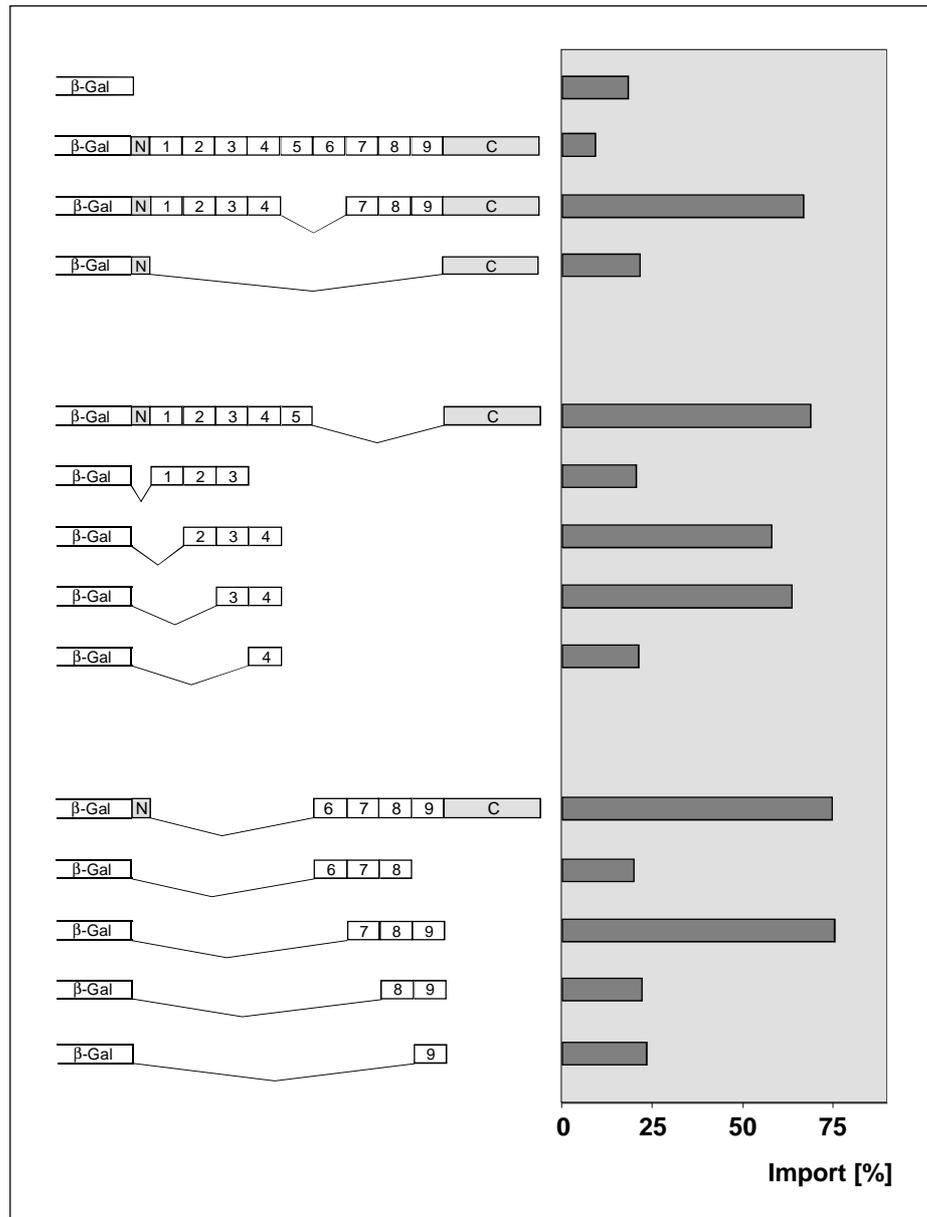
Durch den Austausch des dritten Zinkfingers der 123 Mutante gegen den vierten Zinkfinger wurde eine importkompetente Mutante erzeugt. Eine 124 Mutante (70 % kernlokalisiert, nicht gezeigt) wird in vergleichbarer Qualität wie die 234 Mutante importiert. Mit der 124 Mutante konnte die Funktion des NLS vom vierten Zinkfinger unabhängig von der Identität des Vorfingers dargestellt werden. Der vierte Zinkfinger alleine ist allerdings nicht transportkompetent. Da der vierte Zinkfinger alleine nicht mehr importiert wird, besteht für die Integrität der Kerntransportsignalsequenz die strukturelle Notwendigkeit eines Vorfingers.



**Abbildung 4: Analyse zur NLS Identifizierung von C-terminalen Zinkfingern.**

Radioaktiv markiertes *Xenopus* TFIIIA und Deletionsmutanten mit  $\beta$ -Galaktosidase und myc Fusionsanteil wurden in das Cytoplasma von Stadium VI Oocyten injiziert. Kern und Cytoplasmafraktionen wurden sofort ( $t_0$ ) oder 24 Stunden ( $t_{24}$ ) nach der Injektion manuell separiert. Die eingesetzten Proteine wurden immunpräzipitiert und elektrophoretisch auf einem PAGE-Gel aufgetrennt. Die myc-tag Fusionsmutante mit den Zinkfingern 789 ist nach 24 Stunden kernlokalisiert. Die Zinkfinger 123 oder der Zinkfinger 4 alleine sind nicht kernlokalisierungskompetent. Die myc-Fusionsmutanten mit der vollständigen TFIIIA-Sequenz werden nicht importiert und dienen als Injektionskontrolle. Links von den Gelabbildungen ist die jeweilige Mutante angegeben, die Bahnen zeigen von links nach rechts:  $C_{t_0}$  Cytoplasma- und  $N_{t_0}$  Kernfraktion unmittelbar nach der Injektion,  $C_{t_{24}}$  Cytoplasma- und  $N_{t_{24}}$  Kernfraktion 24 Stunden nach der Injektion.

Das C-terminale NLS unterscheidet sich von dem N-terminalen NLS durch die für die Kernlokalisierung minimal notwendige Anzahl an Zinkfingern. Eine Reduktion der 789 Mutante auf den achten und neunten Zinkfinger führt zu einem vollständigen Verlust der Importkompetenz. Das N-terminale NLS lässt sich im Gegensatz zum C-terminalem NLS, welches in seiner Minimalstruktur aus den Zinkfingern 34 besteht, nur auf ein Dreifingerkonstrukt reduzieren. Eine Gegenüberstellung der Mutanten 678 mit cytoplasmatischer Lokalisation und 789 mit starker Lokalisation im Zellkern zeigt, dass innerhalb der Zinkfinger 6 bis 8 kein eigenständiges NLS vorhanden ist.



**Abbildung 5: Deletionsmutanten zur Eingrenzung der Kernlokalisierungssignalsequenz.**

Zusammenfassende Übersicht der Deletionsmutanten zur Eingrenzung der Kernlokalisierungssignalsequenz. Schematisch dargestellt sind die verschiedenen TFIIIA- Fusionsmutanten mit den zugehörigen Kern / Cytoplasma-Verteilungen nach 24 Stunden Inkubation. Die experimentellen Werte der Mutanten N1-9C, NC, N1-5C, 123 und N6-9C stammen aus meiner Diplomarbeit. Die Werte für die Mutanten 234, 34, 4, 678, 89 und 9 sind im Rahmen dieser Arbeit erstellt worden. Die Werte für die Mutanten 123 und 789 sind in den experimentellen Ansätzen dieser Arbeit erneut verifiziert worden.

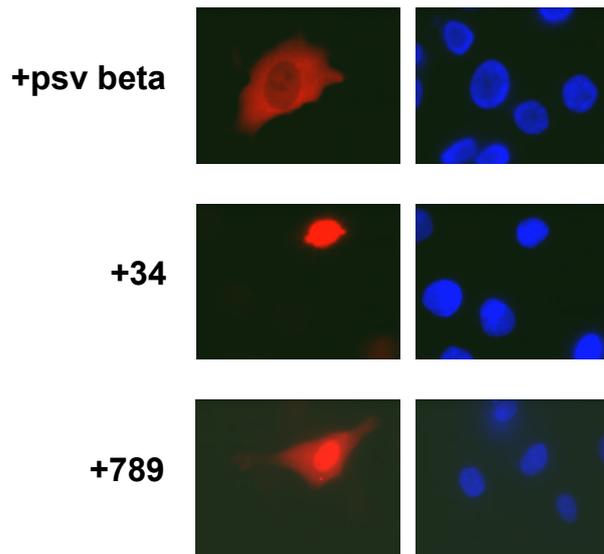
Der vierte und der neunte Zinkfinger besitzen beide eine hohe Anzahl von basischen Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz der beiden Finger beinhaltet jedoch keine Sequenzfolge, die einem SV40-NLS oder einem zweigeteiltem NLS entspricht. Bisher beschriebene Importsignalsequenzen sind basischer Natur. Eine NLS Datenbankanalyse (Cokol *et al.*, 2000) führt nicht zu vergleichbaren Kernlokalisierungssignalsequenzen. Die

hier eingegrenzten Kernlokalisierungssignalsequenzen 789 und 34 stellen somit ein neues weiteres Motiv dar, welches in *Xenopus* Oocyten Kernimport vermitteln kann.

#### **3.1.3 Analyse von immunfluoreszenzmarkierten TFIIIA Mutanten in HeLa Zellen**

In Injektionsexperimenten mit Oocyten wurden die Zinkfinger 34 und 789 als minimal Struktur der NLS Funktion von TFIIIA identifiziert. Beide Zinkfingermodule haben in ihrer Sequenz ein kurzes basisches Motiv, welches keinem bisher beschriebenen NLS entspricht. Um zu testen, ob die NLS Funktion dieser Minimalstrukturen auf Oocyten beschränkt oder auch in somatischen Zellen wirksam ist, wurde das Importverhalten von Fusionsmutanten der Zinkfinger 34 und 789 mit  $\beta$ -Galaktosidase in HeLa Zellen in einer transienten Transfektionsanalyse untersucht.

Die kodierende Sequenz der Zinkfinger 34 wurde mit den Primerpaaren Up3 N und ZF4E, die Sequenz der Zinkfinger 789 mit den Primerpaaren Up7N und ZF9 E in einer PCR Reaktion amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen Nhe I und Ecl 136 II verdaut und in den Nhe I, Nru I geschnittenen +psv beta Vektor (Schwamborn *et al.*, 1998) vor die  $\beta$ -Galaktosidase kodierende Sequenz kloniert. Die Integration der Zinkfingersequenzen in die resultierenden Plasmide wurde mit dem pSV-beta-F1 Primer durch Sequenzierung der Insert Vektorübergänge überprüft und die Plasmide wie in 2.2.4.5 beschrieben in HeLa Zellen transfiziert. Der Nachweis der nukleocytoplasmatischen Verteilung der Mutanten erfolgte mit geeigneten primären und Cy3 markierten sekundären Antikörpern. Der Fusionsanteil für die Teilkonstrukte von TFIIIA,  $\beta$ -Galaktosidase (+psv beta), ist alleine nicht fähig in den Zellkern zu gelangen. Sowohl das N- als auch das C-terminale NLS von TFIIIA, die Zinkfinger 34 und 789 verhalten sich in HeLa Zellen wie in den Oocyteninjektionsexperimenten. Fusionsmutanten mit den Zinkfingern 34 und 789 und  $\beta$ -Galaktosidase sind in HeLa Zellen kernlokalisierungskompetent, der Fusionsanteil alleine wird nicht importiert (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Subzelluläre Lokalisation der transportkompetenten Minimalstrukturen von TFIIIA in somatischen Zellen.**

HeLa Zellen wurden transient mit Plasmiden +psv beta ( $\beta$ -Galaktosidase), +psv beta mit den inklonierten Zinkfingersequenzen 34 oder 789 transfiziert und 2 Tage bei 37°C unter 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die HeLa Zellen mit 3 % Paraformaldehyd fixiert und mit 0,5 % Triton-X-100 permeabilisiert. Die intrazelluläre Verteilung wurde mit einem anti- $\beta$ -Galaktosidase Primär-Antikörper (aus Maus, Verdünnung 1:1000) und einem fluoreszenzmarkierten Cy3-anti-Maus-IgG-Antikörper (Verdünnung 1:200) nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit DAPI visualisiert. Der Fusionsanteil,  $\beta$ -Galaktosidase, ist im Cytoplasma lokalisiert. Fusionsmutanten aus  $\beta$ -Galaktosidase und den Zinkfingern 34 bzw. 789 sind kernlokalisiert.

## 3.2 Definition einer neuen Synexpressionsgruppe

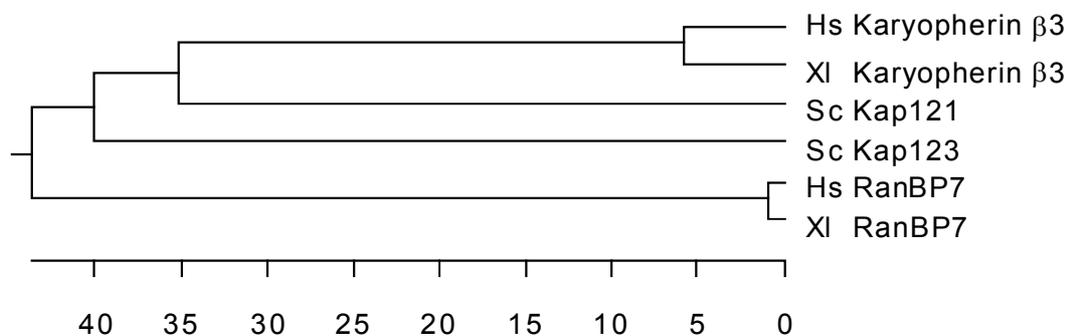
### 3.2.1 Karyopherin $\beta$ 3

Karyopherin  $\beta$ 3 ist ein Transportfaktor, der in den Import von ribosomalen Proteinen involviert sein könnte. Das isolierte humane Karyopherin  $\beta$ 3 ist ein Karyopherin  $\beta$  verwandtes Protein von 123 kd mit zwei putativen Ran-Bindungsdomänen. Es bindet an verschiedene Nukleoporine mit repetitiven Sequenzmustern (Nup358, Nup214, Nup153, Nup98 und p62) und interagiert in einem „Blot overlay assay“ mit den ribosomalen Proteinen L23 und L13 (Yaseen und Blobel, 1997). Karyopherin  $\beta$  verwandte Proteine, wie RanBP5, RanBP7, Transportin oder Karyopherin  $\beta$  selbst, können direkt an ihre Transportsubstrate binden (Claußen *et al.*, 1999; Jäkel und Görlich, 1998; Pollard *et al.*, 1996).

### 3.2.2 Isolierung von Karyopherin $\beta$ 3

Bei der Durchmusterung einer *Xenopus*-Schwanzspitzen-cDNA-Bank wurde ein partieller Karyopherin  $\beta$ 3 Klon (Sölter, 1999) von ca. 1,6 kb isoliert. Anhand der mit den Primern

CMV-F und CMV-R erhaltenen Teilsequenz des partiellen Karyopherin  $\beta 3$  Klons wurden die Primer B3Uf1 (5') und B3Ur1 bzw. B3Ur3 (3') entworfen. Über wiederholte Phagenanreicherung (Dürr, 1997) mit wechselnden 5' 3' Primerkombinationen wurde ein Phage isoliert, der die vollständige kodierende Sequenz enthält. Das Phageninsert wurde wie unter 2.2.6.4 beschrieben excisiert und das resultierende Plasmid für weitere Analysen und Klonierungen verwendet. Zur Sequenzierung des vollständigen Klons verwendete Primer sind in Tabelle 3 angegeben. Karyopherin  $\beta 3$  aus *Xenopus laevis* zeigt hohe Homologie zu dem humanen Karyopherin  $\beta 3$  (94 % Ähnlichkeit und 89 % Identität) und zu Kap121 aus Hefe. Die 4062 Basenpaare der Sequenz kodieren 1094 Aminosäuren, aus denen sich ein Molekulargewicht von 122775,43 Dalton ableitet.



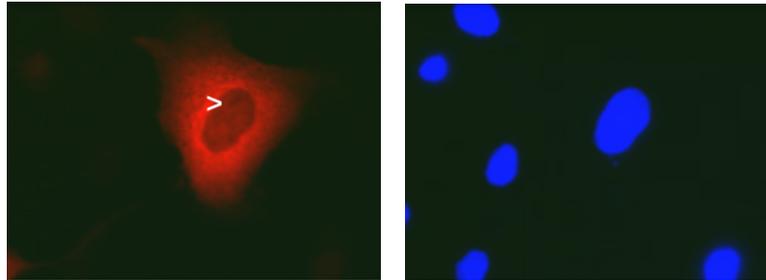
**Abbildung 7: Vergleich von *Xenopus* Karyopherin  $\beta 3$  mit anderen verwandten Proteinen.**

Der phylogenetische Baum stellt die Verwandtschaftsbeziehungen von *Xenopus* Karyopherin  $\beta 3$  und anderen nahen verwandten Proteinen aus Hefe und dem Menschen dar. Die Analyse wurde mit der „Clustal“ Methode (DNASTAR Lasergene99 Software) mit einem PAM Wert von 250 durchgeführt. Die Länge der Verzweigungen repräsentiert die Distanz zwischen den Sequenzpaaren. Die Einheiten der Skalierung geben die Substitutionsereignisse pro 100 Aminosäuren an. Die aus der GenBank verwendeten Sequenzen haben folgende Zugriffsnummern: Sc Kap121p, emb|Z49212.1; Sc Kap123p, sp|P40069; Hs RanBP7, gb|U71082.1; XI RanBP7, gb|U71082.1). Abkürzungen: Hs *Homo sapiens*, Sc *Saccharomyces cerevisiae*, XI *Xenopus laevis*.

### 3.2.3 Die nukleocytoplasmatische Verteilung von *Xenopus* Karyopherin $\beta 3$ in transfizierten HeLa Zellen

Um die biologische Aktivität des aus *Xenopus* isolierten Karyopherin  $\beta 3$  zu überprüfen, wurde ein geeignetes Expressionsplasmid erstellt und transient in HeLa Zellen wie in 2.2.4.6 beschrieben transfiziert. Für die Klonierung wurde die kodierende Sequenz von Karyopherin  $\beta 3$  mit den Primern UpIB3E und IB3X in die Schnittstellen Eco RI und Xho I des pCS2+MT Vektors überführt. Die Immunfluoreszenz von *Xenopus* Karyopherin  $\beta 3$  in transfizierten HeLa Zellen zeigt im Gegensatz zu humanem Karyopherin  $\beta 3$  (Yaseen und Blobel, 1997) eine ausgeprägtere Anreicherung im Cytoplasma. Wie bei dem humanem Homolog tritt im Nukleoplasma eine perinukleoläre Akzentuierung auf (Abbildung 8). Das *Xenopus* Protein ist

also auch in der Lage die Kernmembran in HeLa Zellen in Teilen zu passieren. Neben der hohen Homologie zu dem humanen Karyopherin  $\beta 3$  zeigt *Xenopus* Karyopherin  $\beta 3$  in HeLa Zellen also ein ähnliches Verhalten und ist als das nächste Homolog zu humanem Karyopherin  $\beta 3$  als *Xenopus* Karyopherin  $\beta 3$  zu bezeichnen.



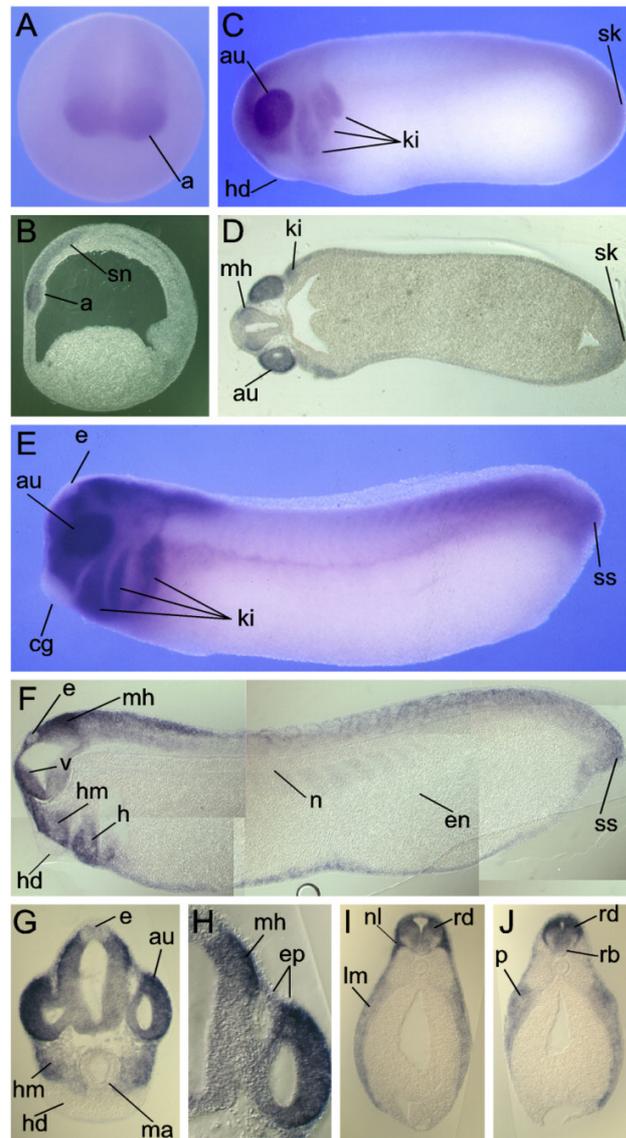
**Abbildung 8 : Transfektion von HeLa-Zellen mit *Xenopus* Karyopherin  $\beta 3$ .**

HeLa Zellen wurden mit pCS2+MT Karyopherin  $\beta 3$  transfiziert und auf 0,5 cm Glassplättchen ausgesät. Nach 24 h Inkubation erfolgte die Fixierung in 2 % Formaldehyd. Anschließend wurden die permeabilisierten Zellen mit dem primären 9E10 anti-myc Antikörper und dem immunfluoreszenzaktiven sekundären Cy3-konjugierten anti Maus Antikörper inkubiert. Die weiße Pfeilspitze markiert eine perinukleoläre Akzentuierung.

#### 3.2.4 Karyopherin $\beta 3$ ist ein differentiell exprimierter Transportfaktor

Die Teilsequenz von Karyopherin  $\beta 3$  wurde aufgrund eines spezifischen Expressionsmusters in einer Durchmusterung einer *Xenopus*-Schwanzspitzen-cDNA-Bank (Sölter, 1999) auffällig. Die vollständige Sequenz von Karyopherin  $\beta 3$  wurde aus einer *Xenopus*-KopfcDNA-Bank isoliert. Für eine detaillierte Expressionsanalyse wurde die vollständige Karyopherin  $\beta 3$  kodierende Sequenz in einen Vektor kloniert, der es mit einem T7 Promotor ermöglichte, Digoxigenin markierte RNA in „antisense“ (Gegenstrang) Richtung zu synthetisieren und diese in einer anschließenden „whole mount“ *in situ* Analyse (2.2.8) einzusetzen. Nach Überführung der kodierenden Sequenz mit den Primern UpIB3EcoR I und IB3Xho I in die Schnittstellen Eco RI und Xho I des pCS2+ Vektors wurde (aus T7 Richtung) Digoxigenin markierte „antisense“ RNA für eine „whole mount“ *in situ* Analyse synthetisiert. Mit späten Gastrula / frühen Neurulastadien kann Karyopherin  $\beta 3$  vorwiegend in der anterioren Neuralplatte im Bereich vom Augenfeld detektiert werden. Eine schwächere, weiter posterior gelegene Expression ist auf die sensorische Schicht des Neuroektoderms beschränkt. Während der Schwanzknospen- und Schwanzspitzen-Stadien ist eine starke Expression in den Augen, Regionen des Mittelhirns und den Kiemenbögen zu beobachten. In den dorsal gelegenen Bereichen des zentralen Nervensystems ist die Expression von Karyopherin  $\beta 3$  generell höher als in den ventralen Bereichen. Die stärkste Expression ist in Vorder- und Mittelhirn zu finden. Eine Ausnahme stellt hier die Hypophyse und das ventrale

Gewebe des Rückenmarks dar, in denen keine Transkripte detektiert wurden. Im Mes-/Metencephalon, dem Pronephros und den terminalen Bereichen des Embryos ist eine schwächere Expression detektierbar.



**Abbildung 9 :** „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung mit *Xenopus* Karyopherin  $\beta 3$  antisense RNA.

Karyopherin  $\beta 3$  Transkripte wurden in einer „whole mount“ *in situ* Hybridisierung mit Digoxigenin markierten Gegenstrang-RNA Sonden von Karyopherin  $\beta 3$  in Neurula-, Schwanzknospen- und Schwanzspitzenstadien von Albino-Embryonen detektiert. Geeignete Embryonen wurden in Gelatine-Albumin eingebettet und 30  $\mu\text{m}$  Vibratomschnitte angefertigt. (A) Die Frontalansicht und (B) der Parasagittalschnitt des Neurulastadiums (Stadium 16) zeigen eine starke Expression von Karyopherin  $\beta 3$  in der a, Augenanlage und schwache Expression in der sn, sensorischen Schicht des Neuroektoderms. (C) In der Seitenansicht des Stadiums 23 treten Karyopherin  $\beta 3$  Transkripte in dem au, Auge, den ki, Kiemenbögen und in der sk, Schwanzknospe auf. In der hd, embryonalen Haftdrüse ist keine Expression nachweisbar. (D) Im horizontalen Schnitt des Stadiums 23 ist eine starke Expression in dem Auge und den Kiemenbögen zu sehen. Schwächere Expressionslevel sind in dem mh, Mittelhirn und der sk, Schwanzknospe detektierbar. (E) Im Stadium 29 Embryo (auch gezeigt in F-J) sind Karyopherin  $\beta 3$  Transkripte in dem Auge, den Kiemenbögen, der ss, Schwanzspitze und in der Region von Vorder- und Mittelhirn stark exprimiert.

Ausgenommen ist die e, Epiphyse, hier treten keine Transkripte auf. (F) In dem Parasagittalschnitt eines späten Schwanzknospenstadien Embryos ist die Karyopherin  $\beta 3$  Expression sichtbar in h, Herz, Schwanzspitze, v, Vorderhirn, Mittelhirn und km, Kopfmesenchym. Keine Expression tritt auf in n, Notochord, en, Endoderm und der embryonalen Haftdrüse. (G) Der Frontalschnitt der Augen/Mittelhirnregion zeigt eine starke Expressionssteigerung in den Augen und der dorsalen Region des Mittelhirns, ein schwächeres Signal wird im Mittelhirnboden und km, Kopfmesenchym detektiert. Keine Expression ist in der embryonalen Haftdrüse, ma, Anlage des Magens und der Epiphyse zu sehen. (H) Die partielle Vergrößerung von G zeigt eine differentielle Verteilung des Signals im Mittelhirn und kein Signal in der ep, Epidermis. (I) Frontaler Schnitt direkt hinter dem Kopf mit starker Expression in der nl, Neuralleiste, dem rd, Rückenmarksdach, und dem lm, lateralen Mesoderm. (J) Posteriorer Schnitt des Embryos. Die Expression in den Rückenmarkszellen ist schwach. Eine stärkere Expression ist sichtbar in der p, Pronephrosregion und in dem rd, Rückenmarksdach. Eine schwache Expression ist in dem rb, Rückenmarksboden detektierbar.

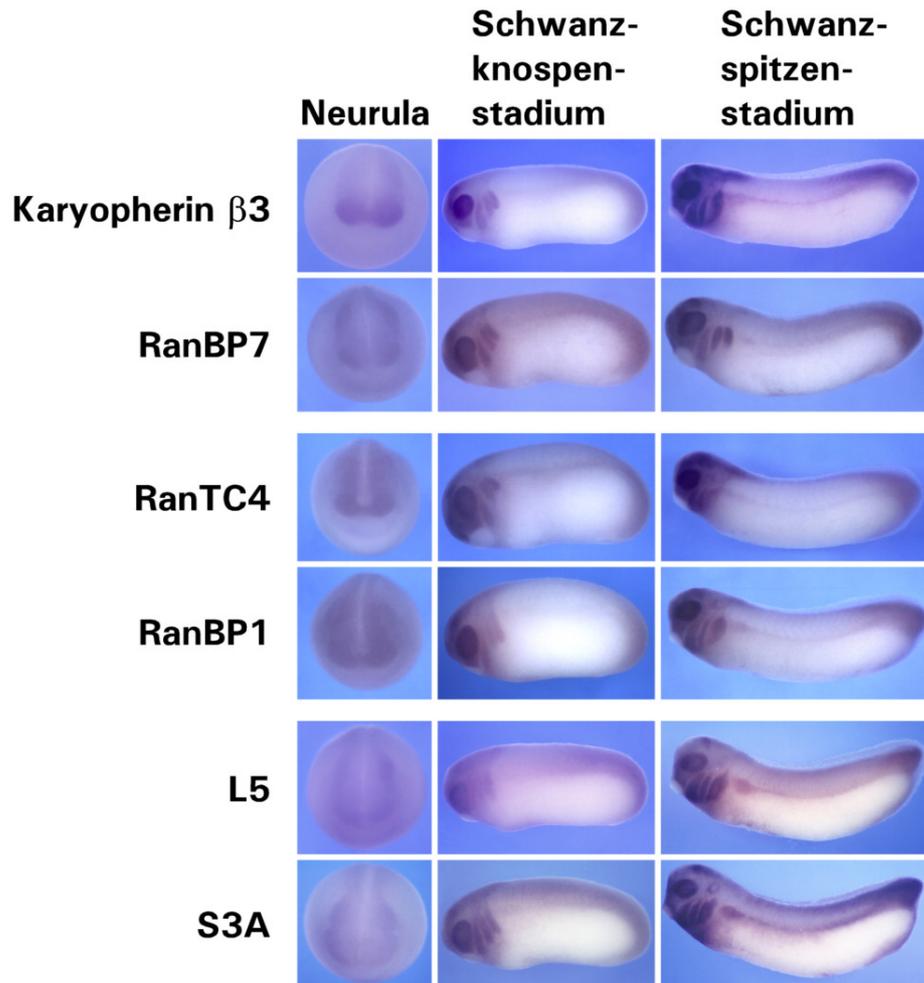
#### 3.2.5 Ribosomale Proteine und ihre Transportfaktoren definieren eine neue Synexpressionsgruppe

Expressionsmusteranalysen mit zufällig ausgewählter cDNA zeigten die Existenz von Gengruppen mit stark koordinierter Expression. Gene dieser Gruppen stehen innerhalb der Zelle in einem funktionellem Zusammenhang und werden als Synexpressionsgruppen beschrieben. Die biologischen Prozesse, in die solche Gene involviert sind, reichen von generellen zellulären Aktivitäten wie Transportprozessen des endoplasmatischen Reticulums bis hin zu spezifischen, regulatorischen Prozessen wie beim BMP-4 oder Delta-1 Signalweg (Niehrs und Pollet, 1999). Die differentielle Expression von Proteinen, welche in den nukleocytoplasmatischen Transport involviert sind, ist bisher nur von einigen Karyopherin  $\alpha$  Varianten in RT-PCR Analysen oder Northern-Blots beschrieben worden (Kamei *et al.*, 1999; Köhler *et al.*, 1999; Nachury *et al.*, 1998; Tsuji *et al.*, 1997). Karyopherin  $\beta 3$  zeigt ein differentielles Expressionsmuster (siehe 3.2.4) und ist vermutlich in den Import ribosomaler Proteine involviert (Yaseen und Blobel, 1997). Die Existenz einer Synexpressionsgruppe bestehend aus ribosomalen Proteinen, ihren Transportfaktoren und assoziierten Proteinen wäre nach den oben angegebenen Beobachtungen naheliegend. Um die Existenz eines solchen gemeinsamen Expressionsprofils nachzuweisen, wurde die Expression verschiedener ribosomaler Proteine, verschiedener putativer Transportfaktoren und verschiedener transportassoziierter Proteine in einer „whole mount“ *in situ* Analyse untersucht.

Für die Analyse wurden cDNA Fragmente von L3, L6, L7A, S8 und S3A aus einer homogenen Phagenfraktion, die aus der Durchmusterung einer *Xenopus*-Schwanzspitzen-cDNA-Bank (Sölter, 1999) stammen, mit den Primern CMV-F und CMV-R amplifiziert. Die PCR Produkte enthielten einen T7 Promotor. L5 pCS2+ stammt aus unserem Labor (Claußen *et al.*, 1999). Ausgehend von einer in unserem Labor vorhandenen RanTC4 Sequenz wurden

RanTC4 spezifische Primer entworfen. Das aus einer RT-PCR auf Testis RNA hervorgegangene 500 bp RanTC4 Transkript wurde EcoR I/Xho I in den pCS2+ Vektor überführt. Plasmide mit den Sequenzen von RanBP1 und RanGAP1 wurden von Mary Dasso, XSUMO-1 von Ducan Sparrow, Karyopherin  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  von Dirk Görlich und Transportin von Gideon Dreyfuss bezogen und wie in Tabelle 4 angegeben in den pCS2+ Vektor überführt.

Indirekt in den nukleocytoplasmatischen Transport involvierte Proteine wie RanTC4 und RanBP1 verhalten sich hinsichtlich ihres Expressionsmusters wie Karyopherin  $\beta 3$ . Expressionsmuster von Proteinen der großen ribosomalen Untereinheit (L3, L6, L7A und L5) zeigen dasselbe Muster wie Karyopherin  $\beta 3$ . Für die Expression von ribosomalen Proteinen der kleinen Untereinheit wie S8 und S3A lässt sich ein vergleichbares Muster nachweisen (Abbildung 10 und nicht gezeigt). Das Expressionsmuster aller oben genannten Gene im *Xenopus* Embryo lässt sich wie folgt beschreiben: Mit der Neurulation tritt ein starkes Expressionssignal in der embryonalen Augenanlage auf. Eine erhöhte Expression ist in der sensorischen Schicht des Neuroektoderms festzustellen. In Schwanzknospen- und frühen Schwanzspitzenstadien tritt ein starkes Signal in Augen, Kiemenbögen, Vorder-, Mittelhirn, den terminalen Embryobereichen und der Schwanzknospe auf. Für andere dem nukleocytoplasmatischen Transport assoziierte Gene, die nicht direkt in den Proteintransport ribosomaler Proteine involviert sind, wie SUMO-1 und p10 (NTF2), konnte ein entsprechendes Expressionsmuster nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Interessanterweise zeigten auch die Transportadapter Karyopherin  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$ , welche die klassischen NLS binden, in dieser Analyse keine differentielle Expression. Das weist zum einen auf einen anderen funktionellen Zusammenhang für  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  hin, zum anderen können an dieser Stelle weitere Transportadapter vermutet werden, die den Import von Proteinen mit klassischem Kernlokalisierungssignalsequenzen übernehmen und ein den ribosomalen Proteinen vergleichbares Expressionsmuster zeigen.



**Abbildung 10: Vergleichende Expressionsmusteranalyse.**

Gemeinsame Expressionsmerkmale von Transportrezeptoren, transportassoziierten Proteinen und ribosomalen Proteinen. Für Karyopherin  $\beta$ 3, RanBP7, RanBP1 und L5 wurde in der „whole mount“ *in situ* Hybridisierung antisense RNA eingesetzt, die komplementär zur gesamten Länge der kodierenden Sequenz war. Partielle antisense Sequenzen wurden für die *in situ* Hybridisierung von RanTC4 und S3A verwendet. Die dargestellten Beispiele sind in drei Gruppen angeordnet: Transportfaktoren (Karyopherin  $\beta$ 3 und RanBP7), Transportfaktor assoziierte Proteine (RanTC4 und RanBP1) und ribosomale Proteine (L5 und S3A). Neurulastadien sind in frontaler Ansicht, Schwanzknospens- und -spitzenstadien in lateraler Ansicht dargestellt.

Für die ribosomalen Proteine L5, L3, L6, L7A, S8, S3A, die transportassoziierten Proteine RanTC4, RanBP1 und die Transportfaktoren Transportin, Karyopherin  $\beta$ 3 und RanBP7 konnte ein gemeinsames Expressionsprofil nachgewiesen werden. Diese Proteine stehen hinsichtlich ihrer Funktion im nukleocytoplasmatischen Transport bei der Ribosomenbiogenese in einem funktionellen Zusammenhang. Die ribosomalen Proteine sind das Substrat, welches von den Transportfaktoren in das Zielkompartiment, den Zellkern, transportiert wird. Während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* zeigen sowohl ribosomale Proteine als auch die für den Import notwendigen Faktoren beginnend ab dem

Neurulastadium eine starke Expression in der Region der anterioren Neuralplatte, besonders im Augengebiet. In späteren Stadien tritt neben der starken Expression im Auge eine hohe Expression in Teilen des Gehirns, den Kiemenbögen und der Schwanzspitze auf. Diese Beobachtung des gemeinsamen Expressionsprofils von Proteinen, die in einem funktionellen Zusammenhang stehen, führt zu der Definition einer neuen Synexpressionsgruppe von ribosomalen Proteinen und ihren putativen Transportfaktoren. Für andere bisher noch nicht identifizierte Transportfaktoren würde man nach dieser Definition ein vergleichbares Expressionsmuster erwarten. Eine optische Selektion auf solche Muster sollte somit die Identifizierung weiterer in den nukleocytoplasmatischen Transport involvierter Gene ermöglichen.

### **3.3 Durchmusterung einer cDNA Bank aus embryonalem Augengewebe**

Ribosomale Proteine bilden mit ihren Transportfaktoren eine Synexpressionsgruppe (s.o.). Basierend auf Expressionsmustern in *Xenopus* Embryonen sollten neue Gene mit einer Funktion im ribosomalen Proteinimport oder Ribosomenexport identifiziert werden. Da eine starke Expression der Gene dieser Synexpressionsgruppe in embryonalen Augen auftritt, wurde eine ZAP-Express cDNA Phagenbank aus poly-A<sup>+</sup> RNA von embryonalem Augengewebe der Stadien 29-34 durch „whole mount“ *in situ* Hybridisierung nach optischen Kriterien durchgemustert. Die Sequenzanalyse der resultierenden Klone diente der Eliminierung redundanter Sequenzen und sollte eine funktionelle Zuordnung ermöglichen. Die Expression der Klone in einzelnen Geweben wurde nach ihrer Intensität bewertet. Mit den erhaltenen Werten wurden die Klone in Anlehnung an ein von Eisen und Spellman benutztes Verfahren (Eisen *et al.*, 1998; Spellman *et al.*, 1998) in mehreren Durchläufen anhand von verschiedenen Expressionsvektoren sortiert.

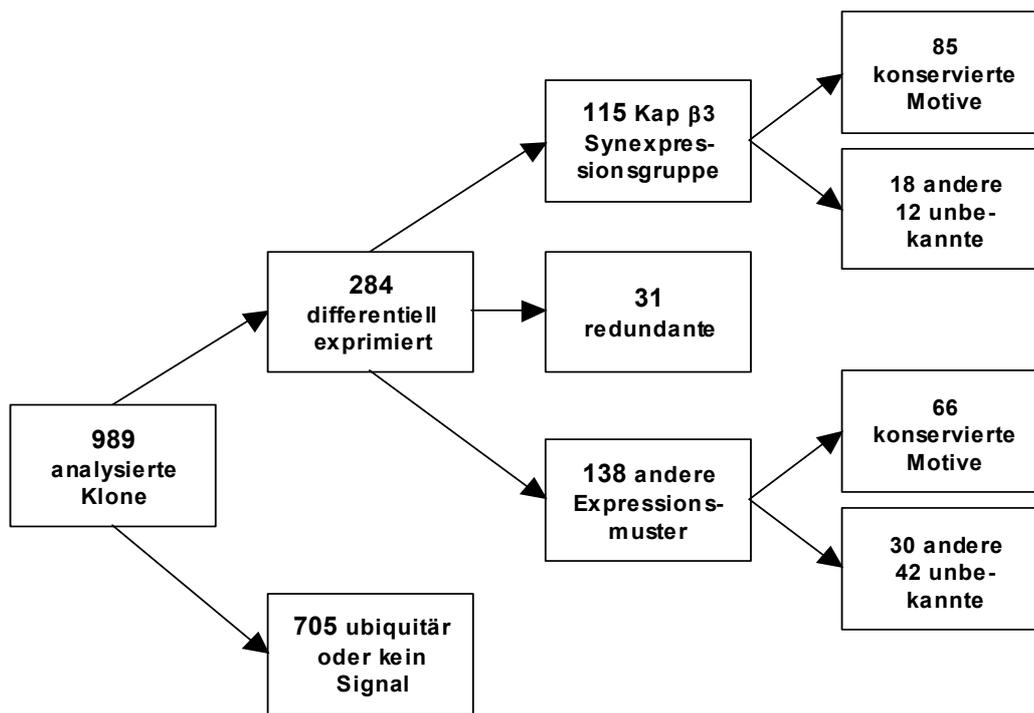
#### **3.3.1 Eine cDNA Bank aus embryonalem Augengewebe**

Aus mehr als 4000 embryonalen *Xenopus* Augen, ca. 200µl Gewebe, wurden 347µg Gesamt-RNA isoliert. Nach Reinigung der messenger-RNA über eine Oligo-dT-Cellulose Säule wurden 6,8 µg poly A<sup>+</sup> RNA erhalten. Für die Synthese von cDNA, welche für die Anfertigung einer cDNA-Phagenbank eingesetzt wurde, wurden 5µg mRNA verwendet. Von der größenfraktionierten cDNA wurden 4 Phagenfraktionen mit 438.000, 170.000, 220.000 und 57.000 Pfu (Plaque formende Einheiten) erhalten. Durch eine PCR auf Einzelphagen und anschließende Bestimmung der Produktgrößen konnte die durchschnittliche Größe in den

einzelnen Phagenfraktionen ermittelt werden. Die erhaltenen primären Phagenbanken hatten 876 Pfu/ $\mu$ l mit einer durchschnittlichen Insertgröße von 1325 Basenpaaren, 340 Pfu/ $\mu$ l (Insertgröße nicht bestimmt), 440 Pfu/ $\mu$ l mit einer durchschnittlichen Insertgröße von 1212 Basenpaaren und 114 Pfu/ $\mu$ l mit einer durchschnittlichen Insertgröße von 894 Basenpaaren. Da möglichst vollständige Klone isoliert werden sollten wurde die fraktionierte Phagenbank mit 876 Pfu/ $\mu$ l weiterverwendet. Nach Massenexzision der Fraktion mit den größten inserierten Fragmenten wurde die durchschnittliche Insertgröße mit 1470 Basenpaaren bestimmt. Mit PCR-Fragmenten von Einzelklonen aus diesem Bakterienpool wurde Digoxigenin markierte RNA synthetisiert und für eine maschinell durchgeführte „whole mount“ *in situ* Analyse (siehe 2.2.8.9) zur optischen Detektion von Karyopherin  $\beta$ 3 ähnlichen Expressionsmustern eingesetzt.

#### 3.3.2 Statistische Übersicht

Von 1152 analysierten Klonen wurde bei 989 Klonen ein Expressionssignal nachgewiesen. Das fehlende Signal bei den verbleibenden 168 Klonen ist auf die technische Limitierung der „whole mount“ *in situ* Prozedur zurückzuführen (Gawantka *et al.*, 1998; Sölter, 1999). 284 Klone zeigen ein starkes differentielles Expressionsmuster und wurden von ihrem 5' Ende aus zum Teil sequenziert. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit Hilfe der verschiedenen BLAST („Basic Local Alignment Search Tool“) Programme analysiert. 47 dieser Klone traten mehrfach auf und repräsentierten 16 verschiedene Gene (Tabelle 12). Von den 253 nicht redundanten Sequenzen entsprachen 93 (37 %) Sequenzen, die aus *Xenopus* bekannt sind, für 106 (42 %) der Sequenzen konnten Homologe aus anderen Organismen gefunden werden, und 54 (21 %) der Sequenzen waren sowohl auf Protein- als auch auf Nukleotidsequenzebene unbekannt.



**Abbildung 11 : Schematische Übersicht der Expressions- und Sequenzdaten der Durchmusterung einer cDNA-Bank aus embryonalem Augengewebe.**

Die Klassifizierung der Klone mit einem Expressionssignal erfolgte zunächst nach ihrem Expressionsmuster, anschließend nach ihrer angenommenen Funktion. Angegeben ist die jeweilige Anzahl der Klone innerhalb der verschiedenen Gruppen. Die Gruppe der Redundanten beinhaltet bekannte, mehrfach isolierte Gene (Tabelle 12), die sowohl der Karyopherin  $\beta 3$  Synexpressionsgruppe zuzuordnen sind als auch andere Expressionsmuster aufweisen. Anderen und unbekannt Klonen konnte keine Funktion zugeordnet werden.

Die Gruppierung der Klone nach dem auftretenden Expressionsmusterprofil ergibt als größte Gruppe 115 Klone mit einem Profil, das dem von Karyopherin  $\beta 3$  (Wischnewski *et al.*, 2000) entspricht. Innerhalb dieser Gruppe traten Homologe zu aus *Xenopus* bekannten Sequenzen mit einem Anteil von 48 % (55) und Homologe zu Sequenzen aus anderen Organismen mit 42 % (48) auf. Unbekannt waren 10 % (12). Von den 138 Anderen wurden 33 % (45) als homolog zu Sequenzen aus *Xenopus* und 37 % (51) als homolog zu Sequenzen aus anderen Organismen eingestuft. Unbekannte innerhalb dieser Gruppe treten mit einem gegenüber der Karyopherin  $\beta 3$  Gruppe erhöhten Anteil von 30 % (42) auf (Tabelle 10). Bei Betrachtung der Verteilung von Funktionsgruppen fällt auf, dass DNA-bindende Sequenzmotive innerhalb der Karyopherin  $\beta 3$  Synexpressionsgruppe halb so oft auftreten wie im Durchschnitt der anderen Gruppen. Sequenzmotive von Chromatinproteinen sind hingegen mit einem deutlich höheren Anteil in der Karyopherin  $\beta 3$  Synexpressionsgruppe als im Durchschnitt der anderen Gruppen zu finden (Tabelle 9). Signifikante Unterschiede in der Verteilung der Sequenzhomologen von RNA bindenden Proteinen zeigen einen um 8 %

höheren Anteil in der Karyopherin  $\beta 3$  Synexpressionsgruppe gegenüber der Summe der anderen Gruppen.

	N= 85 Karyopherin $\beta 3$ Gruppe	N= 66 Andere Gruppen
DNA-bindende Proteine	14 %	26 %
Chromatin Proteine	13 %	1,5 %
RNA-bindende Proteine	22 %	14 %
Kerntransport	2 %	0 %
Ribosomal	16 %	0 %
Translation	2 %	1,5 %
Vesikulärer Transport	1 %	1,5 %
Strukturprotein	4 %	18 %
Eisenspeicher Proteine	0 %	4,5 %
Sonstige	25 %	33 %

**Tabelle 9: Verteilung der gefundenen Funktionsgruppen.**

Prozentuale Verteilung von zugeordneten Sequenzfunktionen innerhalb der Karyopherin  $\beta 3$  Synexpressionsgruppe im Vergleich zu der Summe aus anderen Gruppen. Eine Zuordnung der Klone erfolgte zunächst über ihre Nukleinsäurebindungs-fähigkeit anschließend wurde soweit möglich nach anderen Funktionen zugeordnet. In der Karyopherin-Gruppe tritt ein Rundungsfehler von 1 % auf.

In Übereinstimmung mit unserer Ausgangshypothese bilden Sequenzhomologe ribosomaler Proteine (14) und Sequenzhomologe transportprozeßbezogener Proteine, wie das in *Xenopus* neue Karyopherin- $\alpha$  Homolog und Sam68 (siehe unten), mit einem Anteil von 18 % einen Teil der Karyopherin  $\beta 3$  Synexpressionsgruppe. Die beiden funktionellen Gruppen (Transport involvierte Proteine und ribosomale Proteine) treten ausschließlich in der Karyopherin  $\beta 3$  Synexpressionsgruppe auf.

Für Sequenzmotivhomologe, die in den vesikulären Transport involviert sind, ist im Gegensatz zu Homologen kerntransportassoziiierter Proteine kein erhöhter Anteil in der Karyopherin  $\beta 3$  Synexpressionsgruppe festzustellen. Der Anteil homologer Sequenzen von Struktur- und Eisenspeicher Proteinen in der Karyopherin  $\beta 3$  Synexpressionsgruppe ist deutlich geringer als der Anteil in der Summe der anderen Gruppen (Tabelle 9 und 10). Beide Funktionsgruppen bilden in Bezug auf ihre Expression in Cilienzellen eine Synexpressionsgruppe (Sölter, 1999).

<b>Karyopherin <math>\beta</math> 3 Synexpressionsgruppe</b>		<b>Sonstige Expressionsmuster</b>	
<b>Strukturprotein (3)</b>		<b>Strukturprotein (12)</b>	
AW158401	X. I.	Cofilin 1	X. I.
Fascin	X. I.	EG5	X. I.
Tubulin alpha chain (alpha T6)	T. m.	Lamin B1	X. I.
<b>Translation (2)</b>		Symplekin	H. s.
Eukaryotic translation initiation factor 2	H. s.	Targeting protein for Xklp2; TPX2	X. I.
Translation elongation factor EF-1 gamma	X. I.	Tubulin alpha 1	M. m.
<b>RNA-bindende Proteine (19)</b>		Tubulin alpha 6	M. m.
AF302423	X. I.	Tubulin alpha chain	X. I.
AW158433	X. I.	Tubulin alpha chain	X. I.
CG9253 gene product	D. m.	Tubulin beta 5	M. m.
Cold-inducible RNA-binding protein	X. I.	Tubulin beta-2 chain	X. I.
DsRNA-binding protein 4F.1 mRNA	X. I.	Tubulin-alpha	M. mu.
Elongation factor 1-alpha	X. I.	<b>Translation (1)</b>	
Eukaryotic translation initiation factor 3	H. s.	AW642277	X. I.
HEL117	R. n.	<b>RNA-bindende Proteine (9)</b>	
HnRNP AO protein: A0	H. s.	AF092565	H. s.
HnRNP L	H. s.	DKFZP564M2423, mRNA	H. s.
KIAA0099	H. s.	L10911 splicing factor	H. s.
Non-histone chromosome protein 2	H. s.	Nrp-1B	X. I.
Nucleolin	X. I.	RNA helicase Gu – human (fragment)	H. s.
PolyA binding protein	X. I.	RNA polymerase II, elongation factor	H. s.
RNA helicase	H. s.	tRNA-ribosyl-transferase	O. c.
Splicing factor	H. s.	U1 SNRNP A	X. I.
Splicing factor, arginine/serin-rich 2	M. m.	XFG 5-1 and XFG 5-2	X. I.
Translation initiation factor 4	H. s.	<b>Eisenspeicher (3)</b>	
Translation initiation factor eIF3 p66 subunit	H. s.	Ferritin heavy chain 1	X. I.
<b>Ribosomal (14)</b>		Ferritin heavy chain 2	H. s.
12sRNA	X. I.	Iron storage protein H-ferritin	T. v.
60S acidic ribosomal protein P1	M. m.	<b>DNA bindende Proteine (17)</b>	
Ribosomal protein L10	H. s.	AK027067	H. s.
Ribosomal protein L13A	S. s.	ATONAL protein HOMOLOG 3	X. I.
Ribosomal protein L15	X. I.	DNA methyltransferase 1	X. I.
Ribosomal protein L18A	R. n.	EGR1	X. I.
Ribosomal protein L1a	X. I.	H2A	H. s.
Ribosomal protein L4A (L1A)	X. I.	Homeobox protein SMOX-3	S. m.
Ribosomal protein L8	X. I.	Hypothetical protein HES6	H. s.
Ribosomal protein S2	M. m.	KIAA1341 protein	H. s.
Ribosomal protein S27	X. I.	LIM domain-containing homeodomain LH-2A	G. g.
Ribosomal protein S3A	O. I.	Neurogenic differentiation factor 1	X. I.
Ribosomal protein SA	U. c.	Otx-2	X. I.
Ribosomal protein SA (P40)	G. g.	Pax6	X. I.
<b>DNA bindende Proteine (12)</b>		Ribonucleotide reductase R1 class I	D. r.
ATF4 (AB013138)	G. g.	Ribosomal transcription factor xUBF	X. I.
Chromatin remodelling factor SWI1Lalpha	H. s.	SSB1	X. I.
COUP transcription factor 1 mRNA	X. I.	Transcription elongation factor TFIIIS	X. I.
H3	H. s.	TXz.1 transposase pseudogene	P. p.
HMG1	G. g.	<b>Chromatin Proteine (1)</b>	
HnRNP A/B homology (Transkriptionsrepressor)	G. g.	Heterochromatin protein 1 gamma	X. I.

### 3. Ergebnisse

Karyopherin $\beta$ 3 Synexpressionsgruppe (Fortsetzung, DNA bindende Proteine)		Sonstige Expressionsmuster (Fortsetzung)	
Hypothetical protein DKFZp761D081	H. s.	<b>Vesikulärer Transport (1)</b>	
Q61412 homeobox protein	M. m.	COP-coated vesicle membrane protein P24	C. g.
Q9UN16 protein inhibitor of activated STAT	H. s.	<b>Sonstige (22)</b>	
SSB2	X. l.	Adenosylhomocysteinase 2	X. l.
Xath-3.	X. l.	AF218007	H. s.
Zygotic DNA replication factor MCM6b	X. l.	Alkyldihydroxyacetonephosphate synthase	C. p.
<b>Chromatin Proteine (11)</b>		Annexin VI (lipocortin VI)	B. t.
14-3-3 protein epsilon	X. l.	CIDE-A	M. m.
AF109733	H. s.	Creatine kinase	G. g.
BE189131	X. l.	Creatine kinase (EC 2.7.3.2) isozyme IV	X. l.
Histone deacetylase 1-2	X. l.	Cullin 3	H. s.
HMG-17	X. l.	Cytochrome B	X. l.
KIAA1047	H. s.	Cytochrome C oxidase polypeptid I	X. l.
Probable histone deacetylase 1-1 (HD1)	X. l.	Disabled	H. s.
SSXT protein	H. s.	HIRA interacting protein 4	H. s.
TCF-3 co-repressor CTBP	X. l.	Idx	X. l.
WS-betaTRP	H. s.	KIAA1564	H. s.
XCAP-C	X. l.	Methionine adenosyltransferase II, alpha	H. s.
<b>Vesikulärer Transport (1)</b>		NADH dehydrogenase	H. s.
KIAA0755 gene product	H. s.	NADH dehydrogenase subunit 5	X. l.
<b>Kerntransport (2)</b>		P75NTRa	X. l.
Karyopherin $\alpha$ 3	H. s.	Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase	X. l.
Sam68deltaKH	H. s.	REM 1 sequence	X. l.
<b>Sonstige (21)</b>		Tetratricopeptide repeat domain 2	H. s.
Acetolactate synthase	H. s.	Ubiquitin specific protease 8	H. s.
ADE2	G. g.	<b>Unbekannter Funktion (18)</b>	
Apoptosis inhibitor survivin	H. s.	AB015330	H. s.
CDC47-2p	X. l.	AC004982	H. s.
FK506-binding protein	X. l.	AE003524, CG6479 gene product	D. m.
Glutamine synthetase	X. l.	AL035289 hypothetical protein	H. s.
HEC	H. s.	Arginine-rich protein	H. s.
methylenetetrahydrofolate dehydrogenase	X. l.	AW147681	X. l.
NADH dehydrogenase subunit 4	X. l.	Beta-B1 crystallin	M. m.
Ornithine decarboxylase (ODC)	X. l.	Exostosin-1	M. m.
PGLa	X. l.	FLJ00069	H. s.
Phospholipase C-gamma-1a	X. l.	FLJ10142 hypothetical protein	H. s.
Progesterone receptor complex P23	H. s.	KIAA0874 protein	H. s.
Proteasome subunit L	R. n.	Ndr1	M. m.
Proteasome theta-chain, -component C10-II	O. m.	Nonsyndromic hearing impairment protein	M. m.
Q9NPJ1	H. s.	Phosphoneuroprotein 14	R. n.
RACK1	X. l.	Syntrophin, beta 2	H. s.
Radical fringe	X. l.	Tanabin	X. l.
Ubc9p	X. l.	XP_001712.1	H. s.
Ubiquitination factor E4B	H. s.	Zinc finger protein 147	H. s.
Uridine kinase	D. r.	<b>Homologie zu EST-Sequenzen (12)</b>	
<b>Unbekannte Funktion (12)</b>		AW633329	X. l.
WDR 3	H. s.	AW635901	X. l.
P4.1 TFF gene	X. l.	AW636607	X. l.
Nucleolar phosphoprotein	X. l.	AW640142	X. l.

Karyopherin $\beta$ 3 Synexpressionsgruppe (Fortsetzung, unbekannte Funktion)		Sonstige Expressionsmuster (Fortsetzung, Homologie zu EST- Sequenzen)	
Mab21	X. l.	AW640241	X. l.
KIAA1726	H. s.	AW640420	X. l.
L32987	P. w.	AW640554	X. l.
X05025	X. l.	AW643835	X. l.
DKFZP564M2423 protein	H. s.	AW645913	X. l.
CG11103 gene product	D. m.	BE507779	X. l.
ARS2	H. s.	BF231815	X. l.
AK022728	H. s.	BF614695	X. l.
AF312865	H. s.	<b>Unbekannte (42)</b>	
<b>Homologie zu EST-Sequenzen (6)</b>		42 x -	-
BG161660	X. l.		
BF612543	X. l.		
AW646388	X. l.		
AW637346	X. l.		
AW637133	X. l.		
AW634714	X. l.		
<b>Unbekannte (12)</b>			
12 x -			

**Tabelle 10: Identifizierung homologer Sequenzen von Klonen der Karyopherin  $\beta$ 3 Synexpressionsgruppe und Klonen sonstiger Expressionsmuster.**

Nach molekularer Funktion geordnete Liste der in der Durchmusterung aufgetretenen ähnlichen Datenbanksequenzen mit der zugehörigen Spezies. Die homologen Motive stammen aus folgenden Spezies: B. t. *Bos taurus*, D. r. *Danio rerio*, D. m. *Drosophila melanogaster*, M. m. *Mus musculus*, M. mu. *Macaca mulatta*, C. p. *Cavia porcellus*, C. g. *Cricetulus griseus*, G. g. *Gallus gallus*, H. s. *Homo sapiens*, O. l. *Oryzias latipes*, O. m. *Oncorhynchus mykiss*, O. c. *Oryctolagus cuniculus*, P. w. *Pleurodeles waltlii*, P. p. *Pleuronectes platessa*, R. n. *Rattus norvegicus*, S. m. *Schistosoma mansoni*, S. s. *Sus scrofa*, T. m. *Torpedo marmorata*, T. v. *Trichosurus vulpecula*, U. c. *Urechis caupo*, X. l. *Xenopus laevis*, - bisher unbekannt Sequenzen.

Aus der von embryonalem Augengewebe erstellten cDNA Bank konnten 115 Klone isoliert werden, die nach optischen Kriterien ein Karyopherin  $\beta$ 3 artiges Expressionsmuster zeigen. Klone von Genen, die in den nukleocytoplasmatischen Transport involviert sind, wie auch Klone ribosomaler Gene wurden ausschließlich in der Karyopherin  $\beta$ 3 Synexpressionsgruppe gefunden. Klone, die Sequenzen enthielten, die in andere Transportwege involviert sind, zeigten im Gegensatz zu Klonen des nukleocytoplasmatischen Transports keine spezifische Verteilung. Die Sequenzanalyse der Klone mit Karyopherin  $\beta$ 3 artigem Expressionsmuster zeigt eine signifikante Anreicherung von Sequenzen ribosomaler Proteine (16 % gegenüber 0 %). Dieser erhöhte Anteil ribosomaler Klone, der auf die optische Selektion in der vorgestellten Analyse zurückzuführen ist, zeigt, dass es möglich ist, Gengruppen, welche in einem funktionellem Bezug zueinander stehen, nach der hier vorgestellten Methode anzureichern. Putative Transportfaktoren ribosomaler Proteine und Transport assoziierte

Proteine zeigen dasselbe Expressionsmuster wie ribosomale Proteine und sollten, da sie für den Import ribosomaler Proteine benötigt werden und somit in einem funktionellem Zusammenhang mit den ribosomalen Proteinen stehen, in mit dem hier vorgestellten Verfahren ebenfalls isoliert werden können. In der Tat konnten 2 Klone, Sam68 und Karyopherin  $\alpha 3$ , isoliert werden, die in den nukleocytoplasmatischen Transport involviert sind. Die Anreicherung von Klonen mit einer Funktion bei dem nukleocytoplasmatischen Transport läge somit bei 2 %.

Karyopherin  $\beta$  verwandte Proteine weisen eine hohe Diversität auf. Somit kann in einer Datenbankanalyse mit einfachen BLAST Algorithmen nicht davon ausgegangen werden, dass Homologien von bisher unbekanntem Transportfaktoren zu bekannten Transportfaktoren identifiziert werden. Verwendet wurden hier auch nur Teilsequenzen der isolierten Klone. Eine Erfassung von putativen Transportfaktoren ist somit immer dann ausgeschlossen, wenn der homologe Bereich vom jeweiligen Klon außerhalb der im BLAST eingesetzten Sequenz liegt. 30 Klone mit Karyopherin  $\beta$  artigem Expressionsmuster konnte keine Funktion zugeordnet werden. Möglicherweise können sich unter den 30 Klonen weitere, in den nukleocytoplasmatischen Transport involvierte Gene befinden (siehe unten), was dann auch zu einer Anreicherung der in den Kerntransport involvierten Klone von mehr als 2 % führen würde.

#### **3.3.3 Sam68, ein Protein, welches möglicherweise am Export von RNA mit CTE oder RRE beteiligt ist**

Einer der beiden in der Durchmusterung der cDNA Bank aus embryonalem Augengewebe isolierten Klone ist homolog zu Sam68. Retrovirale mRNA kann über zwei verschiedene Wege exportiert werden. Eine Möglichkeit ist der CRM-1 abhängige Export über das HIV-1 Rev-Protein und das RRE (Rev Response Element) der RNA, ein anderer Exportweg ist CRM-1 unabhängig. Über das CTE (Constitutive Transport Element) binden zwei in den Export verwickelte Proteine, Tap und die RNA Helicase A. Expression von RNA mit RRE kann ebenfalls Rev unabhängig von Sam68 vermittelt werden. Sam68 ist ein Protein mit ungewöhnlichem, C-terminalem, 24 Aminosäuren langem Kerntransportsignal, das ein in verschiedenen RNA-bindenden Proteinen konserviertes Motiv, PPXXR, enthält, welches beispielsweise auch in hnRNP Proteinen zu finden ist (Ishidate *et al.*, 1997). Die RNA Helicase A bindet *in vivo* und *in vitro* an Sam68 und Tap. In Gegenwart von Tap führt eine Überexpression von Sam68 zur Aktivierung CTE- oder RRE-regulierter Reporter-Genexpression (Reddy *et al.*, 2000). In Übereinstimmung mit seinem Expressionsmuster und

der Bindung an Tap und Helicase A ist Sam68 ein Protein, welches aufgrund seiner putativen Funktion in die Gruppe der Kerntransportproteine einzuordnen ist.

#### **3.3.4 Eingrenzung der Kandidatenklone auf putative Ran bindende Proteine**

Von den durchgemusterten Klonen der cDNA Bank aus embryonalem Augengewebe konnte 85 Klonen nach der Sequenzanalyse mit dem Blast Programm eine eindeutige Funktion zugeordnet werden. Die verbleibenden 30 Klone mit Karyopherin  $\beta$  artigem Expressionsmuster zeigten in den Resultaten des Blast Programms keine auffälligen Homologien zu bekannten Transportfaktoren. Um eine weitere Eingrenzung von Kandidatengen vorzunehmen, wurde mit verschiedenen Sequenzanalyseprogrammen nach Ähnlichkeiten zu verschiedenen Mustern von bekannten, in den Kerntransport involvierten Proteinen gesucht.

Die Gruppe der Karyopherin  $\beta$  artigen Transportrezeptoren wird von einer Anzahl von Proteinen gebildet, die sich durch ihre Fähigkeit, Ran zu binden, auszeichnen. Phylogenetische Analysen der Karyopherin  $\beta$  verwandten Proteine beschränken sich oft auf einen bis zu 300 Aminosäuren erstreckenden Bereich in der Umgebung der Ran bindenden Domäne (RanBD) der einzelnen Proteine, da sonst der Abstammungsbaum an Konsistenz verlieren würde (Görlich *et al.*, 1997; Ohno *et al.*, 1998). Die Ran Bindung erfolgt über die Ran bindende Domäne (RanBD). Die RCC1 Signaturen sind abgeleitet von dem Ran bindenden Protein RCC1 und erfassen auch die Karyopherin  $\beta$  artigen Transportrezeptoren (siehe unten). Neben der Ran bindenden Domäne oder der RCC1 Signatur gibt es keine weiteren Sequenzmotive, die eine Gruppenzuordnung erlauben würden. Ziel der Durchmusterung war die Identifizierung von Transportrezeptoren, die vermutlich eine RanBD enthalten. Mithilfe der RCC1 Signatur sollte die Gruppe der Kandidaten für eine detailliertere Analyse ihrer Funktion hinsichtlich des nukleocytoplasmatischen Transports weiter eingegrenzt werden.

Das PROSCAN Programm ist ein Werkzeug mit dem Sequenzen fehlertolerant gegen die PROSITE Datenbank abgesucht werden können. In der PROSITE Datenbank sind biologisch signifikante Muster und Profile formuliert, die es mit geeigneten Computerprogrammen erlauben eine Verwandtschaft von der Sequenz eines unbekanntes Proteins zu Domänen bekannter Proteinfamilien aufzudecken. Bei Sequenzen, denen keine putative Funktion zugeordnet werden konnte (30 von 115), wurde mit dem PROSCAN Programm nach verschiedenen Signaturen gesucht, die ebenfalls in den bekannten Transportfaktoren zu finden sind. Humanes Karyopherin  $\beta$  z. B. besitzt eine zu 52 % der RCC1 Signatur ähnliche

### 3. Ergebnisse

Sequenz. Ähnlichkeiten zu der ABC-Transportersuperfamiliensignatur (ATP binding cassette superfamily) können mit bis zu 77 % gefunden werden. Zu 38 Signaturen von ribosomalen Proteinen besteht eine Ähnlichkeit von 50-72 %. Von den 30 Klonen sind 7 zu mindestens 50 % der RCC1 Signatur ähnlich, 9 der ABC-Transporterfamiliensignatur und 12 den Signaturen ribosomaler Proteine. Alle drei Klassen von Signaturen weisen 5 der abgeleiteten Sequenzen (bzw. der Homologen) auf. Sie könnten Gene von Proteinen repräsentieren, die mit Ran interagieren und in den nukleocytoplasmatischen Transport involviert sind.

Xl Karyopherin beta3	227	-----QN	DDSVLKSLVE	IADTVPKFLR	PHLEATLQLS	LKLFADRSls
Xl RanBP7	786	-----	-----	-----	-----	-----
Hs Karyopherin beta	296	-----	-----	-----	-----	-----
Xl Transportin	153	AVPDSEQDIR	PRFHRSRTVA	QPHEEDGIED	DDDDd----	-----
Hs CAS	446	-----	-----	-----	-----	-----
Hs Exportin	812	-----	-----	-----	-----	-----
Xl RanBP1	13	TSVDNTEASN	HDPHFEPivs	LPEQEIKTLE	<b>EDEEELFKMR</b>	<b>AKLFRFASen</b>
3p4g2	74	-----DTN	YDLKRSTPKR	QSDPSIRTQA	YDLEEKLPK	NKFesrsvps
			*****	*****	*****	*****
Xl Karyopherin beta3	269	n-----	-----	-----MQR	-----	-----
Xl RanBP7	786	-----	-----A	IAALYYSPPL	-----	-----
Hs Karyopherin beta	296	EASEAAEQGR	PPEHTSKFYA	KGALQYLVPI	-----	-----
Xl Transportin	189	-----	-----	-----	-----	-----
Hs CAS	446	-----	-----	-----	-----	-----
Hs Exportin	812	-----	-----	-----	-----	-----
Xl RanBP1	63	<b>DPPEWKERGT</b>	GDVKLLKHKE	KGTIRLLMRR	-----	-----
3p4g2	117	l-----	--VSISTNKP	QSTTPLrngi	lsvghlssqd	raspalysps
				*****	*****	*****
Xl Karyopherin beta3	273	-----	-----	-----	-----QLAMEV	-----
Xl RanBP7	797	-----	-----	-----LF	NTLENLRFPN	NEEPvtnhfi
Hs Karyopherin beta	326	-----	-----	-----LT	QTL-----	-----
Xl Transportin	189	-----	-----	-----	-----	-----
Hs CAS	446	-----	-----	-----	-----	-----
Hs Exportin	812	-----	-----	-----	-----	-----
Xl RanBP1	93	-----	-----	-----	-----	-----DKTLKI
3p4g2	156	<b>lmstkshgam</b>	sdcqypqcds	pvdagyysMM	NAYSNLSISG	GRSPDRRFSL
					**	*****
Xl Karyopherin beta3	279	IVTLSETAAA	MLRKHTSiva	qai-----	-----PQML	AMmvd----
Xl RanBP7	819	kqwlnv---	-----	-----DCFLGL	HDRKICVLGL	calieleqrp
Hs Karyopherin beta	331	-----	-----	-----	-----	-----
Xl Transportin	189	-----	-----	-----	-----	-----
Hs CAS	446	---HGITQAN	ELvnl----	-----	-----	-----
Hs Exportin	812	-----	-----	-----	-----	-----
Xl RanBP1	99	CANHAITPVM	ELKPNAGSDR	AWVWNTYADY	ADELpkPELL	AIrflnaena
3p4g2	206	DTDYRISSVA	SDCSSEGS	<b>LS CGSSDSYVGY</b>	NDRLMSALQI	h-----
				*****	*****	*****

#### Abbildung 12: Auszug einer Dialign Analyse der abgeleiteten Sequenz des 3p4g2 Klon.

Dargestellt ist ein ausgewählter Abschnitt einer Dialign Analyse mit der abgeleiteten Sequenz des 3p4g2 Klon. Verwendet wurde der größte in der partiellen Sequenz ermittelte Leserahmen. Fett markiert ist die Ran bindende Domäne von RanBP1. Fett markiert und unterstrichen sind Sequenzen, die in der PROSCAN Analyse eine Homologie zur RCC1 Signatur aufwiesen. Die Sterne unter den jeweiligen Sequenzabschnitten geben die Qualität der Homologie an. Maximal 5 Reihen Sterne werden von dem Programm vergeben, wenn bei 6 von 8 der zur Analyse eingereichten Proteinsequenzen ein homologer Bereich identifiziert wurde. Abkürzungen: Hs *Homo sapiens*, Xl *Xenopus laevis*.

Das Dialign Programm erkennt Homologien in entfernt miteinander verwandten Proteinen, auch wenn sie über eine längere Sequenz keine Sequenzähnlichkeiten aufweisen. Eine Homologie über mehrere längere Aminosäuresequenzen konnte mit dem Dialign Programm

(Morgenstern, 1999) bei 5 Sequenzen festgestellt werden. Zur Veranschaulichung der mit dieser Art der Analyse gewonnenen Daten ist in Abbildung 12 das exemplarische Beispiel ausgewählter Abschnitte einer Dialign Analyse mit integrierten PROSCAN Resultaten der abgeleiteten Sequenz von dem 3p4g2 Klon dargestellt. Auffällig ist in diesen dargestellten Abschnitten auch das Fehlen von gefundenen Homologien zu dem Superfamilienmitglied Exportin, welches in der Analyse generell nur kurze Abschnitte homologer Bereiche aufwies, was die oben erwähnte hohe Diversität in der Superfamilie verdeutlicht.

Von den 30 Klonen mit einem Expressionsmuster, das dem von Karyopherin  $\beta$  entspricht, und bei denen mit ihrer abgeleiteten Sequenz keine Funktionszuordnung getroffen werden konnte, wurde bei 5 eine RCC1 Signatur festgestellt. Eine weitere Bestätigung der Eingrenzung der Kandidaten auf 5 Klone erfolgte mit dem Dialign Programm, das eine Homologie der Kandidaten zu Karyopherin  $\beta$ , RanBP7 und Karyopherin  $\beta$  über einen größeren Bereich mehrerer Proteindomänen aufdecken konnte. Eine gesicherte Aussage über die Funktion der Klone 3p4g2, 3p6g11, 3p11a6 und 3p21e7 ist aufgrund der Homologie zur RCC1 Signatur nicht möglich, da eine theoretische Analyse mit dem Prosite Programm nur Hinweise auf die mögliche Einordnung einer Sequenz in eine Superfamilie geben kann. Die Homologie zur RCC1 Signatur liegt bei allen 5 Klonen jedoch über 52 %, d.h., sie ist größer als die Homologie von Karyopherin  $\beta$  zur RCC1 Signatur. Diese 5 Klone könnten somit Ran binden. Mit der Dialign Analyse wurden für die 5 Klone mehrere Bereiche mit Sequenzähnlichkeiten zu Mitgliedern der Karyopherin  $\beta$  Superfamilie gefunden.

Klon	RCC1 Signaturen (% Homologie)	Dialign (As Anzahl)
3p4g2	59,45,52,51	51, in Folge 44, 48 und 63
3p6g11	53, 52, 55, 56, 69, 57, 51	40, 22, 51 und 29
3p11a6	62	47, 36, 27
3p21e7	75, 52, 53	61, 37, 34
3p19a3	57	21, 40 mit großer Lücke

**Tabelle 11: Tabellarische Auflistung der Kandidatengene.**

Die mit dem PROSCAN Programm ermittelten Homologien zur RCC1 Signatur sind in Teilen von Hundert angegeben. Die Länge der vom Dialign Programm ermittelten homologen Bereiche von Klonen unbekannter Funktion ist im Vergleich zu X. l. Karyopherin  $\beta$ , 1093 As, X. l. RanBP7, 1038 As, H. s. Karyopherin  $\beta$ , 876 As, X. l. Transportin, 717 As, H. s. CAS, 971 As, H. s. Exportin, 962 As, X. l. RanBP1, 209 As dargestellt. Angegeben ist in Spalte zwei in Prozent die Homologie zur RCC1 Signatur. In Spalte drei ist die Anzahl, der mit dem Dialign gefundenen homologen Aminosäuren über eine Sequenzlänge von mindestens 20 Aminosäuren angegeben.

In der Karyopherin  $\beta$  Superfamilie ist eine konsistente Darstellung der Verwandtschaftsbeziehungen aufgrund der hohen Diversität der Karyopherin  $\beta$  artigen Proteine kaum möglich. Am besten wird dies durch die Ran bindenden Proteine Exportin 4, RanBP16 und Ran BP17 verdeutlicht, deren Einordnung in ein Verwandtschaftsdiagramm der Superfamilie nur mit dem Dialign Programm gelungen ist (Kutay *et al.*, 2000). Aufgrund der starken Sequenzabweichungen innerhalb der Karyopherin  $\beta$  Superfamilie wurde eine Verwandtschaftsanalyse, die von Karyopherin  $\beta$  bis CAS reicht, bisher nur mit den ersten 300 Aminosäuren durchgeführt, da der phylogenetische Baum andernfalls an Konsistenz verlieren würde (Görlich *et al.*, 1997). Selbst unter den in der Referenz verwendeten Bedingungen ist die Sequenzverwandtschaft zwischen den Mitgliedern der Superfamilie nur schwer nachvollziehbar. Eine Homologie kann demzufolge mit den klassischen Mitteln nicht unbedingt nachgewiesen werden.

Vor diesem Hintergrund sind die ermittelten Daten als Hinweis auf eine mögliche Funktion zu bewerten, welche die Kandidatenklone 3p4g2, 3p6g11, 3p11a6 und 3p21e7 deutlich von den verbleibenden 26 Klonen abhebt. Eine Einordnung in die Gruppe der möglicherweise in den nukleocytoplasmatischen Transport involvierten Proteine kann erst nach Vervollständigung der Sequenz der verbleibenden Kandidaten und einer Analyse der Ran Bindungsfähigkeit erfolgen.

#### **3.3.5 Karyopherin $\alpha 3$ ist ein neues Karyopherin $\alpha$ Homolog**

Der zweite Klon, der durch die Durchmusterung der cDNA Bank aus embryonalem Augengewebe isoliert werden konnte, ist *Xenopus* Karyopherin  $\alpha 3$ . Der erhaltene Klon war in seiner 5' Sequenz nicht vollständig. Anhand der zu Karyopherin  $\alpha 3$  passenden EST Sequenzen BE506353, BF427949 und AW147413 wurde der 5' Primer Kalpha3E entworfen und die Sequenz in anschließenden Klonierungen um die fehlenden 24 Nukleotide vervollständigt. Mit den Primern Kalpha3E und Kalpha3X wurde die Karyopherin  $\alpha 3$  Sequenz in den pCS2+ Vektor in die Schnittstellen EcoR I und Xho I überführt. Das resultierende Plasmid wurde für weitere Experimente eingesetzt. Karyopherin  $\alpha 3$  besitzt eine relative Molekülmasse von 57552 Dalton. Das Protein besteht aus 526 Aminosäuren. *Xenopus* Karyopherin  $\alpha 3$  ist zu 62 % identisch mit dem *Xenopus*  $\alpha 1$  und zu 78 % ähnlich. Die ersten 102 N-terminalen Aminosäuren repräsentieren nach Homologie die Karyopherin  $\beta$  Bindungsdomäne. Der C-terminale Rest des Proteins besteht nach Homologie aus 10 Armadillo artigen Sequenzmotiven. Karyopherin  $\alpha 3$  ist aus der Durchmusterung der cDNA Bank aus embryonalem Augengewebe hervorgegangen und wird im Gegensatz zu

### 3. Ergebnisse

Karyopherin  $\alpha 1$  in Neurula- und Schwanzspitzenstadien differentiell exprimiert (s.o.). Im Vergleich zu humanem Karyopherin  $\alpha 1$  besteht eine Identität von 74 % und eine Ähnlichkeit von 87 %. Es ist als nächstes verwandtes Karyopherin  $\alpha$  zu humanem Karyopherin  $\alpha 1$  und den *Xenopus* Varianten  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  in die erste Klasse der  $\alpha$  Karyopherine einzuordnen (siehe Abbildung 14).

```

H. s. Karyopherin  $\alpha 1$  MSTNENANTPAARLHRFKNKGKSTEMRRRR IEVNVELRKAKKDDQMLKRRNVSSFPDDA 60
X. l. Karyopherin  $\alpha 3$  --N---G***---T-----T-----T---EP 56

TSPLQE*NRNNQGTVNWSVDDIVKGINSSNVENQLQATQAARKLLSREKQPPIDNIIRAG 119
-----K-Q-G-TSSQ---EE--R-VANPSLDI-----RE----R--K-- 116

LIPKFVSFLGRTDCSPIQFESAWALTNIASGTSEQTKAVVDGGAIPAFISLLASPHAHIS 179
----L-T--AHS-----A-----D-----E--GV-----P--- 176

EQAVWALGNIAGDGSVFRDLVIKYGAVDPLLALLAVPDMSSLACGYLRNLTWTLSNLCRN 239
-----AY-----H---G-----G--L-T--T-----V----- 236

KNPAPPIDAVEQILPTLVRLHHDDPEVLADTCWAI SYLTDGPNERIGMVVKTGVPQLV 299
-----L--IQ-----I-----R-----V-----S-D--DV--R--L-SRI- 296

KLLGASELP I VTPALRAIGNIVTGTDEQTQVV IDAGALAVFPSLLTNPKTNIQKEATWTM 359
Q--ACG--TV---C--T-----L-----SA-TE---HH-N-----A--L 356

SNITAGRQDQIQQVNHGLVPFLVSVLSKADFKTQKEAVWAVTNYTSGGTVEQIVYLVHC 419
-----E---C--I-Y--EI-R-G-Y-----I-----ID--I---Q- 416

GIIIEPLMNLITAKDTKIILVILDAISNIFQAAEKLGETEKLSIMIEECGLDKIEALQNH 479
-----S---SV--S-TV--M---FT---A--D-I-----CL-V-----R-----S- 476

ENESVYKASLSLIEKYFSVEEEEDQNVVPETTSEGYTFQVQDQAPGTFNF 529
---Q-----AA-----A-DG--ESLA----AD--A---EG-THT----- 526

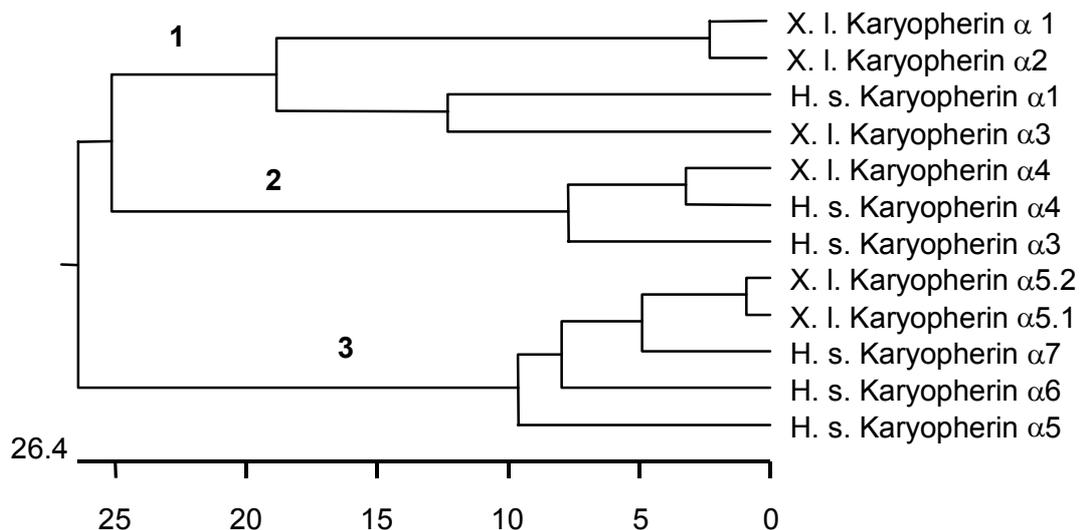
```

**Abbildung 13: Sequenzvergleich von *Xenopus* Karyopherin  $\alpha 3$  mit dem humanem  $\alpha 1$  Homolog.**

Aminosäuresequenzvergleich von *Xenopus* Karyopherin  $\alpha 3$  mit dem humanen  $\alpha 1$  Homolog (Zugriffsnummer: P52292). Identische Aminosäuren sind durch Bindestriche dargestellt, Deletionen werden durch Sterne angezeigt. Karyopherin  $\alpha 3$  ist zu 74 % identisch zu  $\alpha 1$  und zu 87 % ähnlich. Die durch Homologie identifizierte Karyopherin  $\beta$  bindende (IBB) Domäne von der *Xenopus* Karyopherin  $\alpha 3$  Variante wurde grau hinterlegt.

### 3.4 Isolierung der in *Xenopus* neuen Karyopherin $\alpha$ Homologen $\alpha 4$ und $\alpha 5$

Der anhand der EST Sequenz AW636855 erstellte Primer Alp430erF, der 39 Nukleotide „downstream“ des Startcodons in der 5' UTR von Karyopherin  $\alpha 4$  liegt, und der anhand der EST Sequenz BF048642 entworfene Primer Alp533erF, der 17 Nukleotide „downstream“ vom Startcodon liegt, wurde benutzt, um die kodierende Sequenz mit dem „SMART RACE cDNA Amplification Kit“ zu amplifizieren und in den AT-Klonierungsvektor pGemT zu überführen. Für die geplanten Experimente wurden die kodierenden Sequenzen mit den in Tabelle 4 angegebenen Primern und Schnittstellen in die Vektoren pCS2+ und pCS2+MT überführt. Die erzeugten Plasmide wurden mit den in Tabelle 5 angegebenen Primern sequenziert.



**Abbildung 14: Phylogenetischer Stammbaum der Karyopherin  $\alpha$  Proteinfamilie.**

Dargestellt sind die von *Homo sapiens* (H. s.) und *Xenopus laevis* (X. l.) bekannten Karyopherin  $\alpha$  Varianten  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  und die neuen isolierten Varianten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5.1$  und  $\alpha 5.2$ . Humanes Karyopherin  $\alpha 2$  ist nicht bekannt. Für humane Karyopherin Varianten wurden Sequenzen mit folgenden Zugriffsnummern verwendet:  $\alpha 1$ , P52292 (Rch1),  $\alpha 3$ , O00629,  $\alpha 4$ , O00505,  $\alpha 5$  P52294 (Srp1),  $\alpha 6$ , O15131 und  $\alpha 7$ , AF060543. Die verschiedenen Klassen der Karyopherin  $\alpha$  Familien sind in fetten schwarzen Ziffern angegeben.

*Xenopus* Karyopherin  $\alpha 4$  besitzt eine relative Molekülmasse von 57774 Dalton. Das Protein besteht aus 521 Aminosäuren. Karyopherin  $\alpha 4$  ist zu  $\alpha 1$  zu 46 % identisch und zu 64 % ähnlich. Im Vergleich zum humanen Karyopherin  $\alpha 4$  beträgt die Identität 93 % und die Ähnlichkeit 95 %. Karyopherin  $\alpha 4$  fällt somit in die zweite Karyopherinklasse. Die abgeleitete Sequenz von dem zweiten mit RACE isolierten Karyopherin,  $\alpha 5.1$ , besitzt eine relative Molekülmasse von 59812 Dalton. Das Protein besteht aus 537 Aminosäuren. Karyopherin  $\alpha 5$  ist zu  $\alpha 1$  zu 44 % identisch und zu 61 % ähnlich. *Xenopus* Karyopherin  $\alpha 5.1$

### 3. Ergebnisse

ist zu humanem Karyopherin  $\alpha 6$  zu 83 % identisch und zu 90 % ähnlich. Zu humanem Karyopherin  $\alpha 7$  beträgt die Identität 90 % und die Ähnlichkeit 93 %. *Xenopus* Karyopherin  $\alpha 5.2$  ist zu humanem Karyopherin  $\alpha 6$  zu 82 % identisch und zu 89 % ähnlich. Zu humanem Karyopherin  $\alpha 7$  beträgt die Identität 89 % und die Ähnlichkeit 93 %. Das nächste humane Homolog zu den beiden  $\alpha$  Allelen ist das in die dritte Karyopherin  $\alpha$  Klasse fallende Karyopherin  $\alpha 7$ .

```

H.s. Karyopherin  $\alpha 4$  MAENPSLENHRIKSFKNKGRDVETMRRHRNEVTVELRKNKRDEHLLKKNRNPQEESEDS 60
X.l. Karyopherin  $\alpha 4$  ---D-AG-D-----
                                     DVDADFKAQNVLTLEAILQNATSDNPVVQLSAVQAARKLLSSDQNPPIDDLKSGILPILV 120
                                     ---G---S--E-----R--N---A-----R-----
                                     KCLERDDNPSLQFEAAWALTNIASG TSAQTQAVVQSNVPLFLRLLRSPHQNVCEQAVWA 180
                                     ---A---P-----H-L-----
                                     LGNIIGDGPQCRDYVISLGVVKPLLSFISPSIPITFLRNVTWVI VNLCRNKDPPPPMETV 240
                                     -----N-----
                                     QEILPALCVLIYHTDINILVDTVWALS YLTDGGNEQIQMVIDSGVVPFLVPLLSHQEVKV 300
                                     -----F-----A-----
                                     QTAALRAVGNIVTGTDEQTQVVLNCDVLSHFNPILLSHPKEKINKEAVWFLSNITAGNQQQ 360
                                     -----P--H--T-----
                                     VQAVIDAGLIPMIIHQLAKGDFGTQKEAAWAISNLTISGRKDQVEYLVQQNVIPPFENLL 420
                                     -----S--
                                     SVKDSQVVQVVDGLKNILIMAGDEASTIAEIIIEECGGLEKIEVLQQHENEDIYKLAFEI 480
                                     -----E-----A-----E-----
                                     IDQYFSGDDIDEDPCLIPPEATQGGTYNFDPTANLQTKENF 521
                                     -----QS-V-D--P---H-E---S-----

```

**Abbildung 15: Sequenzvergleich von *Xenopus* Karyopherin  $\alpha 4$  mit dem humanen Karyopherin  $\alpha 4$  Homolog.**

Gegenüberstellung der neuen Karyopherin  $\alpha$  Variante aus *Xenopus*,  $\alpha 4$ , und dem humanen Homolog Karyopherin  $\alpha 4$ . Identische Aminosäuren sind durch Bindestriche dargestellt. Die Karyopherin  $\beta$  bindende Domäne liegt nach Homologie innerhalb der ersten 103 Aminosäuren. *Xenopus* Karyopherin  $\alpha 4$  hat im Verhältnis zu humanem  $\alpha 4$  eine Identität von 93 % und 95 % Ähnlichkeit. Sequenzen der *Xenopus* Karyopherin  $\alpha 4$  Variante, die Homologien zur Karyopherin  $\beta$  bindende Domäne (IBB) aufweisen, wurden grau hinterlegt.

### 3. Ergebnisse

H. s. K. $\alpha 7$	METMASPGKDNRYRMKSYKNNALNPEEMRRRREEEGIQLRKQKREOQLFKRRNVELINEEA	60
X. l. K. $\alpha 5.1$	-D-----S-----K-----AP-D-	60
X. l. K. $\alpha 5.2$	-D-----IS-----K-----AP-DT	
	AMFDSLLMDSYVSSTT*GESVI TREMVEMLFSDSDLQLATTQKFRKLLSKEPSPPIDEV	119
	---GP---H---P-DG---AL-L---P-----N-----	120
	---GP---C---P-DG---H---AL-L---P-----N-----	
	INTPRVVDRFVEFLKRNENCTLQFEAAWALTNIASGTSQQTKIVIEAGAVPIFIELLNSD	179
	--A-G--E-----KSD-Y-----Q-----	180
	-SS-G--E-----KSD-Y-----Q-----	
	FEDVQEQAVWALGNIAGDSSVCRDYVLNCSILNPLLTLTKSTRLTMRNAVWALSNLCR	239
	Y-----S-D--P--N-----	240
	Y-----S-D--L--N-----	
	GKNPPPEFAKVSPCLPVLSRLLFSSDSDLLADACWALSYSLSDGPNEKIQAVIDSGVCRRL	299
	-----D-D-----	300
	-----D--Q-----	
	VELLMHNDYKVASPALRAVGNIVTGDDIQTQVILNCSALPCLLHLLSSPKESIRKEACWT	359
	-----	360
	-----	
	ISNITAGNRAQIQAVIDANIFPVLIEILQKAEFRTRKEAAWAITNATSGGTPEQIRYLVS	419
	-----G--V-A-----N	420
	-----G--V-A-----N	
	LGCIKPLCDLLTVMSKIVQVALNGLENILRLGEGEKRSVSGVNPYCGLIEEAYGLDKI	479
	-----A-HG-N-I-----	480
	I-----A-HG-N-I-----	
	EFLQSHENQEIYQKAFDLIEHYFGVEDDDSSSLAPQVDETQQQFIFQQPEAPMEGFQL	536
	-----E-----E--PQ-V-S--S--Y--T-----	537
	-----E-----E--PQ-V-S--S--Y--T-----	

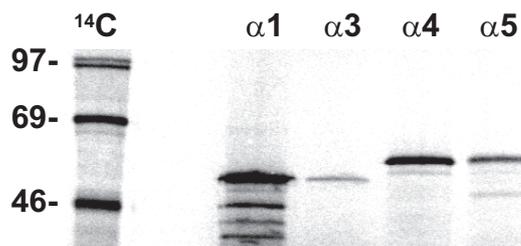
**Abbildung 16: Sequenzvergleich von *Xenopus* Karyopherin  $\alpha 5.1$  und  $5.2$  mit dem humanen Karyopherin  $\alpha 7$  Homolog.**

Gegenüberstellung der neuen Karyopherin  $\alpha$  Varianten aus *Xenopus*,  $\alpha 5.1$  und  $\alpha 5.2$ , mit ihrem humanen Homolog Karyopherin  $\alpha 7$ . Die Karyopherin  $\beta$  bindende Domäne liegt nach Homologie innerhalb der ersten 103 Aminosäuren. Der Vergleich der *Xenopus* Karyopherin  $\alpha$  Variante  $\alpha 5.1$  mit humanem Karyopherin  $\alpha 7$  ergibt eine Identität von 90 % und eine Ähnlichkeit von 93 %. Vergleicht man die *Xenopus* Karyopherin  $\alpha 5.2$  Variante mit ihrem humanen Homolog Karyopherin  $\alpha 7$  beträgt die Identität 89 % und die Ähnlichkeit 93 %. Der Unterschied innerhalb der Aminosäuresequenz der beiden Karyopherin  $\alpha$  Allele  $\alpha 5.1$  und  $\alpha 5.2$  voneinander beträgt in Identität und Ähnlichkeit 2 %. Durch einen Stern ist die Position gekennzeichnet, an der in den *Xenopus*  $\alpha$  Varianten eine zusätzliche Aminosäure vorkommt. Identische Aminosäuren sind durch einen Bindestrich dargestellt. Abweichungen in der Aminosäuresequenz der beiden *Xenopus* Varianten sind durch fettgedruckte Buchstaben hervorgehoben. Sequenzbereiche der *Xenopus* Karyopherin  $\alpha 5$  Varianten, die Homologien zur Karyopherin  $\beta$  bindende Domäne (IBB) zeigen, wurden grau hinterlegt.

#### 3.4.1 *In vitro* Translation der Konstrukte

Um die Vollständigkeit und den Leserahmen der klonierten Karyopherin  $\alpha$  Varianten zu testen, wurden die Varianten mit Reticulocytenlysate in einem gekoppelten  $T_{NT}$  Transkriptions-Translations-Ansatz exprimiert. Die Trennung auf einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel zeigt die verschiedenen translatierten Varianten. Alle dargestellten Karyopherin  $\alpha$  Varianten wurden im  $T_{NT}$  Reticulocytenlysate exprimiert. Die Proteine, welche

von den primär erhaltenen Plasmiden exprimiert wurden, zeigen die erwartete Größe von 60 kd. Die Proteinausbeute liegt nach Herstellerangaben zwischen 0,1 und 0,5 pmol/μl. Die Proteinstatistik des DNA-Star Softwarepakets ermittelt einen isoelektrischen Punkt für Karyopherin α3 von pH 5,294 und eine Ladung von -12,630 bei pH 7. Karyopherin α4 trägt deutlich mehr negative Ladungen. Der isoelektrische Punkt liegt bei pH 4,711 und die Ladung bei pH 7 entspricht -26,095.



**Abbildung 17: Analyse der Karyopherin α1, α3, α4 und α5 Primärklone.**

Alpha1 wurde als pCS2+ Karyopherin α1 mit SP6-RNA-Polymerase exprimiert. Karyopherin α1 und α4 liegen im pGEM®-T Vektor in SP6 Orientierung vor. Karyopherin α3 liegt im pBK-CMV Vektorplasmid vor und wurde mit T3-RNA-Polymerase exprimiert. Es wurde 1 μl des T<sub>N</sub>T Transkriptions-Translations-Ansatzes der jeweiligen Variante aufgetragen.

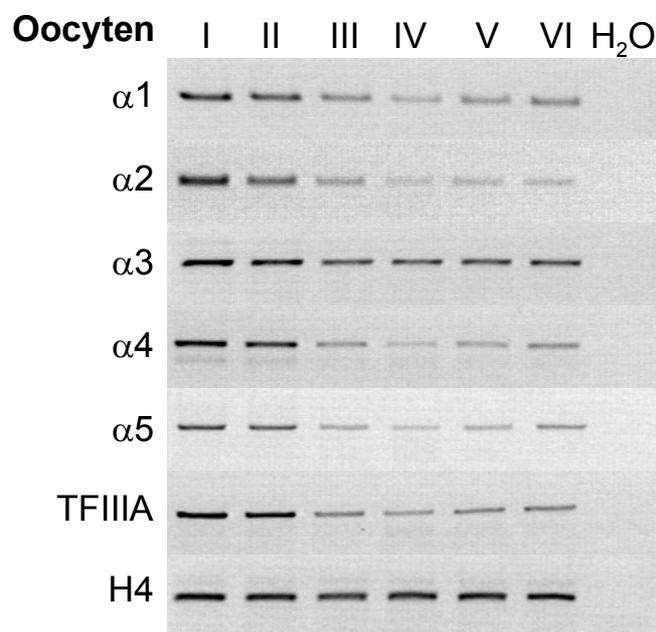
Alle isolierten primären Klone der Karyopherin α Varianten sind in dem Reticulocytensystem exprimierbar und zeigen die erwarteten Proteingrößen von ca. 60 kd. Die isolierten Karyopherin α Varianten α4 und α5 sind entsprechend ihrer von der cDNA abgeleiteten Sequenz 2 kd größer als die Varianten α1, α2 und α3.

### 3.5 TFIIIA und Karyopherin α

#### 3.5.1 RT-PCR Expressionsanalyse von *Xenopus laevis* Karyopherin α Varianten im Vergleich zu dem Zinkfingerprotein TFIIIA

Zur Betrachtung des Expressionsverhaltens der verschiedenen α Varianten im Vergleich zu TFIIIA wurde zur räumlich-zeitlichen Auflösung mit Hilfe der RT-PCR Technik eine Analyse auf Gesamt-RNA von verschiedenen Oocytenstadien, Emryonalstadien und adulten Geweben durchgeführt. Die auf die reverse Transkription nachfolgende PCR-Reaktion erfolgte im Bereich der linearen Amplifikationsrate. Somit können die erhaltenen Signalstärken zueinander in Bezug gesetzt werden, und man erhält eine semi-quantitative Aussage über die Menge des Transkripts (Panitz, 1998). Histon H4 wird in der frühen Phase

der *Xenopus* Embryonalentwicklung konstitutiv exprimiert (Niehrs *et al.*, 1994). Durch die Kontrolle mit Histon H4 in Abbildung 18 bis 20 werden in dem verwendeten Ausgangsmaterial einheitliche RNA Mengen nachgewiesen. Die verwendete RNA wurde auf Kontamination mit genomischer DNA überprüft. Um Kontaminationen der verwendeten Komponenten auszuschließen, wurde in den jeweiligen Kontrollansätzen als Negativkontrolle H<sub>2</sub>O anstelle von RNA-Lösung in den Reaktionsansatz gegeben. Die H<sub>2</sub>O Negativkontrolle in der Abbildung 19 ist auch für die Abbildung 20 gültig, da diese Reaktionen gemeinsam angesetzt wurden.



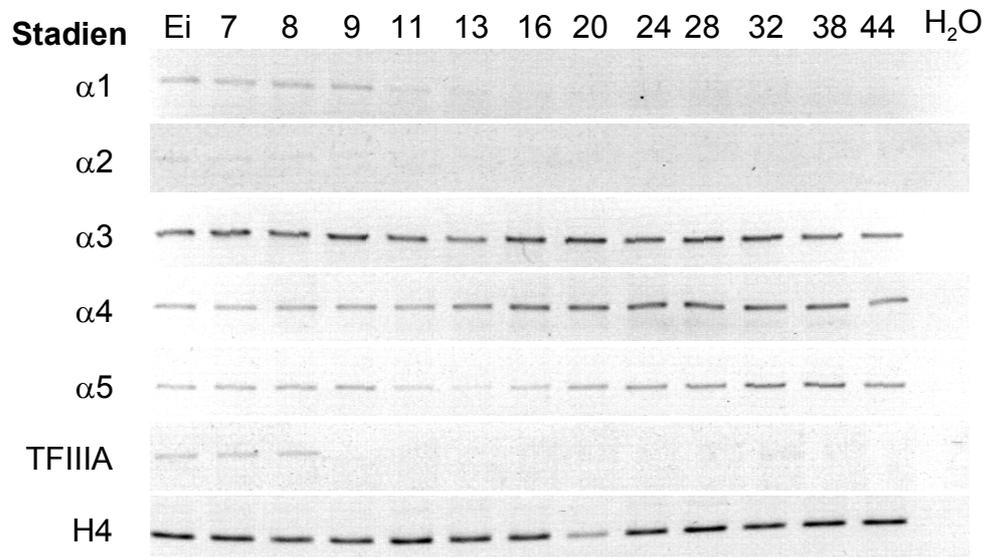
**Abbildung 18: Vergleichende Expressionsanalyse der Karyopherin Varianten  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  und TFIIIA während der Oogenese.**

Für die reverse Transkription mit „random“ Hexameren wurden jeweils 50 ng stadienspezifischer Gesamt RNA pro Reaktion eingesetzt. Die PCR erfolgte mit den Primern für  $\alpha 1$ , XIAlpha1F1, XIAlpha1R1,  $\alpha 2$ , XIAlpha2F1, XIAlpha2R1,  $\alpha 3$ , Ialp3CDS1F, Ialp3CDS1R,  $\alpha 4$ , Ialp45'UTRF, Ialp4CDS1R,  $\alpha 5$ , Ialp5CDS1F, Ialp5CDSa1R und für TFIIIA mit den Primern TFIIIAf1 und TFIIIAr1 (siehe Material und Methoden), die ein Amplifikationsprodukt von 200-350 Basenpaaren ergaben. Die Auftrennung der PCR Produkte erfolgte auf einem 2 %igem Agarosegel. Für die Darstellung wurde eine Negativansicht der unter UV Licht (254nm) vorgenommenen Fragmentvisualisierung gewählt. In den Oocyten Stadien I und II zeigen alle  $\alpha$  Varianten und TFIIIA eine erhöhte Expression. In den Stadien III bis VI ist bei der  $\alpha 3$  Variante im Gegensatz zur Expression von  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  und TFIIIA nur ein schwacher Abfall der Expressionsstärke zu sehen. Zur Kontrolle der eingesetzten Gesamt RNA Mengen wurden spezifische Primer für das Histon H4 verwendet.

In der RT-PCR Analyse der verschiedenen Karyopherin  $\alpha$  Varianten ist eine deutliche Reduzierung von den Expressionsstärken der  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  Varianten und TFIIIA während der Oogenese zu sehen. Generell zeigen alle untersuchten Gene während der frühen Oocytenstadien I und II eine starke Expression. Bei der Karyopherin  $\alpha 3$  Variante tritt im

Gegensatz zu der Expression anderer Karyopherin Varianten keine deutliche Reduzierung der Expressionsstärke auf. Während der Oogenese zeigen  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  im Gegensatz zu  $\alpha 3$  ein TFIIIA ähnliches Expressionsverhalten.

In der befruchteten Eizelle und den frühen Stadien 7 und 8 lassen sich alle untersuchten Transkripte nachweisen. Kurz nach Beginn der Midblastulatransition im Stadium 8, ab dem Stadium 9 bzw. 11 sind die maternalen Transkripte von  $\alpha 2$  und TFIIIA nicht mehr nachweisbar. Das Signal der Karyopherin  $\alpha 1$  Variante verschwindet vollständig mit dem Stadium 13. Im Stadium 11 liegt die geringste Transkriptanzahl der Karyopherinvariante  $\alpha 4$  vor. Im Stadium 13 liegt die geringste Transkriptanzahl der Karyopherin Varianten  $\alpha 3$  und  $\alpha 5$  vor. Auf die Stadien 11 bzw. 13 folgend findet eine verstärkte, zygotische Transkription der Karyopherin  $\alpha 4$  bzw.  $\alpha 3$  und  $\alpha 5$  Varianten statt. Deutlich erkennbar ist die verzögerte und schwächere zygotische Transkriptionsaktivierung der  $\alpha 5$  Variante ab Stadium 16. Gegenüber der  $\alpha 4$  Variante zeigt die  $\alpha 3$  Variante ebenfalls eine verzögerte zygotische Transkriptionsaktivierung. Maternale TFIIIA mRNA ist ab Stadium 9 unter den hier gewählten Bedingungen nicht mehr nachweisbar. In den Stadien 28 bis 38 sind sehr schwache heterogene Transkripte zygotischer TFIIIA Expression zu erkennen.

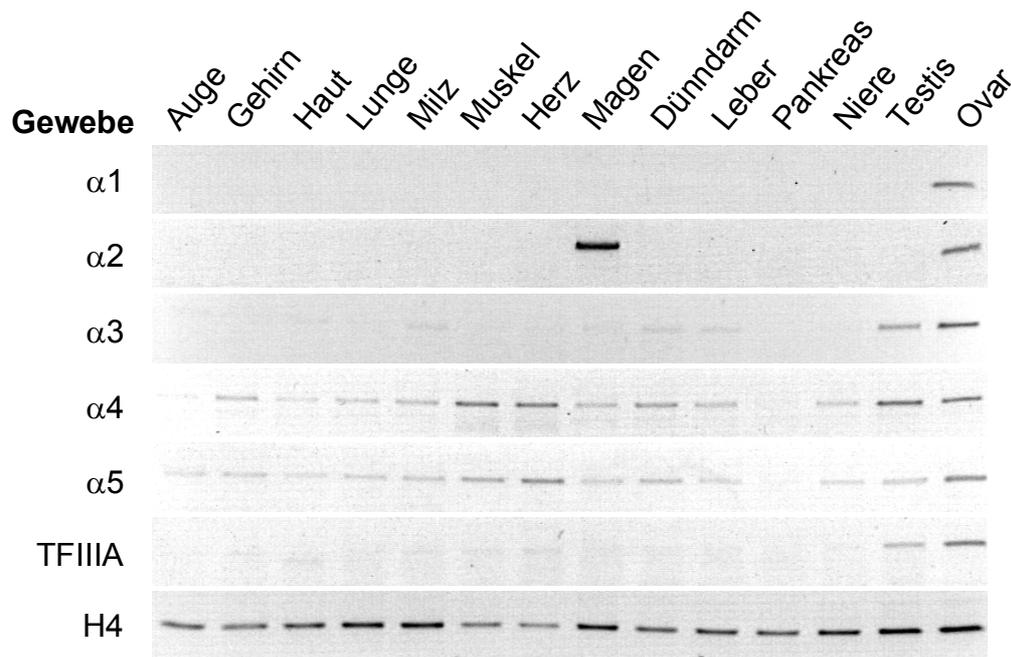


**Abbildung 19: Vergleichende Expressionsanalyse der Karyopherin Varianten  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  und TFIIIA während der frühen Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*.**

Die verwendeten Primer und angewandten Verfahren entsprechen der Beschreibung in Abbildung 18. Die beiden Karyopherin Varianten  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  und TFIIIA sind nur bis zu den Stadien 8 - 9 in signifikanten Mengen nachweisbar. TFIIIA ist unter den hier gewählten Bedingungen in späteren Stadien 20 bis 44 ausserordentlich schwach zu sehen. Die Karyopherin  $\alpha 3$  Variante ist in allen Stadien mit annähernd gleicher Intensität nachweisbar. Die Expression der Karyopherin  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  Varianten ist in den frühen Stadien Ei und 7 bis 13 schwächer als in den folgenden Stadien 20 bis 44. In der rechten Spur wurde den Reaktionsansätzen als Kontaminationskontrolle H<sub>2</sub>O anstelle von RNA hinzugefügt.

Die  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  Varianten zeigen in den frühen embryonalen Stadien maternale Transkripte. Es findet aber keine zygotische Transkriptionsaktivierung statt. Die Varianten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  zeigen im Gegensatz zu  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  eine biphasische Expression. Die Expression von TFIIIA ist ebenfalls biphasisch, allerdings liegt hier in frühen Embryonalstadien eine sehr geringe Transkriptanzahl heterogener mRNA vor (Shastry *et al.*, 1984). Die Expression von TFIIIA korreliert mit den Werten von Analysen anderer Laboratorien (siehe 1.7). Das Expressionsverhalten von TFIIIA,  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  ist in Oocyten und den frühen Embryonalstadien identisch. Eine von diesem Befund abweichende Expression zeigen die Varianten Karyopherin  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  mit ihrem biphasischen Expressionsverhalten.

Um die Limitierung der Expression auf einzelne Gewebe zu analysieren, wurden RT-PCR Analysen auf RNA Präparationen von verschiedenen Geweben adulter Frösche durchgeführt. Bei der RT-PCR Analyse auf verschiedenen Geweben ist jede der analysierten Varianten stark im Ovar exprimiert. Im Pankreasgewebe lässt sich nur Karyopherin  $\alpha 4$  mit sehr schwacher Expression nachweisen. Unter nicht kompetitiven Bedingungen sind die verwendeten Primerpaare für die  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  Variante nicht in der Lage zwischen den beiden Varianten zu unterscheiden (nicht gezeigt). Unter den kompetitiven Bedingungen der RT-PCR Analyse hingegen wird ein spezifisches Produkt gebildet. Mit dem Primerpaar für den Nachweis der  $\alpha 2$  Expression wird auf cDNA von Magengewebe ein Fragment von 480 Basenpaaren amplifiziert. Bei Karyopherin  $\alpha 3$ , welches in allen Embryonalstadien stark exprimiert wird, tritt ein sehr schwaches Signal in den meisten Geweben auf. Starke Signale sind nur in Testis und Ovar zu sehen. Karyopherin  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  zeigen in allen Geweben außer Pankreas ein deutliches Signal. Karyopherin  $\alpha 4$  ist sehr schwach im Pankreas, stark in Muskel, Herz, Testis und Ovar exprimiert. Karyopherin  $\alpha 5$  ist sehr schwach im Pankreas, stark in Muskel, Herz und Ovar exprimiert. Die PCR Produkte von TFIIIA geben in Testis und Ovar scharfe Banden. In den anderen Geweben sind heterogene Fragmente zu erkennen. Durch eine RT-PCR Analyse mit 40 Zyklen (nicht gezeigt) lässt sich eine Basislevelexpression von Karyopherin  $\alpha 3$  in allen untersuchten Geweben nachweisen.



**Abbildung 20: Vergleichende Expressionsanalyse der Karyopherin Varianten  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  und TFIIIA in adulten Geweben von *Xenopus laevis*.**

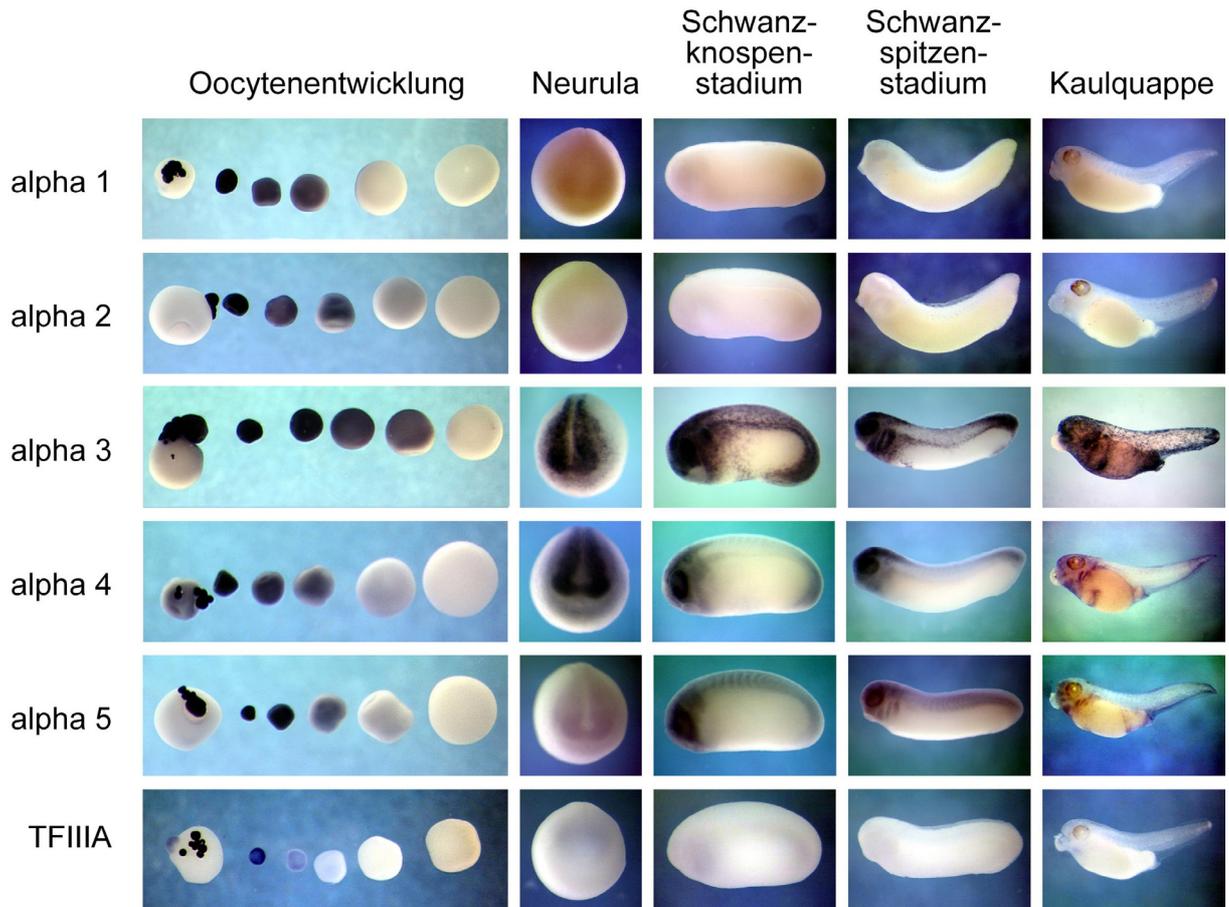
Für die reverse Transkription mit random Hexameren wurden jeweils 50 ng gewebespezifischer Gesamt RNA pro Reaktion eingesetzt. Angewandte Verfahren und verwendete Primer sind in Abbildung 18 beschrieben. Im Ovar ist jede der analysierten Varianten stark exprimiert. Karyopherin  $\alpha 1$  zeigt ausschließlich Expression auf RNA aus dem Ovar. Bei Karyopherin  $\alpha 2$  ist in der Magenspur ein Fragment zu sehen, das 300 Basenpaare größer ist als das erwartete PCR Produkt. Bei Karyopherin  $\alpha 3$  tritt ein sehr schwaches Signal in Milz, Dünndarm und Leber auf. Starke Signale sind in Testis und Ovar zu sehen. Karyopherin  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  zeigen in allen Geweben ein Signal. Karyopherin  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  sind sehr schwach im Pankreas exprimiert.  $\alpha 4$  ist stark in Muskel, Herz, Testis und Ovar und Karyopherin  $\alpha 5$  ist stark in Muskel, Herz und Ovar exprimiert. Die PCR Produkte von TFIIIA geben in Testis und Ovar scharfe Banden. In den anderen Geweben sind sehr schwache heterogene PCR Produkte zu erkennen.

Die RT-PCR Analysen zeigen ein identisches Expressionsverhalten von Karyopherin  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  und TFIIIA während der Oogenese und in den frühen Stadien der Embryonalentwicklung. Die Expression von Karyopherin  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  ist im Gegensatz zu den Varianten  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  biphasisch. Da das Expressionsverhalten von Karyopherin  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  und TFIIIA während der Oogenese und der frühen Embryonalentwicklung übereinstimmt, könnte TFIIIA ein Transportsubstrat der Karyopherin  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  Varianten sein.

### 3.5.2 Expressionsanalyse mit der „whole mount“ *in situ* Methode der Karyopherin $\alpha$ Varianten im Vergleich zu TFIIIA

Zur detaillierten Auflösung der räumlich-zeitlichen Expression der verschiedenen Karyopherin  $\alpha$  Varianten im Vergleich zu TFIIIA während der Embryonalentwicklung wurde eine „whole mount“ *in situ* Analyse auf Oocyten Stadien und ausgewählten Embryonalstadien von *Xenopus laevis* durchgeführt. Während der Oogenese zeigen alle untersuchten Gene eine

starke Expression in den Oocytenstadien I und II (Abbildung 21). Eine Reduzierung des Expressionssignals tritt bei TFIIIA vor allen anderen untersuchten Genen auf. In Stadium IV Oocyten ist in der Analyse von TFIIIA eine schwache Färbung zu erkennen. Die Transportadapter hingegen zeigen in diesem Stadium noch eine deutliche Färbung. Die Karyopherin  $\alpha 3$  Variante zeigt während der Stadien III, IV und V die intensivste Färbung. Während der Embryonalentwicklung ist in der „whole mount“ *in situ* Analyse keine Expression von TFIIIA und den Karyopherin  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  Varianten detektierbar. Mit dem Neurula Stadium ist eine intensive Färbung des Augenfeldes und der Neuralleisten in einem Karyopherin  $\beta 3$  ähnlichen Muster bei der  $\alpha 3$  Variante zu sehen. Ein vergleichbares, aber deutlich schwächeres Muster tritt bei Karyopherin  $\alpha 4$  auf. Karyopherin  $\alpha 5$  zeigt die schwächste Expression in diesem Stadium. Das Auge, die Kiemenbögen und der posteriore Bereich der Schwanzknospen- und Schwanzspitzenstadien sind bei den Varianten  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  vergleichbar stark angefärbt, zeigen aber im Vergleich zu  $\alpha 3$  eine deutlich schwächere Intensität. Im Kaulquappenstadium ist bei der  $\alpha 3$  Variante eine starke Färbung im posterioren Bereich der Schwanzspitze zu erkennen. Durch die nicht gefärbten Zwischenräume der epidermalen Färbung lassen sich starke Färbungen in Organen des anterioren Embryos erkennen. Posterior weist die das Proctodeum umgebende Region eine starke Expression auf. In den Kaulquappenstadien ist das Herz bei  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  und die Leber bei  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  deutlich angefärbt. Die Expression von Karyopherin  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  beschränkt sich auf die frühen Stadien der Oogenese. Ein ähnlicher Zustand ist für TFIIIA zu beobachten. Hingegen werden die Varianten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  zygotisch in unterschiedlichen Mengen exprimiert. Die Genaktivierung von  $\alpha 5$  erreicht eine den Varianten  $\alpha 3$  und  $\alpha 4$  vergleichbare Stärke erst im Schwanzknospenstadium.



**Abbildung 21: Expressionsmusteranalyse mit der „whole mount“ *in situ* Technik zur räumlich-zeitlichen Auflösung in der Oogenese und den frühen Entwicklungsstadien von *Xenopus laevis*.**

In der linken Spalte sind die verschiedenen Entwicklungsstufen der Oocyte während der Oogenese dargestellt. In Spalte 1 links sind Konglomerate von Stadium I Oocyten angeheftet an ältere Stadien mit starker Färbung zu sehen. TFIIIA RNA ist nur während der Stadien I und II stark in Oocyten exprimiert, ab der Stadium III Oocyte ist eine deutliche Reduzierung der Expression zu sehen. Die Expressionsstärken der Karyopherin  $\alpha$  Varianten  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  nehmen in Oocyten später als TFIIIA ab. Eine Reduzierung der Expressionsstärke von Karyopherin  $\alpha 3$  findet erst in älteren Oocytenstadien statt. Karyopherin  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  und TFIIIA zeigen in embryonalen Stadien keine Färbung. Die Färbung von  $\alpha 3$  ist ab dem Neurulastadium intensiver als die von  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$ . In den folgenden Schwanzspitzenstadien ist eine deutliche Färbung der Kiemenbogenregion zu sehen. Eine Kiemenbogenfärbung ist bei den  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  Varianten schwach ausgeprägt. Im Kaulquappenstadium ist eine epidermale Färbung der  $\alpha 3$  Variante zu erkennen. Die Karyopherin Varianten  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  zeigen eine schwache Färbung in früh gebildeten Organen.

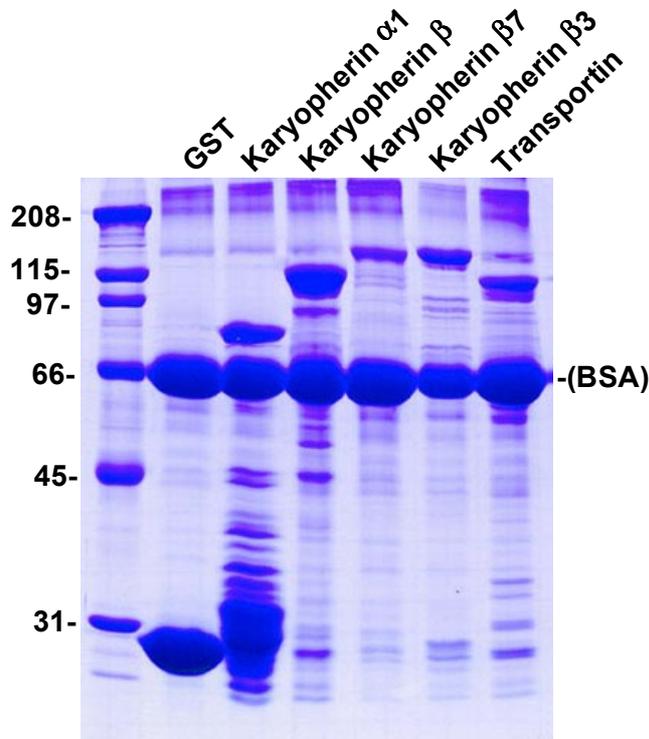
In Übereinstimmung mit den Resultaten der RT-PCR Analyse zeigen die Karyopherin Varianten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  ein in späten Stadien ausgeprägtes Expressionsmuster. Karyopherin  $\alpha 3$  zeigt im Gegensatz zu anderen Varianten und TFIIIA eine ausgeprägte Expression in der Schwanzspitze und den Cilienzellen der Haut. Die Expression von Karyopherin  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  Varianten und TFIIIA ist mit dieser Methode ab der späten Oogenese nicht mehr detektierbar. Dieses Ergebnis korreliert ebenfalls mit den Resultaten der RT-PCR Analyse, in der eine deutliche Reduktion der Expression von  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  und TFIIIA ab Stadium III Oocyten zu sehen ist. Ab den Stadien 9 bis 11 ist eine Expression von  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  sowohl in der RT-PCR Analyse als

auch in der „whole mount“ *in situ* Hybridisierung nicht mehr nachzuweisen. Die TFIIIA Expression wird in Übereinstimmung mit dem Expressionsprofil von  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  ab dem Stadium III der Oogenese deutlich reduziert und ab Stadium 9 der Embryonalentwicklung auf kaum detektierbare Mengen herabgesetzt. Diese Korrelation im Expressionsprofil von TFIIIA und den Karyopherin Varianten  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  zeigt, dass sowohl ein Transportadapter als auch ein putatives Substrat (TFIIIA) in Bezug auf ihr zeitliches und räumliches Auftreten die Möglichkeit haben, miteinander zu interagieren. TFIIIA könnte somit ein Transportsubstrat von Karyopherin  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  sein.

#### **3.5.3 TFIIIA interagiert mit Karyopherin $\alpha$ , aber nicht mit RanBP7, Karyopherin $\beta$ , Karyopherin $\beta 3$ oder Transportin**

Die Expressionsprofile von TFIIIA und Karyopherin  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  zeigen eine starke Ähnlichkeit. Um zu testen, ob eine spezifische Interaktion von TFIIIA mit Karyopherin  $\alpha 1$  vorliegt, wurde in einem *in vitro* Bindungsversuch das Bindungsverhalten von TFIIIA und verschiedener TFIIIA Mutanten, deren Importverhalten in Oocyten bekannt war (s.o.), an GST-Fusionsmutanten von verschiedenen Karyopherin  $\beta$  verwandten Proteinen und Karyopherin  $\alpha 1$  getestet. In TFIIIA konnten zwei transportkompetente Elemente identifiziert werden. Da nicht davon ausgegangen werden kann, dass beide Elemente denselben Transportfaktor (-adapter) binden, wurden Deletionsmutanten von TFIIIA in der Analyse eingesetzt. Die verwendeten GST-Fusionsproteine Karyopherin  $\alpha 1$ , Karyopherin  $\beta$ , RanBP7 und Transportin sind in Claußen *et al.* (1999) beschrieben. Karyopherin  $\beta 3$  wurde von Maïke Claußen entsprechend der anderen Transportfaktoren kloniert. Für die Analyse wurden mit  $^{35}\text{S}$  radioaktiv markierte TFIIIA Mutanten verwendet. Die 1/3- $\beta$ -Gal-Mutanten 123, 789 und 678 (s.o.) wurden mit Nco I vor und hinter dem eingefügten  $\beta$ -Galaktosidase Anteil geschnitten und der verbleibende Vektor mit Zinkfingerinsert religiert. Die verwendeten pCS2+ TFIIIA, pCS2+ TFIIIA- $\Delta 56$  und pCS2+Nucleoplasmin Konstrukte wurden mir von Falko Rudt überlassen. Die klonierten Konstrukte wurden mit dem T<sub>N</sub>T-Reticulocytenslysat in einem gekoppelten Transkriptions-Translations-Ansatz exprimiert und in einem *in vitro* Interaktionsversuch eingesetzt. Die Expression der GST fusionierten Transportfaktoren wurde in *E.coli* XL1-blue durchgeführt. Die Zellen wurden durch Sonifizierung aufgeschlossen und die Fusionsproteine durch Bindung an GT-Sepharose immobilisiert. Nach zweimaligem Waschen des Pellets wurden die Ansätze in die für den Versuch benötigte Anzahl an Aliquots

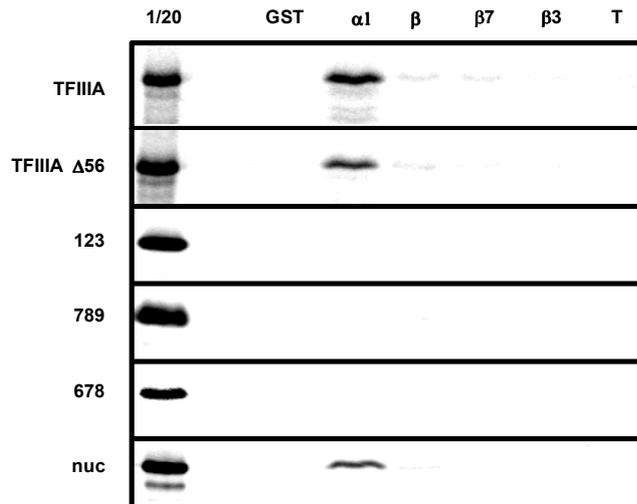
aufgeteilt. Im Bindungspuffer waren 2 mg/ml BSA zum blockieren unspezifischer Bindungsstellen enthalten.



**Abbildung 22: Zur Interaktion verwendete GST-Fusionsproteine.**

Für die Analyse der Interaktion von TFI<sub>IIA</sub>, TFI<sub>IIA</sub>- $\Delta$ 56, den Zinkfingern 123, 678, 789 und Nukleoplasmin wurden die GST-Fusionsproteine Karyopherin  $\alpha$ 1, Karyopherin  $\beta$ , Karyopherin  $\beta$ 7, Karyopherin  $\beta$ 3 und Transportin verwendet. Ein Aliquot der für die Interaktionsstudie verwendeten Glutathionagarose-GST-Protein Partikel wurde mittels SDS PAGE analysiert.

Den beladenen Pellets wurde in 600  $\mu$ l Bindungspuffer 5  $\mu$ l des T<sub>N</sub>T-Reticulocytenlysates, in welchem die radioaktiven Substrate erstellt wurden, hinzugefügt. Nach 2 h Inkubation bei 4°C wurden ungebundene Komponenten durch sechs maliges Waschen mit Bindungspuffer entfernt und der Ansatz in SDS Puffer auf einem 10 % Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.



**Abbildung 23: TFIIIA interagiert mit Karyopherin  $\alpha$ .**

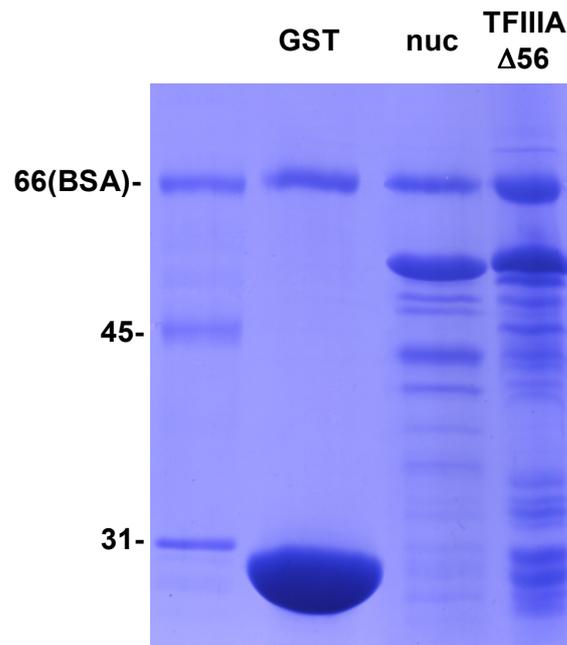
Analyse der Interaktion von TFIIIA, TFIIIA- $\Delta$ 56, den Zinkfingern 123, 678, 789 und Nukleoplasmin mit den GST-Fusionsproteinen Karyopherin  $\alpha$ 1, Karyopherin  $\beta$ , Karyopherin  $\beta$ 7, Karyopherin  $\beta$ 3 und Transportin. In der linken Spur ist 1/20-stel des eingesetzten mit  $^{35}$ S-markierten Proteins aufgetragen.

Das als Spezifitätskontrolle in der Bindungsanalyse eingesetzte Nukleoplasmin bindet erwartungsgemäß ausschließlich an Karyopherin  $\alpha$ 1 und nicht an die Karyopherin  $\beta$  verwandten Fusionsmutanten. Bei keiner der gezeigten Mutanten ist eine Interaktion mit dem GST-Fusionsanteil aufgetreten. TFIIIA und die TFIIIA- $\Delta$ 56 Mutante wurden mit der GST-Karyopherin  $\alpha$ 1 Fusionsmutante aufgereinigt. Die Zinkfinger 123 und 678, welche in Oocyteninjektionen keine Transportaktivität aufweisen, wurden ebenso wenig von den Transportfaktoren gebunden wie das in Oocyten und HeLa Zellen transportkompetente Zinkfingerelement 789. Da die Zinkfinger 234 von dem GST-Fusionsanteil gebunden wurden (nicht gezeigt), ist die Darstellung der N-terminalen minimalen transportaktiven Zinkfingerregion in diesem Experiment nicht möglich. Für TFIIIA und die TFIIIA- $\Delta$ 56 Mutante konnte jedoch eine spezifische Interaktion mit der Karyopherin  $\alpha$ 1 Variante nachgewiesen werden. Da das C-terminale Zinkfingermodul an keinem der eingesetzten Transportsubstrate bindet, es aber sowohl in Oocyten als auch in HeLa Zellen kernlokalisiert wird, könnte es wie das NLS 2 und 3 von L5 auf einem anderen Weg als das N-terminale NLS von TFIIIA in den Zellkern gelangen. Desweiteren interagiert das C-terminale NLS mit den Zinkfingern 789 hier nicht mit Karyopherin  $\alpha$ 1, wohl aber die TFIIIA Konstrukte, in denen das eingegrenzte C-terminale NLS enthalten ist.

#### 3.5.4 Interaktionsstudien von verschiedenen Karyopherin $\alpha$ Varianten

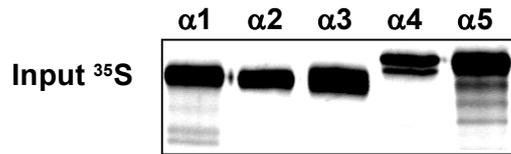
Im letzten Abschnitt wurde gezeigt, dass radioaktiv markiertes TFIIIA und TFIIIA- $\Delta$ 56 spezifisch mit immobilisiertem Karyopherin  $\alpha$ 1 interagiert. Diese Interaktion sollte sich in

den folgenden Experimenten auch umgekehrt mit immobilisiertem TFIIIA- $\Delta$ 56 und in Lösung befindlichem Karyopherin  $\alpha$  zeigen lassen. Um eine mögliche Maskierung des NLS durch 5S RNA aus dem Reticulocytenslysat zu verhindern, wurde TFIIIA- $\Delta$ 56 verwendet, welches nicht an 5S RNA bindet. Die oben gezeigten fast identischen Expressionsprofile von TFIIIA und den Karyopherin Varianten  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2 weichen stark von denen der anderen Karyopherin  $\alpha$  Varianten,  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4 und  $\alpha$ 5, ab. Dies weist auf eine mögliche spezifische Beziehung zwischen TFIIIA als Transportsubstrat und Karyopherin  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2 als Transportadapter hin. Um das Bindungsverhalten von TFIIIA an die verschiedenen Karyopherin  $\alpha$  Varianten zu testen, wurde frisch präpariertes immobilisiertes TFIIIA- $\Delta$ 56 in einem Bindungsversuch mit ebenfalls frisch mit dem T<sub>N</sub>T System erzeugten <sup>35</sup>S markierten Karyopherin  $\alpha$  Varianten inkubiert. Zur Kontrolle der Bindungsspezifität wurde GST alleine und als Positivkontrolle intaktes Nukleoplasmin eingesetzt.



**Abbildung 24: Bakterielle Expression der GST-Fusionsproteine mit Nukleoplasmin und TFIIIA- $\Delta$ 56.**

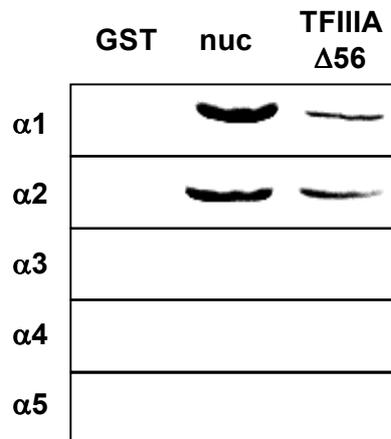
Der verwendete Fusionsanteil GST wurde in BL21 Zellen, Nukleoplasmin (nuc) und TFIIIA- $\Delta$ 56 wurden in BL21-DE3 Zellen exprimiert. Die Induktion erfolgte bei 30°C für 3 h mit 1 mM IPTG. Der Zellaufschluss erfolgte mit einem Branson Sonifier mit folgenden Einstellungen: Leistung 3, Puls 60, 3 mal 30 Sekunden. Die Zelltrümmer wurden bei 10 000 Upm pelletiert und der Überstand für das Beladen der GST-Agarose eingesetzt. Das 10 %ige mit Comassie angefärbte Gel zeigt die nach Abschluss des Experiments noch gebundenen, nicht radioaktiven Proteine. Aufgetragen wurden in Spur 1 der Größenstandard, in Spur 2 der GST-Fusionsanteil, in Spur 3 GST-Nukleoplasmin und in Spur 5 GST-TFIIIA- $\Delta$ 56. Links angegeben sind die Größen des Standards in kd. Bei 66 kd ist in allen Spuren das zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen eingesetzte BSA zu sehen. Der als Kontrolle eingesetzte Fusionsanteil liegt im Gegensatz zu GST-Nukleoplasmin und GST-TFIIIA- $\Delta$ 56, welche in äquivalenten Mengen gebunden wurden, in deutlichem Überschuss vor.



**Abbildung 25: Analyse der Karyopherin  $\alpha$  Varianten.**

Die Karyopherin  $\alpha$  Varianten  $\alpha1$ ,  $\alpha3$ ,  $\alpha4$  und  $\alpha5$  lagen (s.o.) im pCS2+ Vektor vor und wurden mit SP6 RNA-Polymerase,  $\alpha2$  mit T3 RNA-Polymerase mit Retikulozytenlysat in einer gekoppelten Transkriptions-Translationsreaktion exprimiert. Äquivalente Mengen der radioaktiv markierten Karyopherin  $\alpha$  Varianten wurden auf einem 10 %igen Polyacrylamidgel zur Kontrolle der im Versuch (s.u.) eingesetzten Mengen aufgetrennt. Eingesetzte Mengen an Transkriptions-Translationsansatz: Karyopherin  $\alpha1$ : 1  $\mu$ l,  $\alpha2$ : 1,5  $\mu$ l,  $\alpha3$ : 5  $\mu$ l,  $\alpha4$ : 5  $\mu$ l,  $\alpha5$ : 1,5  $\mu$ l.

Die Karyopherin  $\alpha3$ ,  $\alpha4$  und  $\alpha5$  Varianten binden an keines der angebotenen Substrate. Karyopherin  $\alpha1$  und  $\alpha2$  binden nicht an den GST-Fusionsanteil, aber an das angebotene Nukleoplasmin und an TFIIIA- $\Delta56$ . TFIIIA kann somit mit Karyopherin  $\alpha1$  und  $\alpha2$  unter den hier gezeigten Bedingungen interagieren und ist folglich ein Transportsubstrat von Karyopherin  $\alpha1$  und  $\alpha2$ .



**Abbildung 26: Bindungsanalyse von GST-TFIIIA- $\Delta56$  an verschiedene Karyopherin  $\alpha$  Varianten.**

In der Bindungsanalyse wurden zu GT-Agarose, die mit GST, GST-Nukleoplasmin oder GST-TFIIIA- $\Delta56$  beladen wurde, äquivalente Mengen der radioaktiv markierten Karyopherin  $\alpha$  Varianten (siehe Abbildung 25) in Bindungspuffer hinzugefügt. Nach 2 Stunden Inkubation auf einem Drehrad wurden die Pellets sechs mal mit Bindungspuffer gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden in SDS Puffer gelöst und auf einem 10 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

In der Interaktionsstudie mit frisch angesetzten Transkriptions-Translationsansätzen und frisch angefertigten GST-Fusionsproteinen ist keine Bindung von den eingesetzten Transportadaptern Karyopherin  $\alpha3$ ,  $\alpha4$  und  $\alpha5$  an die angebotenen Transportsubstrate oder den zur Kontrolle eingesetzten Fusionsanteil GST aufgetreten. Karyopherin  $\alpha1$  und  $\alpha2$  zeigen keine Interaktion mit dem Fusionsanteil und binden somit spezifisch an Nukleoplasmin und TFIIIA- $\Delta56$ . Dieser Nachweis der spezifischen Interaktion von TFIIIA- $\Delta56$  mit den

Karyopherin  $\alpha$  Varianten  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  korreliert, wie in der RT-PCR Analyse und der „whole mount“ *in situ* Analyse gezeigt, mit der gemeinsamen starken Expression während der frühen Phase der Oogenese. In den Versuchen, in denen Karyopherin  $\alpha 1$  immobilisiert wurde und verschiedene TFIIIA Mutanten zur Bindungsanalyse verwendet wurden, wurde die Bindung von TFIIIA an Karyopherin  $\alpha 1$  bestätigt. Eine Bindung von dem C-terminalen NLS 789 an Karyopherin  $\alpha$  oder einen der angebotenen anderen Transportfaktoren trat jedoch nicht auf. Eine Analyse des Bindungsverhaltens des ersten NLS in den Zinkfingern 34 war aufgrund auftretender unspezifischer Bindungen an den GST-Fusionsanteil der eingesetzten Mutanten nicht möglich. Die Zinkfinger 34 sind jedoch das in den Oocyteninjektionen einzige, weitere transportkompetente Element von TFIIIA. Da TFIIIA in diesen Experimenten spezifisch an Karyopherin  $\alpha 1$  bindet, bleibt als Interaktionsmotiv nur die Zinkfingerregion mit dem dritten und vierten Finger. Da das zweite NLS, die Zinkfinger 789, mit keinem der immobilisierten Transportfaktoren interagiert, wird es vermutlich auf einem anderen Importweg in den Zellkern transportiert. Möglicherweise interagiert dieses NLS mit einem der in der Durchmusterung einer embryonalen Augenbank identifizierten, neuen putativen Transportfaktoren.

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Minimalstruktur der zwei NLS von TFIIIA

In der vorliegenden Arbeit wurde die Minimalstruktur der transportaktiven Elemente von TFIIIA auf die Zinkfinger 34 und 789 eingegrenzt. Die Zinkfinger 123 bzw. 678 zeigen keine signifikante Kernlokalisierung. Dies zeigt, dass neben den allgemeinen Strukturelementen der Zinkfinger spezifische Signalsequenzen für die Vermittlung des Imports benötigt werden. Eine besondere Funktion ist den Zinkfingern 4 und 9 zuzuschreiben (Wischniewski, 1997). Sie besitzen neben der für die Ausbildung der Zinkfingerstruktur notwendigen Aminosäuren eine im Vergleich zu anderen Zinkfingern von TFIIIA hohe Anzahl an basischen Aminosäuren (Abbildung 27).

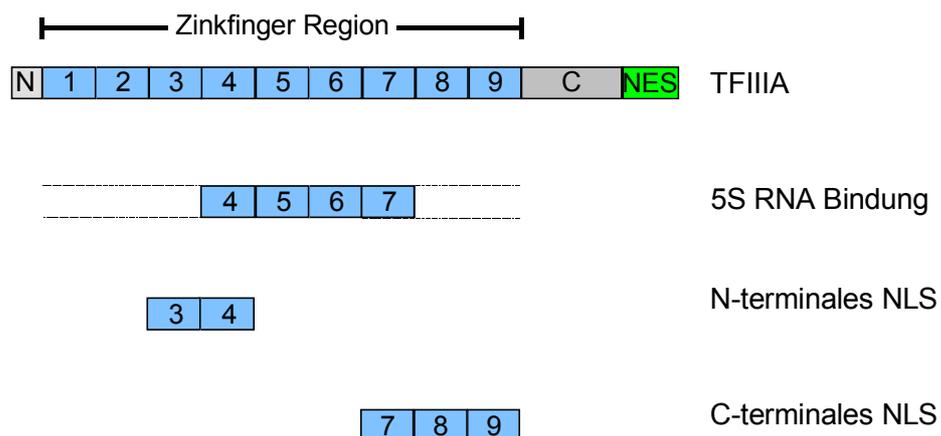
<b>Konsensussequenz der Zinkfinger</b>	TGEK*PYVC..DGCDKRFTKK..LK*RH...H	
N-Terminus TFIIIA'	MAAKVASTSSEEAEGLVTEGEMGEKALPVVYKR	
N-Terminus TFIIIA	MGEKALPVVYKR	12
Zinkfinger 1	YICSFADCGAAYNKNWKLQ*AHLC*KH	37
Zinkfinger 2	TGEK*PEPCKEEGCEKGFTSLHHLT*RHSL*TH	67
Zinkfinger 3	TGEK*NETCDSDGCDLRFITKANMK*KHFNRFH	98
Zinkfinger 4	NIKICVYVCHFENCGKAFKKHNQLK*VHQF*SH	129
Zinkfinger 5	TQQL*PYECPHEGCDKRFSLPSRLK*RHEK*VH	159
Zinkfinger 6	AG--*-YPCKKDDSCSFVGKTWTLYLKHVAECH	188
Zinkfinger 7	QD--*LAVC--DVCNRKFRHKDYLR*DHQK*TH	214
Zinkfinger 8	EKERTVYLCPRDGCDRSYTTAFNLR*SHIQSFH	246
Zinkfinger 9	EEQR*PFVCEHAGCGKCFAMKKSLE*RH*SV*VH	276
C-Terminus	DPEKRRKLEKCPRPKRSLASRLTGYIPPKSKEK	309
	NASVSGTEKTDSLVKNKPSGTETNGSLVLDKLT	342
	IQ	344

**Abbildung 27: Die Aminosäuresequenz von TFIIIA.**

Die Aminosäuren sind so angeordnet, dass das sich neunmal wiederholende Motiv von Zinkfingern zu erkennen ist. Die Cysteine und Histidine, welche das Zinkfingermotiv (den HC-Link) bilden, sind fett dargestellt. Durch Sterne sind Positionen außerhalb des HC-Links gekennzeichnet, an denen in anderen Fingern zusätzliche Aminosäuren vorkommen. Das Fehlen von Aminosäuren wurde durch ein Minus (-) dargestellt. Mit durchgehender Linie eingefasste Aminosäuren geben Anhäufungen basischer Sequenzen innerhalb der Zinkfinger an, die mit unterbrochener Linie umrandete Sequenz gibt ein basisches Motiv im C-Terminus an. Über den Zinkfingersequenzen sind die N-terminalen Sequenzen von TFIIIA und dem somatischen TFIIIA' angeordnet.

Die meisten der bisher beschriebenen Kerntransportsequenzen haben Motive basischer Natur. Unterschiedliches Bindungsverhalten von verschiedenen NLS an Transportfaktoren ist für L5 ebenso belegt wie die Nutzung grundlegend verschiedener Transportmechanismen. Nur das NLS1 bindet an RanBP7, Karyopherin  $\beta$  und Karyopherin  $\alpha 1$  (Claußen *et al.*, 1999). Das NLS3 von L5 kann im Gegensatz zu NLS1 und NLS2 Ran unabhängig und unabhängig von cytosolischen Faktoren importiert werden (Rudt und Pieler, 2001). Die basischen Sequenzen im neunten Zinkfinger reichen nicht aus, um mit dem in Oocyten und HeLa Zellen transportkompetenten Zinkfingermodul 789 Bindung an Karyopherin  $\alpha 1$  zu vermitteln. Für das zweite NLS von TFIIIA kann also angenommen werden, dass es einen anderen Transportweg als das C-terminale NLS von TFIIIA nutzt. Beide NLS sind in Oocyten und in transient transfizierten HeLa Zellen kernlokalisierungskompetent. Es kann also angenommen werden, dass für beide Fragmente in somatischen Zellen und in Oocyten Transportfaktoren existieren, die eine Kernlokalisierung ermöglichen.

Die Identifizierung der NLS von TFIIIA in den Zinkfingermodulen 34 und 789 steht in Übereinstimmung mit unserer Ausgangshypothese, dass Bindung von 5S RNA die NLS von TFIIIA maskiert. Eine Maskierung der NLS würde die cytoplasmatische Retention des 7S RNP Komplexes erklären. Beide NLS liegen flankierend der RNA bindenden Zinkfinger 4567. Die Zinkfinger 89 sind nicht signifikant an der Bindungsaktivität von TFIIIA an 5S RNA beteiligt (Setzer *et al.*, 1996; Theunissen *et al.*, 1998).



**Abbildung 28: Die TFIIIA Kerntransportsignale überlappen mit der 5S RNA bindenden Domäne.**

Schematische Darstellung der verschiedenen TFIIIA Domänen mit funktioneller Zuordnung. Die 5S RNA Bindung wird durch die Zinkfinger 4 bis 7 vermittelt. Das NLS1 wurde auf die Zinkfinger 34 und das NLS2 auf die Zinkfinger 789 eingegrenzt.

5S RNA Bindung an diese Finger hätte zur Folge, dass der vierte Zinkfinger für eine Interaktion mit Karyopherin  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  nicht mehr zugänglich wäre und somit der Import über

diesen Karyopherin  $\alpha$  vermittelten Weg nicht mehr möglich wäre. Eine Maskierung des Importsignals könnte die cytoplasmatische Retention von dem 7S RNP in Oocyten erklären. Dass ein solcher Mechanismus möglich ist, zeigt auch das gemeinsame Expressionsprofil von TFIIIA und den beiden Karyopherin  $\alpha$  Varianten. Der Transportadapter und sein putatives Substrat werden im Verlauf der Oogenese zur selben Zeit stark exprimiert.

### 4.2 TFIIIA bindet spezifisch an Karyopherin $\alpha 1$ und $\alpha 2$

In den Bindungsstudien wurde mit Transportadapter oder Transportfaktoren beladene GT- Agarose verwendet, um *in vitro* die Bindung von TFIIIA zu untersuchen. Die erste Analyse zeigte keine Bindung von TFIIIA an Karyopherin  $\beta$ , RanBP7, Transportin oder Karyopherin  $\beta 3$ . Neben dem vollständigen Protein wurde die Bindung von verschiedenen TFIIIA-Deletionsmutanten untersucht. Nicht transportkompetente Zinkfinger konnten genausowenig wie auch das in Oocyteninjektionsexperimenten kernlokalisierte 789 Zinkfingerelement an die angebotenen Faktoren binden. Das N-terminale NLS ließ sich in diesem Experiment aufgrund unspezifischer Bindungsaktivität nicht analysieren. Es wurde von allen eingesetzten Transportfaktoren und dem GST-Fusionsanteil gebunden.

TFIIIA und die Deletionsmutante TFIIIA- $\Delta 56$  zeigen jedoch eine spezifische Affinität zu Karyopherin  $\alpha 1$ . Dieses Ergebnis korreliert mit Interaktionsstudien, in denen TFIIIA von einem Heteroproteinkomplex bestehend aus Karyopherin  $\alpha$ , Karyopherin  $\beta$  und p62 präzipitiert werden kann (Percipalle *et al.*, 1997). Da die Zinkfinger 789 von Karyopherin  $\alpha 1$  nicht gebunden werden, ist es wahrscheinlich, dass die Interaktion durch das einzige weitere kernlokalisierungskompetente Zinkfingerelement in seiner Minimalstruktur bestehend aus den Fingern 34 vermittelt wird. Im Kontrollexperiment wurde gezeigt, dass die spezifische Affinität zu  $\alpha 1$  erhalten bleibt, wenn TFIIIA- $\Delta 56$  in immobilisierter Form dem gelösten Transportadapter als Substrat angeboten wird. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Bindung von TFIIIA auf die Karyopherin  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  Varianten beschränkt ist. Die Varianten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ , und  $\alpha 5$  zeigen keine Affinität zu TFIIIA. Dieses Ergebnis korreliert mit der in letzter Zeit häufig diskutierten selektiven Bindungsaktivität einiger Substrate an verschiedene  $\alpha$  Karyopherine.

Die selektive Bindung an Karyopherin  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  konnte nur mit frisch präparierten Komponenten gezeigt werden. Wurden ältere Präparationen von GST-Fusionsproteinen verwendet (nicht gezeigt), zeigte zwar keine der Karyopherin  $\alpha$  Varianten Affinität zu dem GST-Fusionsanteil, aber die Varianten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  wurden dann auch von Nukleoplasmin

und TFIIIA signifikant gebunden. Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass in einer *in vitro* Situation dieselben Konformationen eingenommen werden wie *in vivo*. Alle Komponenten mussten frisch präpariert werden, um die selektive Substratbindung der Karyopherin  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  Varianten darzustellen. Die komplexe *in vivo* Situation ist in den Interaktionsstudien ebenso wenig berücksichtigt wie eine mögliche Konformationsänderung der Karyopherin  $\alpha$  Varianten durch Bindung an Karyopherin  $\beta$ .

Karyopherin  $\alpha$  abhängiger Import ist in Digitonin permeabilisierten HeLa Zellen mit der *Xenopus* Karyopherin  $\alpha 2$  Variante und verschiedenen anderen humanen  $\alpha$  Varianten bereits untersucht worden. Auch in dieser Analyse zeigen bei Verwendung von bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Karyopherin Varianten keine selektive Fähigkeit, den Import von klassischen NLS zu vermitteln, wenn nur ein Importsubstrat angeboten wird. Die Importeffizienz, welche durch die verschiedenen Varianten vermittelt wurde, war jedoch unterschiedlich ausgeprägt. Wurden verschiedene Importsubstrate angeboten, so war die Importeffizienz, die durch *Xenopus* Karyopherin  $\alpha 2$  von Nukleoplasmin vermittelt wurde, dann am größten, wenn hnRNP K dem Importmix hinzugefügt wurde. Humanes Karyopherin  $\alpha 1$  importiert unter diesen kompetitiven Bedingungen zwar hnRNP K effizient, nicht aber Nukleoplasmin (Köhler *et al.*, 1999).

In dieser Analyse ist bei Verwendung von eingefrorenen Karyopherin  $\alpha$  Varianten Nukleoplasmin in einer kompetitiven Situation ebenfalls nicht importiert worden. Dieser Befund stützt das in dieser Arbeit ermittelte selektive Bindungsverhalten von frisch präparierten Nukleoplasmin und TFIIIA- $\Delta 56$  an die Karyopherin  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  Varianten. Eine selektive Bindung würde auch in Übereinstimmung mit den gemeinsamen Expressionsprofilen von TFIIIA und Karyopherin  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  stehen. Die Problematik des abweichenden Verhaltens unter den verschiedenen *in vitro* Bedingungen verdeutlicht die Notwendigkeit, *in vivo* Analysen zur weiteren Aufklärung der selektiven Substratspezifität von den verschiedenen Karyopherin  $\alpha$  Varianten durchzuführen. In Experimenten, welche die gezielte Ausschaltung einzelner Karyopherin  $\alpha$  Varianten in Oocyten oder dem lebenden Organismus ermöglichen, sollte sich die Redundanz im Bindungsverhalten der Karyopherin Varianten auflösen lassen. Ein gezieltes Ausschalten einzelner Proteine ist z.B. durch Antikörper, RNAi Experimente, Morpholino-Oligonukleotide oder Mutagenese möglich.

Die gezeigte Importkompetenz der 234 Deletionsmutante in HeLa Zellen könnte durch redundante Bindungsfähigkeit an andere Karyopherin Varianten oder weitere bisher noch nicht identifizierte Transportfaktoren erklärt werden. TFIIIA besitzt neben dem transportkompetenten 34 Zinkfingermodul ein weiteres transportaktives Modul, das nicht an

Karyopherin  $\alpha 1$  binden kann. Die Zinkfinger 789, die in Oocyten und in transienten Transfektionen von HeLa Zellen in den Zellkern importiert werden, könnten ein Transportsignal darstellen, welches dann vom Wildtypprotein genutzt wird, wenn die Karyopherin  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  Varianten nicht mehr zur Verfügung stehen. In *in vitro* Importstudien mit HeLa Zellen und Reticulocytenslysat wird das N-terminale NLS, die Zinkfinger 234 nicht aber das C-terminale NLS, die Zinkfinger 789, kernlokalisiert (F. Rudt, persönliche Mitteilung). Der auftretende Widerspruch zu den Ergebnissen der transienten Transfektionen von HeLa Zellen, in denen auch das 789 Zinkfinger-element kernlokalisiert wird, kann durch die unterschiedliche Dauer der für die Transportprozesse zur Verfügung stehenden Zeit erklärt werden. Die transfizierten HeLa Zellen wurden zwei Tage in Kultur gehalten. In den *in vitro* Importstudien ist der Transportprozeß nach 30 min abgebrochen worden. Die Ergebnisse, die unter den restriktiveren Bedingungen der *in vitro* Importstudien vorliegen, korrelieren mit den Interaktionsstudien dieser Arbeit. In HeLa Zellen ist dem 789 Zinkfinger-element aufgrund der *in vitro* Importstudien keine biologische Relevanz zuzuordnen. In Oocyten kann eine biologische Funktion aufgrund der Summe der importierten Deletionsmutanten nicht ausgeschlossen werden.

Da das C-terminale NLS 789 nicht mit Karyopherin  $\alpha 1$  interagiert, ist es möglich, dass die Interaktion von TFIIIA mit Karyopherin  $\alpha$  (siehe 3.5.3) auf das einzige weitere transportaktive Element von TFIIA, die transportaktiven Zinkfinger 34, zurückzuführen ist. Das mit basischen Aminosäuren angereicherte Zinkfingermodul des N-terminalen NLS, nicht aber das mit basischen Aminosäuren angereicherte Zinkfingermodul des C-terminalen NLS überlappt mit den Zinkfingern, die wesentlich an der 5S RNA Bindung von TFIIIA beteiligt sind.

Für das C-terminale NLS wurde in verschiedene Deletionsmutanten eine Kernlokalisierungskompetenz in Oocyten gezeigt. In transfizierten HeLa Zellen ist das 789 Zinkfinger-element kernlokalisiert. In der Sequenz des neunten Zinkfingers sind mehrere basische Aminosäuren enthalten. Eine der aktuellen Theorien zum nukleocytoplasmatischen Transport geht von der Notwendigkeit aus, dass hydrophile Proteinoberflächen durch die Bindung an Transportfaktoren verdeckt sein müssen, um Kerntransport zu ermöglichen (Ribbeck und Görlich, 2001). Eine Beteiligung weiterer Faktoren oder eine andersartige Maskierung der 789 Zinkfinger während des Transports in Oocyten wäre also eine Voraussetzung für die Kernlokalisierung von TFIIIA. Dieser hydrophobe Zustand sollte auch im Karyopherin  $\alpha/\beta$  Komplex vorliegen. Eine Interaktionsstudie mit GST-Fusionsmutanten der Zinkfinger 34, 789

und gelösten Transportfaktoren könnte Aufschluss darüber geben, welche der beiden Zinkfinger-elemente den Kontakt zu Karyopherin  $\alpha$  herstellen.

### 4.3 Definition der Karyopherin $\beta 3$ Synexpressionsgruppe

Expressionsmusteranalysen in *Xenopus* Embryonen mit zufällig ausgewählten cDNAs zeigten die Existenz von Gengruppen in koordinierter Expression, die in gemeinsamen Prozessen funktionieren. Diese Gengruppen wurden Synexpressionsgruppen genannt. Die biologischen Prozesse, in die solche Synexpressionsgruppen involviert sind, reichen von generellen zellulären Aktivitäten, wie ER-Import, bis hin zu spezifisch regulatorischen Prozessen, wie den BMP-4 oder Delta-1 Signalwegen (Niehrs und Pollet, 1999).

In unserem Labor wurde die Teilsequenz eines putativen Transportfaktors isoliert. Die Vervollständigung der Sequenz und eine ausführliche „whole mount“ *in situ* Analyse von Karyopherin  $\beta 3$  zeigte ein differentielles Expressionsmuster. Der Vergleich zu Expressionsmustern von den ribosomalen Proteinen S8, S3A, L3, L6, L7A und L5, den transportassoziierten Proteinen RanTC4 und RanBP1 und den Expressionsmustern anderer Proteine, von denen angenommen wird, dass sie in den Transport ribosomaler Proteine involviert sind, zeigt gemeinsame Expressionscharakteristika dieser Gene. Die wesentlichen Merkmale sind eine starke Expression im Auge, den Kiemenbögen und der Schwanzspitze des *Xenopus* Embryos. Die Expression der genannten Gene ist ab dem Neurulastadium mit einem starken Signal im Augenfeld und in den sensorischen Schichten des Neuroektoderms detektierbar.

Diese Beobachtung eines gemeinsamen Expressionsprofils von Genen erfüllt die erste Bedingung für die Definition einer Synexpressionsgruppe. Proteine, die in Transportprozesse ribosomaler Proteine involviert sein könnten, und ribosomale Proteine selbst zeigen eine koordinierte Expression. Der funktionelle Zusammenhang wird durch den ribosomalen Transport hergestellt und erfüllt die zweite Bedingung für die Definition einer neuen Synexpressionsgruppe.

Aufgrund des charakteristischen Expressionsmusters dieser Gruppe sollte es über optische Selektion möglich sein, neue Gene zu identifizieren, die eine Funktion im ribosomalen Transport haben. Für eine solche Analyse wurde eine cDNA-Bank aus embryonalem Augengewebe hergestellt und in einer „whole mount“ *in situ* Analyse nach Karyopherin  $\beta 3$  artigen Expressionsmustern durchsucht.

Für andere dem nukleocytoplasmatischen Transport assoziierte Gene, die nicht direkt in den Proteintransport ribosomaler Proteine involviert sind, wie SUMO-1 und p10 (NTF2) konnte

ein Karyopherin  $\beta 3$  entsprechendes Expressionsmuster nicht nachgewiesen werden. SUMO-1 und NTF2 sind in die Aufrechterhaltung des RanGDP/GTP Gradienten der Kernpore involviert. Dass sie kein ausgeprägtes Expressionsmuster zeigten, kann auf eine generell niedrigere Expression hinweisen, da weniger von diesen Komponenten benötigt wird. Möglicherweise liegt in den Embryonen eine besondere Situation vor, die zwar eine erhöhte Expression der Transportfaktoren benötigt, nicht aber die der anderen Komponenten der Transportmaschinerie. Hier würde eine Quantifizierung von Expressionsstärken in Embryonen und adulten Geweben zur Aufklärung dieses Ergebnisses beitragen.

### 4.4 Die Karyopherin $\alpha$ Varianten

Ausgehend von der Beobachtung, dass ribosomale Proteine, ihre putativen Transportfaktoren und dem Transportgeschehen assoziierte Proteine eine Synexpressionsgruppe bilden, wurden im Rahmen der Durchmusterung einer für diesen Zweck erstellten cDNA Bank aus embryonalem Augengewebe drei neue Karyopherin  $\alpha$  Varianten isoliert. Eine vergleichende „whole mount“ *in situ* Analyse zeigte differentielle Expression für jede der Karyopherin  $\alpha$  Varianten. Während der frühen Oogenese werden alle 5 Varianten wie auch TFIIIA exprimiert.

In der Embryonalentwicklung unterscheidet sich die Expression der Karyopherin Varianten deutlich. Karyopherin  $\alpha 3$  wird im Gegensatz zu  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  in den Cilienzellen der Haut und deutlich stärker in den abdominalen Bereichen des Embryos exprimiert. Karyopherin  $\alpha 3$  und  $\alpha 4$  zeigen bereits im Neurulastadium eine ausgeprägte Expression. Mit  $\alpha 3$  und  $\alpha 4$  vergleichbare Expressionsstärken werden von der  $\alpha 5$  Variante erst nach dem Neurulastadium erreicht. Interessant ist hier, dass die starke Transkriptionsaktivierung von  $\alpha 3$  und  $\alpha 4$  im Neurulastadium vor der Transkriptionsaktivierung der Karyopherin  $\alpha 5$  Variante stattfindet. Diese geordnete starke Transkriptionsaktivierung könnte auf weitere spezifisch an bestimmte Karyopherin  $\alpha$  Varianten bindende Proteine hinweisen, die von  $\alpha 5$  gebunden werden, nicht aber von Karyopherin  $\alpha 3$  und  $\alpha 4$ .

Mit Karyopherin  $\alpha 3$  wird die zweite Klasse der Karyopherin  $\alpha$  Familie erweitert. In Maus und Mensch konnte in dieser Klasse erst je eine Karyopherinvariante nachgewiesen werden. *Xenopus* hingegen besitzt mindestens zwei, Karyopherin  $\alpha 1$  ( $\alpha 2$ ) und das mit dieser Arbeit isolierte Karyopherin  $\alpha 3$ . Die Karyopherin Varianten  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  könnten in *Xenopus* eine besondere Bedeutung während der Oogenese haben. Ihre mRNA ist bis zum Beginn der Midblastulatransition, also bis zum Beginn der zygotischen Transkription, in RT-PCR

Analysen nachweisbar, nimmt aber schon ab Stadium III Oocyten deutlich ab. Mit dieser Limitierung auf die maternale Transkription in Oocyten unterscheidet sich die Expression dieser beiden Varianten deutlich von der biphasischen Expression der Karyopherin Varianten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$ .

Die mit den PCR Analysen ermittelten Daten zeigen in der frühen Oogenese eine starke Expression von TFIIIA und den Karyopherin  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  Varianten. Die Signalstärke nimmt bei allen drei der getesteten mRNAs ab dem Stadium III ab. Diese Genexpression ist im Gegensatz zu anderen Varianten ab der Midblastulatransition nicht mehr detektierbar.

Das Expressionsprofil von  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  korreliert mit der starken maternalen Expression von TFIIIA sowohl in der RT-PCR Analyse als auch in der „whole mount“ *in situ* Analyse. Später, ab der Neurula auftretendes somatisches TFIIIA' wird in deutlich geringeren Mengen exprimiert (Shastry *et al.*, 1984 und 3.5.1). Das gemeinsame Expressionsprofil von  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  und TFIIIA macht Karyopherin  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  zu präferentiellen Kandidaten als Transportadapter von TFIIIA zu funktionieren.

In *Drosophila* und *Caenorhabditis* zeigte die Inaktivierung einzelner Karyopherin  $\alpha$  Varianten einen morphologischen Effekt auf die Ovarien. Sterile homozygote Weibchen mit einer Transposon Insertion im Karyopherin  $\alpha$  homologen Importin  $\alpha 3$  Gen haben Defekte in den Ovarien und bilden weniger Ovariolen aus. Die Oogenese wird ab dem Stadium 7-10 unterbrochen und zwar zu einem Zeitpunkt, zu dem große Mengen an Importin  $\alpha 3$  normalerweise in den Wildtyp Nährzellen vorhanden sind (Mathe *et al.*, 2000). In *C. elegans* werden die Karyopherin  $\alpha$  Homologen Ima-1, Ima-2 und Ima-3 in der Keimbahn exprimiert, aber nur Ima-3 wird auch im Soma exprimiert. RNA Interferenz (RNAi) Experimente zeigen, dass Ima-3 für das Fortschreiten der meiotischen Prophase I während der Oocytenentwicklung benötigt wird (Geles und Adam, 2001). Die Funktion der inaktivierten Karyopherin Varianten in *Drosophila* und *Caenorhabditis* konnte nicht durch andere Karyopherin  $\alpha$  Varianten übernommen werden. Hier zeigt sich, dass im lebenden Organismus Karyopherin  $\alpha$  Varianten für spezifische Transportfunktionen benötigt werden.

Obwohl der Hitzeschock Transkriptionsfaktor in frühen Embryonen schon vorhanden ist, kann eine Hitzeschock-Antwort nicht induziert werden. Der Hitzeschock Transkriptionsfaktor dHSF von *Drosophila* wird spezifisch von Importin  $\alpha 3$  gebunden und kann erst mit der Expressionsaktivierung von Importin  $\alpha 3$  in älteren Embryonen in den Zellkern gelangen. Die Hitzeschock-Antwort kann erst mit der Synthese von Importin  $\alpha 3$  aktiviert werden (Fang *et al.*, 2001). Neben einer hohen Redundanz im Bindungsverhalten, die für  $\alpha$  Karyopherine *in vitro* beschrieben wurde (Köhler *et al.*, 1997; Seki *et al.*, 1997; Welch *et al.*, 1999), gibt es *in*

*in vivo* auch Substrate, welche eine hohe Spezifität bei der Interaktion mit den Karyopherin  $\alpha$  Varianten besitzen und wie der Hitzeschock Transkriptionsfaktor in ihrer nukleocytoplasmatischen Verteilung durch Karyopherine reguliert werden. Andernfalls dürfte die Inaktivierung einzelner Karyopherin Varianten in *Drosophila* und *Caenorhabditis* keinen morphologischen Effekt nach sich ziehen. Kandidaten für eine vergleichbare regulatorische Funktion im nukleocytoplasmatischen Transport von *Xenopus* sind die Karyopherin  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  Varianten. Sie könnten selektiv Proteine während der Oogenese in den Zellkern transportieren. Da die Karyopherin Varianten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  in allen Embryonalstadien nachweisbar waren, wäre eine regulatorische Funktion komplizierter und vermutlich konzentrationsabhängig. Ein mögliches Szenario wäre hier ein Transkriptionsfaktor, der wie TFIIA NLS und NES (Kernexportsignalsequenz) Funktionen gleicher Effizienz trägt. Er könnte erst im Zellkern angereichert werden, wenn der Importfaktor in ausreichend hoher Konzentration vorliegt.

Das Expressionsmuster von Karyopherin  $\alpha 3$  unterscheidet sich im Kaulquappenstadium deutlich von dem der anderen Karyopherin Varianten. Karyopherin  $\alpha 3$  zeigt ein starkes Signal in einzelnen Zellen der Haut und eine erhöhte Expression in allen Geweben, in denen auch  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  exprimiert werden. Ein weiterer Kandidat für eine transportvermittelte regulatorische Funktion ist  $\alpha 5$ . Karyopherin  $\alpha 5$  zeigt sowohl in der RT-PCR als auch in der „whole mount“ *in situ* Analyse eine  $\alpha 3$  und  $\alpha 4$  gegenüber verzögerte schwächere Expression.

### **4.5 Durchmusterung einer cDNA Bank aus embryonalem Augengewebe**

In der statistischen Auswertung der Klone, denen eine Funktion zugeordnet werden konnte, besteht ein generelles Problem der funktionellen Klassifizierung. Die Zuordnung zu einzelnen Gruppen wurde in Tabelle 10 basierend auf den Angaben zur ähnlichsten Sequenz aus den im BLAST benutzten Datenbanken vorgenommen. Die dort Angegebenen Kurzbeschreibungen mögen für eine statistische Übersicht hinreichend sein, können aber im Einzelfall nicht unbedingt ausreichen. Eine Beschränkung auf den Namen des Proteins allein reicht in der Bewertung nicht aus. Dies wird zum Beispiel durch das „non-histone chromosome protein 2 like 1“ verdeutlicht, welches eine Komponente des U4,U6,U5 tri-snRNP ist und an den 5' „stem-loop“ von U4 snRNA bindet, also mit den Chromosomen nichts zu tun hat. Ein weiteres Problem stellt die Einordnung von Proteinen dar, die in mehrere Gruppen eingeordnet werden können. Histone wurden in die Gruppe DNA bindender Proteine eingeordnet, sie sind aber auch Mitglieder der Chromatingruppe. Eine Mehrfachnennung

würde zu einem verfälschten Eindruck der Gesamtübersichten führen. Von der Seite der Chromatinproteine aus betrachtet wäre eine Einordnung in die Gruppe der DNA bindenden Proteine nicht gerechtfertigt, da viele dieser Proteine nicht direkt mit DNA interagieren, sondern die Chromatinstruktur über peripher angesiedelte Mechanismen beeinflussen. Diese Gruppe nicht zu nennen würde jedoch der Häufigkeit mit der Mitglieder der Chromatingruppe auftreten nicht gerecht werden.

Basierend auf der Beobachtung, dass ribosomale Proteine und ihre putativen Transportfaktoren eine Synexpressionsgruppe bilden, sollten in der Durchmusterung einer für diesen Zweck angefertigten cDNA-Bank aus embryonalem Augengewebe Klone isoliert werden, die in das Transportgeschehen ribosomaler Proteine involviert sind. Die nach optischer Selektion identifizierten Kandidaten wurden ansequenziert, und nach einer Datenbankanalyse (sofern möglich) wurde ihnen eine Identität zugeordnet. Als differentiell exprimiert wurden 28 % von 989 analysierten Klonen gewertet. Eine ähnliche Häufigkeit mit 26 % wurde von Gawantka *et al.* (Gawantka *et al.*, 1998) in einer Analyse von einer Neurula cDNA Bank erzielt. Interessant ist auch der Vergleich von redundanten mehrfach auftretenden Sequenzen. Gawantka *et al.* hat fast doppelt so viele Klone analysiert und eine Redundanz von 40 % erhalten. In der hier vorgestellten Analyse repräsentieren 10 % der differentiell exprimierten Klone gleiche Gene (Tabelle 12). Dieser Unterschied könnte durch die Verwendung einer primären Phagenbank in dieser Arbeit erklärt werden. Gawantka verwendete eine amplifizierte cDNA Bank, was zu einer Anreicherung häufig exprimierter Gene führt. Während bei Gawantkas *et al.* Analyse selbst bei großzügiger Bewertung der Expressionsmuster aufgrund der unterschiedlichen Qualität der „whole mount“ *in situ* maximal 12 % der differentiell exprimierten Klone (ohne Redundante) in die Karyopherin Gruppe fallen, wurden in der hier vorgestellten Analyse 40 % der analysierten Klone mit einem Karyopherin  $\beta 3$  Muster identifiziert. Faktisch verdeutlicht wird die Anreicherung der Karyopherin  $\beta 3$  artig exprimierten Klone durch einen Vergleich der isolierten Klone ribosomaler Proteine. In Gawantkas Analyse wurden 5 Klone (S2, S20, L29, L14 und L37) ribosomaler Gene isoliert, was einem Anteil der differentiell exprimierten Klone (ohne Redundante) von 1,8 % entspricht. Demgegenüber stehen 8,8 % isolierte Klone ribosomaler Proteine in dieser Arbeit. Allein durch die Auswahl einer Gewebe-spezifischen cDNA-Bank konnte die Ausbeute an Klonen ribosomaler Proteine um das Fünffache gesteigert werden. Die optische Selektion, welche ein notwendiger Schritt zur Identifizierung der differentiell exprimierten Klone ist, erhöht die Wahrscheinlichkeit einen ribosomalen Klon zu finden mit

16 % um den Faktor 2 in der vorliegenden Arbeit, eine Anreicherung, die auch für in den nukleocytoplasmatischen Transport involvierte Proteine zu erwarten ist, da sie einen Teil der Synexpressionsgruppe darstellen.

Bei Betrachtung der Verteilung von Klonen ribosomaler Proteine innerhalb der Karyopherin  $\beta 3$  Synexpressionsgruppe würde man ähnliche Ergebnisse erwarten. In der Tat stehen hier 14 % aus Gawantkas Analyse 16 % Klonen ribosomaler Proteine aus der Karyopherin  $\beta 3$  Synexpressionsgruppe dieser Arbeit gegenüber. Der Anteil an Klonen ribosomaler Proteine innerhalb der Karyopherin  $\beta 3$  Synexpressionsgruppe ist somit gleich und zeigt im Bezug auf verschiedene Analysen Konsistenz.

Eine bezogen auf den experimentellen Ansatz vergleichbare Analyse ist die Durchmusterung einer embryonalen Schwanzspitzen cDNA Bank (Sölter, 1999). Hier wurde ein Gewebe analysiert, bei welchem eine Anreicherung von Klonen ribosomaler Gene zu erwarten ist, da das Expressionsmuster ribosomaler Gene ein verstärktes Signal in der Schwanzspitze zeigt. Die Signalintensität in der Schwanzspitze ist gegenüber der Signalintensität im embryonalem Augengewebe geringer. Aus der Analyse einer Schwanzspitzen cDNA Bank ging der partielle Klon von Karyopherin  $\beta 3$  hervor, was einem Anteil bezogen auf die Gesamtzahl der differentiell exprimierten Gene von 0,5 % entspricht. Die schwächere Signalintensität in der Schwanzspitze gegenüber dem Auge sollte auch eine unterschiedliche Verteilung der exprimierten Gengruppen widerspiegeln. Aufgrund der Gewebsspezifität würde man für Klone ribosomaler Gene bei Analyse einer Schwanzspitzen cDNA Bank eine höhere Ausbeute erwarten als in Gawantkas Analyse und einen geringeren Anteil als in der Analyse der vorliegenden Arbeit. Der Anteil von Klonen ribosomaler Gene bezogen auf die Gesamtanzahl der Klone mit einem Expressionsmuster liegt mit 2,8 % erwartungsgemäß zwischen den Ausbeuten von Gawantka (1,8 %) und der vorliegenden Arbeit (8,8 %).

Für Klone ribosomaler Proteine wurde mit dem hier vorliegenden Ansatz eine Anreicherung erzielt. Wahrscheinlich gilt dies auch für in den nukleocytoplasmatischen Transport involvierte Proteine. Diese Frage ist jedoch noch nicht abschließend zu beantworten. Der Anteil der in das Transportgeschehen involvierten Proteine innerhalb der Synexpressionsgruppe liegt nach gesicherter Zuordnung einer Funktion bei 2 %. Aus der Analyse gingen zwei Klone hervor, die in den nukleocytoplasmatischen Transport involviert sind. Sam68, welches an Tap und die RNA Helicase A bindet, und Karyopherin  $\alpha 3$ . Der Anteil von 2 % könnte jedoch wesentlich größer sein als hier zunächst erfasst. Von den 30 Klonen, denen keine Funktion zugeordnet werden konnte, besitzen 5 mit ihrer abgeleiteten Sequenz eine Homologie zur RCC1 Signatur und zeigen auch mit dem Dialign Programm

Homologie zu einzelnen Bereichen Karyopherin  $\beta$  verwandter Proteine. Sie könnten somit Mitglieder der Karyopherin  $\beta$  Superfamilie sein, was den Anteil an der Synexpressionsgruppe auf 6 % erhöhen würde. Von den Klonen wurde nur eine Teilsequenz für die Datenbankanalysen eingesetzt. Möglich ist demzufolge auch, dass der Bereich, welcher eine Zuordnung zur Superfamilie erlauben würde, in dieser Sequenz nicht enthalten war. Eine weitere Möglichkeit ist eine Beteiligung der Klone an der Ausbildung des Kernporenkomplexes. Die Bedeutung des Kernporenkomplexes für den nukleocytoplasmatischen Transport wird mit dem von cytosolischen Faktoren unabhängigen Import von dem L5 NLS3 erweitert. Da dieses NLS eine zugängliche Kernpore benötigt, ist ein Bestandteil des Kernporenkomplexes selbst in der Lage, Transport zu vermitteln. Die Sequenzen solcher Proteine konnten mit der PROSCAN bzw. Dialign Analyse noch nicht erfasst werden. Möglicherweise ist die Anzahl der in den nukleocytoplasmatischen Transport involvierten Proteine wesentlich größer als hier erfasst. Dies kann jedoch erst nach Vervollständigung der Kandidatenklone und weiteren Funktionsanalysen abschließend geklärt werden.

### 4.6 Ausblick

Eine Zusammenfassung in Synexpressionsgruppen, wie auch eine computergestützte Sequenzmusteranalyse können eine experimentelle Verifizierung der Funktion von Genen nicht ersetzen, aber sie erlauben eine Fokussierung der Analysen. Die 5 Kandidatenklone mit Sequenzmustern der Karyopherin  $\beta$  Superfamilie sollten zunächst vervollständigt werden. Eine erneute Sequenzmusteranalyse könnte dann schon Hinweise auf eine mögliche Einordnung in eine der Klassen der Karyopherin  $\beta$  Superfamilie geben. Zur Überprüfung der Funktion wären jedoch Interaktionsstudien mit Ran und eventuell auch mit Proteinen des Kernporenkomplexes notwendig. Sollten sich durch diese folgende Analyse weitere in den Kerntransport involvierte Proteine identifizieren lassen, lohnt sich auch eine weitere Betrachtung der Kandidaten, denen bisher noch keine Funktion zugeordnet werden konnte.

Die auftretende Redundanz im Bindungsverhalten von Karyopherin  $\alpha$  Varianten erfordert die Entwicklung eines *in vivo* Systems, in dem sich der Effekt der  $\alpha$  Varianten auf verschiedene Transportsubstrate untersuchen lässt. Aufgrund des mit dieser Arbeit gezeigten unterschiedlichen Verhaltens von frisch präparierten  $\alpha$  Varianten und bei  $-70$  °C gelagerten Präparationen ist eine Neubewertung bisher erzielter *in vitro* Ergebnisse zur Substratspezifität von Karyopherin  $\alpha$  Varianten unumgänglich. In *Drosophila* und *Caenorhabditis* wurde die

Beteiligung der Transportadapter an entwicklungsregulatorischen Prozessen nachgewiesen. *Xenopus* bietet sich als klassischer Modellorganismus an, solche Prozesse zu untersuchen. Mit der Isolierung der Karyopherin Varianten wurden die Voraussetzungen für solche Experimente geschaffen.

Das Zinkfingerprotein TFIIIA besitzt 2 NLS, für eines der beiden konnte hier ein putativer Transportadapter identifiziert werden. Für das zweite NLS muss ein Transportfaktor noch identifiziert werden. Um die Zuordnung des C-terminalen NLS (34) zu dem Transportadapter Karyopherin  $\alpha$  zu verifizieren, sollten Interaktionsstudien mit GST-Fusionen der Zinkfinger 34, 789 und den verschiedenen Karyopherin  $\alpha$  Varianten durchgeführt werden. Wie für L5 beschrieben ist auch für NLS1 und NLS2 von TFIIIA nicht auszuschließen, dass grundlegend verschiedene Transportmechanismen für die Kernlokalisierung benutzt werden.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die minimalen transportkompetenten Strukturen des Transkriptionsfaktors IIIA auf die Zinkfinger 34 und 789 eingegrenzt. Die transportvermittelnden Zinkfingerregionen flankieren die RNA bindenden Zinkfinger 4567. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit unserer Arbeitshypothese. Die Bindung von 5S RNA an TFIIIA maskiert das NLS und führt so zur cytoplasmatischen Retention des 7S RNP Komplexes.

Mit den in *Xenopus* neuen Karyopherin  $\alpha$  Varianten konnte gezeigt werden, dass TFIIIA- $\Delta$ 56 bei Verwendung von frisch erstellten Karyopherin  $\alpha$  Fusionsproteinen *in vitro* spezifisch an  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2 binden kann. Beide Varianten zeigen in RT-PCR und „whole mount“ Analysen ein Expressionsprofil, das dem von TFIIIA entspricht. Diese Bindung ist wahrscheinlich auf das Zinkfingererelement 34 zurückzuführen, da die Finger 789 im Gegensatz zu dem kompletten TFIIIA Protein keine Karyopherin  $\alpha$ 1 Interaktion zeigen und die Finger 34 das einzige weitere Element repräsentieren, welches Kerntransportkompetenz besitzt.

Aufgrund der identischen Expressionsmusterprofile von ribosomalen Proteinen, transportfaktorassoziierten Proteinen und Transportfaktoren wurde die Existenz einer neuen Synexpressionsgruppe nachgewiesen. Aus diesem Befund ging der experimentelle Ansatz hervor, neue in den Transport ribosomaler Proteine involvierte Gene durch optische Selektion auf das in der Synexpressionsgruppe auftretende Expressionsmuster zu isolieren. Für die Durchmusterung der angefertigten cDNA Bank aus embryonalem Augengewebe wurde ein maschinelles *in situ* Hybridisierungsverfahren angewendet. Dass der Ansatz der optischen Selektion zu einer Anreicherung der gewünschten Gene führt, zeigt der hohe Anteil der in der Durchmusterung isolierten Klone ribosomaler Gene. Aus der Analyse gingen zwei Klone hervor, die nachweislich in den Kerntransport involviert sind. Es wurden fünf weitere Kandidatenklone identifiziert, die eine RCC1 Signatur besitzen und in den nukleocytoplasmatischen Transport involviert sein könnten.

## 6 Literaturverzeichnis

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.

Nucleic Acids Res 25, 3389-402.

Bannister, A.J., Miska, E.A., Görlich, D. and Kouzarides, T. (2000) Acetylation of importin-alpha nuclear import factors by CBP/p300.

Curr Biol 10, 467-70.

Ben-Efraim, I. and Gerace, L. (2001) Gradient of increasing affinity of importin beta for nucleoporins along the pathway of nuclear import.

J Cell Biol 152, 411-7.

Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.

Nucleic Acids Res 7, 1513-23.

Bordonne, R. (2000) Functional characterization of nuclear localization signals in yeast Sm proteins.

Mol Cell Biol 20, 7943-54.

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.

Cokol, M., Nair, R. and Rost, B. (2000) Finding nuclear localization signals.

EMBO Rep 1, 411-5.

Denning, D., Mykytka, B., Allen, N.P., Huang, L., Al, B. and Rexach, M. (2001) The nucleoporin Nup60p functions as a Gsp1p-GTP-sensitive tether for Nup2p at the nuclear pore complex.

J Cell Biol 154, 937-50.

Dürr, U. (1997) Isolierung und Charakterisierung von zum *Drosophila melanogaster* Zinkfinger Protein Schnurri homologen Proteinen aus dem Krallenfrosch *Xenopus laevis*. Diplomarbeit Universität Göttingen .

Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. and Botstein, D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns.

Proc Natl Acad Sci U S A 95, 14863-8.

Fang, X., Chen, T., Tran, K. and Parker, C.S. (2001) Developmental regulation of the heat shock response by nuclear transport factor karyopherin-alpha3.

Development 128, 3349-58.

- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W.C., Mattaj, I.W. and Luhrmann, R. (1995) The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs.  
Cell 82, 475-83.
- Gawantka, V., Pollet, N., Delius, H., Vingron, M., Pfister, R., Nitsch, R., Blumenstock, C. and Niehrs, C. (1998) Gene expression screening in *Xenopus* identifies molecular pathways, predicts gene function and provides a global view of embryonic patterning.  
Mech Dev 77, 95-141.
- Geles, K.G. and Adam, S.A. (2001) Germline and developmental roles of the nuclear transport factor importin alpha3 in *C. elegans*.  
Development 128, 1817-30.
- Ginsberg, A.M., King, B.O. and Roeder, R.G. (1984) *Xenopus* 5S gene transcription factor, TFIIIA: characterization of a cDNA clone and measurement of RNA levels throughout development.  
Cell 39, 479-89.
- Görlich, D., Dabrowski, M., Bischoff, F.R., Kutay, U., Bork, P., Hartmann, E., Prehn, S. and Izaurralde, E. (1997) A novel class of RanGTP binding proteins.  
J Cell Biol 138, 65-80.
- Görlich, D. and Kutay, U. (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm.  
Annu Rev Cell Dev Biol 15, 607-60.
- Hood, J.K., Casolari, J.M. and Silver, P.A. (2000) Nup2p is located on the nuclear side of the nuclear pore complex and coordinates Srp1p/importin-alpha export.  
J Cell Sci 113, 1471-80.
- Huber, J., Cronshagen, U., Kadokura, M., Marshallsay, C., Wada, T., Sekine, M. and Luhrmann, R. (1998) Snurportin1, a m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure.  
EMBO J 17, 4114-26.
- Ishidate, T., Yoshihara, S., Kawasaki, Y., Roy, B.C., Toyoshima, K. and Akiyama, T. (1997) Identification of a novel nuclear localization signal in Sam68.  
FEBS Lett 409, 237-41.
- Jäkel, S., Albig, W., Kutay, U., Bischoff, F.R., Schwamborn, K., Doenecke, D. and Görlich, D. (1999) The importin beta/importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1.  
EMBO J 18, 2411-23.
- Jäkel, S. and Görlich, D. (1998) Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells.  
EMBO J 17, 4491-502.

- Jullien, D., Görlich, D., Laemmli, U.K. and Adachi, Y. (1999) Nuclear import of RPA in *Xenopus* egg extracts requires a novel protein XRIPalpha but not importin alpha. *EMBO J* 18, 4348-58.
- Kalderon, D., Richardson, W.D., Markham, A.F. and Smith, A.E. (1984) Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* 311, 33-8.
- Kamei, Y., Yuba, S., Nakayama, T. and Yoneda, Y. (1999) Three distinct classes of the alpha-subunit of the nuclear pore-targeting complex (importin-alpha) are differentially expressed in adult mouse tissues. *J Histochem Cytochem* 47, 363-72.
- Kataoka, N., Bachorik, J.L. and Dreyfuss, G. (1999) Transportin-SR, a nuclear import receptor for SR proteins. *J Cell Biol* 145, 1145-52.
- Kim, I.S., Kim, D.H., Han, S.M., Chin, M.U., Nam, H.J., Cho, H.P., Choi, S.Y., Song, B.J., Kim, E.R., Bae, Y.S. and Moon, Y.H. (2000) Truncated form of importin alpha identified in breast cancer cell inhibits nuclear import of p53. *J Biol Chem* 275, 23139-45.
- Köhler, M., Ansieau, S., Prehn, S., Leutz, A., Haller, H. and Hartmann, E. (1997) Cloning of two novel human importin-alpha subunits and analysis of the expression pattern of the importin-alpha protein family. *FEBS Lett* 417, 104-8.
- Köhler, M., Speck, C., Christiansen, M., Bischoff, F.R., Prehn, S., Haller, H., Görlich, D. and Hartmann, E. (1999) Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import. *Mol Cell Biol* 19, 7782-91.
- Kutay, U., Bischoff, F.R., Kostka, S., Kraft, R. and Görlich, D. (1997) Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* 90, 1061-71.
- Kutay, U., Hartmann, E., Treichel, N., Calado, A., Carmo-Fonseca, M., Prehn, S., Kraft, R., Görlich, D. and Bischoff, F.R. (2000) Identification of two novel RanGTP-binding proteins belonging to the importin beta superfamily. *J Biol Chem* 275, 40163-8.
- Kutay, U., Lipowsky, G., Izaurralde, E., Bischoff, F.R., Schwarzmaier, P., Hartmann, E. and Görlich, D. (1998) Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor. *Mol Cell* 1, 359-69.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Lipowsky, G., Bischoff, F.R., Schwarzmaier, P., Kraft, R., Kostka, S., Hartmann, E., Kutay, U. and Görlich, D. (2000) Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes.  
EMBO J 19, 4362-71.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. and Melchior, F. (1997) A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2.  
Cell 88, 97-107.
- Mathe, E., Bates, H., Huikeshoven, H., Deak, P., Glover, D.M. and Cotterill, S. (2000) Importin-alpha3 is required at multiple stages of *Drosophila* development and has a role in the completion of oogenesis.  
Dev Biol 223, 307-22.
- Mattaj, I.W. and De Robertis, E.M. (1985) Nuclear segregation of U2 snRNA requires binding of specific snRNP proteins.  
Cell 40, 111-8.
- Mattaj, I.W. and Englmeier, L. (1998) Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase.  
Annu Rev Biochem 67, 265-306.
- Matunis, M.J., Wu, J. and Blobel, G. (1998) SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex.  
J Cell Biol 140, 499-509.
- Michael, W.M., Eder, P.S. and Dreyfuss, G. (1997) The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein.  
EMBO J 16, 3587-98.
- Mingot, J.M., Kostka, S., Kraft, R., Hartmann, E. and Görlich, D. (2001) Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export.  
EMBO J 20, 3685-94.
- Miyamoto, Y., Imamoto, N., Sekimoto, T., Tachibana, T., Seki, T., Tada, S., Enomoto, T. and Yoneda, Y. (1997) Differential modes of nuclear localization signal (NLS) recognition by three distinct classes of NLS receptors.  
J Biol Chem 272, 26375-81.
- Moore, M.S. (1998) Ran and nuclear transport.  
J Biol Chem 273, 22857-60.
- Morgenstern, B. (1999) DIALIGN 2: improvement of the segment-to-segment approach to multiple sequence alignment.  
Bioinformatics 15, 211-8.
- Moroianu, J., Hijikata, M., Blobel, G. and Radu, A. (1995) Mammalian karyopherin alpha 1 beta and alpha 2 beta heterodimers: alpha 1 or alpha 2 subunit binds nuclear localization signal and beta subunit interacts with peptide repeat-containing nucleoporins.  
Proc Natl Acad Sci U S A 92, 6532-6.

- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction.  
Methods Enzymol 155, 335-50.
- Nachury, M.V., Ryder, U.W., Lamond, A.I. and Weis, K. (1998) Cloning and characterization of hSRP1 gamma, a tissue-specific nuclear transport factor.  
Proc Natl Acad Sci U S A 95, 582-7.
- Nakielny, S., Fischer, U., Michael, W.M. and Dreyfuss, G. (1997) RNA transport.  
Annu Rev Neurosci 20, 269-301.
- Niehrs, C. and Pollet, N. (1999) Synexpression groups in eukaryotes.  
Nature 402, 483-7.
- Niehrs, C., Steinbeisser, H. and De Robertis, E.M. (1994) Mesodermal patterning by a gradient of the vertebrate homeobox gene goosecoid.  
Science 263, 817-20.
- Nieuwkoop, P.D. and Faber, P. (1967) Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). 2nd edition.  
North-Holland Publ. Co. Amsterdam .
- Ohno, M., Fornerod, M. and Mattaj, I.W. (1998) Nucleocytoplasmic transport: the last 200 nanometers.  
Cell 92, 327-36.
- Ohno, M., Segref, A., Bachi, A., Wilm, M. and Mattaj, I.W. (2000) PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation.  
Cell 101, 187-98.
- Panitz, P. (1998) Isolierung und Charakterisierung der Zinkfinger-Proteine Xegr-1 und Xegr-3 in der frühen Embryonalentwicklung des Krallenfrosches *Xenopus laevis*.  
Dissertation Universität Göttingen .
- Percipalle, P., Clarkson, W.D., Kent, H.M., Rhodes, D. and Stewart, M. (1997) Molecular interactions between the importin alpha/beta heterodimer and proteins involved in vertebrate nuclear protein import.  
J Mol Biol 266, 722-32.
- Pieler, T. and Rudt, F. (1997) Nucleocytoplasmic transport of 5S ribosomal RNA.  
Cell and Developmental Biology 8, 79-82.
- Plafker, S.M. and Macara, I.G. (2000) Importin-11, a nuclear import receptor for the ubiquitin-conjugating enzyme, UbcM2.  
EMBO J 19, 5502-13.
- Pollard, V.W., Michael, W.M., Nakielny, S., Siomi, M.C., Wang, F. and Dreyfuss, G. (1996) A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway.  
Cell 86, 985-94.

- Prieve, M.G., Guttridge, K.L., Munguia, J. and Waterman, M.L. (1998) Differential importin- $\alpha$  recognition and nuclear transport by nuclear localization signals within the high-mobility-group DNA binding domains of lymphoid enhancer factor 1 and T-cell factor 1.  
Mol Cell Biol 18, 4819-32.
- Reddy, T.R., Tang, H., Xu, W. and Wong-Staal, F. (2000) Sam68, RNA helicase A and Tap cooperate in the post-transcriptional regulation of human immunodeficiency virus and type D retroviral mRNA.  
Oncogene 19, 3570-5.
- Ribbeck, K. and Görlich, D. (2001) Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes.  
EMBO J 20, 1320-30.
- Ribbeck, K., Lipowsky, G., Kent, H.M., Stewart, M. and Görlich, D. (1998) NTF2 mediates nuclear import of Ran.  
EMBO J 17, 6587-98.
- Robbins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A. and Dingwall, C. (1991) Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence.  
Cell 64, 615-23.
- Rout, M.P., Aitchison, J.D., Suprapto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. and Chait, B.T. (2000) The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism.  
J Cell Biol 148, 635-51.
- Rout, M.P., Blobel, G. and Aitchison, J.D. (1997) A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins.  
Cell 89, 715-25.
- Rudt, F., Firmbach-Kraft, I., Petersen, M., Pieler, T. and Stick, R. (1996) Nucleoskeleton and nucleo-cytoplasmic transport in oocytes and early development of *Xenopus laevis*.  
Int J Dev Biol 40, 273-8.
- Rudt, F. and Pieler, T. (1996) Cytoplasmic retention and nuclear import of 5S ribosomal RNA containing RNPs.  
EMBO J 15, 1383-91.
- Rudt, F. and Pieler, T. (2001) Cytosolic import factor- and Ran-independent nuclear transport of ribosomal protein L5.  
Eur J Cell Biol 80, 661-8.
- Sachdev, S., Bagchi, S., Zhang, D.D., Mings, A.C. and Hannink, M. (2000) Nuclear import of IkappaB $\alpha$  is accomplished by a ran-independent transport pathway.  
Mol Cell Biol 20, 1571-82.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-4.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. C.S.H. Laboratory Press, New York.

Schwamborn, K. (1998) *Der Transport des Histons H1<sup>o</sup> vom Cytoplasma in den Zellkern*. Dissertation Universität Göttingen .

Schwamborn, K., Albig, W. and Doenecke, D. (1998) The histone H1(0) contains multiple sequence elements for nuclear targeting. *Exp Cell Res* 244, 206-17.

Seedorf, M., Damelin, M., Kahana, J., Taura, T. and Silver, P.A. (1999) Interactions between a nuclear transporter and a subset of nuclear pore complex proteins depend on Ran GTPase. *Mol Cell Biol* 19, 1547-57.

Seki, T., Tada, S., Katada, T. and Enomoto, T. (1997) Cloning of a cDNA encoding a novel importin-alpha homologue, Qip1: discrimination of Qip1 and Rch1 from hSrp1 by their ability to interact with DNA helicase Q1/RecQL. *Biochem Biophys Res Commun* 234, 48-53.

Setzer, D.R., Menezes, S.R., Del Rio, S., Hung, V.S. and Subramanian, G. (1996) Functional interactions between the zinc fingers of *Xenopus* transcription factor IIIA during 5S rRNA binding. *Rna* 2, 1254-69.

Shastry, B.S., Honda, B.M. and Roeder, R.G. (1984) Altered levels of a 5 S gene-specific transcription factor (TFIIIA) during oogenesis and embryonic development of *Xenopus laevis*. *J Biol Chem* 259, 11373-82.

Solsbacher, J., Maurer, P., Vogel, F. and Schlenstedt, G. (2000) Nup2p, a yeast nucleoporin, functions in bidirectional transport of importin alpha. *Mol Cell Biol* 20, 8468-79.

Sölter, M. (1999) *Identifizierung von Genen mit morphoregulatorischer Funktion in der frühen Embryogenese von Xenopus laevis aus einer Schwanzspitzen-cDNA-Bank*. Diplomarbeit Universität Göttingen .

Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D. and Futcher, B. (1998) Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell* 9, 3273-97.

- Ström, A.C. and Weis, K. (2001) Importin-beta-like nuclear transport receptors. *Genome Biol* 2.
- Tabb, M.M., Tongaonkar, P., Vu, L. and Nomura, M. (2000) Evidence for separable functions of Srp1p, the yeast homolog of importin alpha (Karyopherin alpha): role for Srp1p and Sts1p in protein degradation. *Mol Cell Biol* 20, 6062-73.
- Theunissen, O., Rudt, F. and Pieler, T. (1998) Structural determinants in 5S RNA and TFIIA for 7S RNP formation. *Eur J Biochem* 258, 758-67.
- Tsuji, L., Takumi, T., Imamoto, N. and Yoneda, Y. (1997) Identification of novel homologues of mouse importin alpha, the alpha subunit of the nuclear pore-targeting complex, and their tissue- specific expression. *FEBS Lett* 416, 30-4.
- Turner, D.L. and Weintraub, H. (1994) Expression of achaete-scute homolog 3 in *Xenopus* embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes Dev* 8, 1434-47.
- Welch, K., Franke, J., Köhler, M. and Macara, I.G. (1999) RanBP3 contains an unusual nuclear localization signal that is imported preferentially by importin-alpha3. *Mol Cell Biol* 19, 8400-11.
- Wischnewski, J. (1997) Identifizierung von Kernlokalisierungssignalsequenzen in *Xenopus laevis* TFIIA. Diplomarbeit Universität Göttingen .
- Wischnewski, J., Sölter, M., Chen, Y., Hollemann, T. and Pieler, T. (2000) Structure and expression of *Xenopus* karyopherin-beta3: definition of a novel synexpression group related to ribosome biogenesis. *Mech Dev* 95, 245-8.
- Yaseen, N.R. and Blobel, G. (1997) Cloning and characterization of human karyopherin beta3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4451-6.

## 7 Anhang

16	Mehrfach auftretende Proteine
10	Cytochrom C Oxidase
4	Tubulin $\alpha$
4	Elongationsfaktor 1 $\alpha$
3	Kristallin $\beta$ B1
3	Nrp1B
3	Ornithindecaboxylase
2	Tubulin $\beta$ 5
2	14-3-3 Protein epsilon
2	ds RNA bindendes Protein 4.F1
2	Ferritin schwere Kette 2
2	Glutamin Synthetase
2	Histondeacetylase 1,2
2	HMG1
2	Nucleolin
2	Pterin-4- $\alpha$ -carbinolamin-dehydratase
2	Epithelialer Natrium Kanal
47	Gesamt

**Tabelle 12: Mehrfach auftretende Proteine.**

Nach Häufigkeit geordnete Auflistung von mehrfach auftretenden Sequenzen, die identische Gene repräsentieren.

## X. I. Karyopherin $\beta$ 3

	CAGCA	5
ATGGCGGCCGAGCAGCAACAGTTCTACTTCTTGGGTAACCTGCCTCAGCCCTGAGAACGGCGCCAGAAAACAAGCAGAGGAACTTAC		95
M A A E Q Q Q F Y L L L G N L L S P E N G A R K Q A E E T Y		
GAGACCATCCCTGGGCCATCTAAATCACATTTCTTTTGAAGCTATAAGGAATGGAGCTGTTGCAGAAGAGGCAGGCAGATGGCAGCT		185
E T I P G P S K I T F L L Q A I R N G A V A E E A R Q M A A		
GTTTTACTGCGACGTCTCTTGTCTCTGCATTTGAAGAAGTTATCCATCCCTCCCTGTTGACCTCCAACTGCCATTAGAAGCGAACTT		275
V L L R R L L S S A F E E V Y P S L P V D L Q T A I R S E L		
CTGCTTGCTATTCAGTGAATCTCAGTCGAGTATGCGCAAGAAGATATGTGACATTGTTGCTGAAGTGGCCAGAAACCTAATGTATGAT		365
L L A I Q V E S Q S S M R K K I C D I V A E L A R N L I D D		
GACGGAAATAACCAAGTGGCCTGAAGCTTTAAATTTCTGTTGACTCTGTAAGTTCGCAAGATGATGGACTGCGTGAAGCAGCATTACAC		455
D G N N Q W P E A L K F L F D S V S S Q D D G L R E A A L H		
ATCTTCTGGAACCTCCCTGGAATTTTGGAAACCAACAGCAGCATTACCTTGAAGTTGTCAAAGAATGCTTGTGCAGTGCATGCAAGAG		545
I F W N F P G I F G N Q Q Q H Y L E V V K R M L V Q C M Q E		
CAGAATCACCTGTAATCAGAACTCTGCTGTAGAGCTGCTGGTGCATTTGCTTGTCTAATGAGCACAATATCCCTGTGAAGCAC		635
Q N H P V I R T L S A R A A G A F V L A N E H N I P L L K H		
TTCTCAGATTTGCTCCAGGTTTACTGCAGTCTGTAATGAATCCTGTTATCAGAATGACGACTCTGTCTAAAATCACTGGTTGAGATT		725
F S D L L P G L L Q S V N E S C Y Q N D D S V L K S L V E I		
GCAGACACTGTACAAAATTTTAAAGACCACATCTAGAAGCAACCTTACAAATGAGCCTGAAAGCTTTTTGCAGACAGATCCCTGAGCAAT		815
A D T V P K F L R P H L E A T L Q L S L K L F A D R S L S N		
ATGCAGAGACAACCTGGCATGGAAGTCATTTGTCACCCCTTCCGGAGACTGCAGCAGCTATGTTAAGAAAGCATAACAGTATTGTTGCTCAG		905
M Q R Q L A M E V I V T L S E T A A A M L R K H T S I V A Q		
GCGATACCTCAGATGCTGGCAATGATGGTGGATTTAGAAGATGATGACTGGTCAAATGCAGACGAGCTTGAAGATGATGATTTTGAC		995
A I P Q M L A M M V D L E D D D W S N A D E L E D D F D		
AGCAATGCAGTTGCGGGGAAAGTGCCTTGGACAGAATGGCTTGTGGACTAGGGGAAAAAATTGTTCTTCCAATGATCAAGGAGCACATT		1085
S N A V A G E S A L D R M A C G L G G K I V L P M I K E H I		
ATGCAAAATGCTTCAAAACCTGACTGGAAGTACAGGCATGCTGGTCTTATGGCATTGTCGGCATTGGGGAAGGTTGTCACCAAGCAGATG		1175
M Q M L Q N P D W K Y R H A G L M A L S A I G E G C H Q Q M		
GAGGGCATTCTTAATGAGATGGTCAATTTTGTCTGCTTCTTCAAGATCTCACCTAGAGTACGTTATGCAGCATGTAATGCTATT		1265
E G I L N E M V N F V L L F L Q D P H P R V R Y A A C N A I		
GGCCAGATGGCTACTGACTTTGCTCCTGCTTTCCAGAAGAAGTTTCCAGAAAAGGTGATAGCAAGTCTTCTGCAAACTATGGAAGACCAG		1355
G Q M A T D F A P A F Q K K F H E K V I A S L L Q T M E D Q		
GCAATCCAGAGTTCAGGCCATGCAGCCGCTGCTAATTAACCTCACCGAAGACTGTCCAAAGTCTTCTGATCCATATCTTGAT		1445
A N P R V Q A H A A A A L I N F T E D C P K S L L I P Y L D		
AACCTTGTAATCACTTGCACCTCAATTTGTTGGTGAAGCTGAGGAGCTGATCCAGAAAAGGAACAAAACCTTGTCTTGAACAAAGTTGTA		1535
N L V N H L H S I M V V K L Q E L I Q K G T K L V L E Q V V		
ACTTCAATGATCTGTTGCAGACACTGCTGAGGAAAAGTTTGTCCCATACTATGATTTGTTTATGCCTTCACTAAAACATATTGTTGAG		1625
T S I A S V A D T A E E K F V P Y D L F M P S L K H I V E		
AACGCTGTACAGAAGAACTTCGACTATTAAGAGGCAAAACTATTGAGTGCATCAGTTTATGATCGGTTTGGCTGTTGGTAAAGAGAAGTTT		1715

N A V Q K E L R L L R G K T I E C I S L I G L A V G K E K F  
 ATGCAAGATGCGTCTGATGTCATGCGAGTTGTTGCTGAAGACACAACTGATTTTCAGTGATTTTGAAGATGATGACCCACAGATTTTCTAT 1805  
 M Q D A S D V M Q L L L K T Q T D F S D L E D D D P Q I S Y  
 ATGATCTCTGCCGTCGCAAGAAATGTGCAAAATCCTCGGAAAAGGAATTTTCAGCAATATCTTCCCGTGGTCATGGGCCCTTTGATGAAGACT 1895  
 M I S A W A R M C K I L G K E F Q Q Y L P V V M G P L M K T  
 GCATCTATAAAACCTGAAGTGGCCCTACTTGATACGCAAGACATGGAAGGCATGGGAGAGGATGATGGCTGGGAGTTTGTAACTTTGGT 1985  
 A S I K P E V A L L D T Q D M E G M G E D D G W E F V N L G  
 GATCAGCAAAGTTTTGGAATCAAACTGCAGGTCTAGAAGAAAAAGCAACAGCATGTCAGATGTTGGTTTGTCTATGCTAAAGAACTAAAA 2075  
 D Q Q S F G I K T A G L E E K A T A C Q M L V C Y A K E L K  
 GAAGGATTTGCAGACTACTGAACAAGTTGTGAAGCTAATGGTCCCGTTGTAAAGTTCTATTTCCACGATGGTGTAGAGTGGCAGCT 2165  
 E G F A D Y T E Q V V K L M V P L L K F Y F H D G V R V A A  
 GCAGAACCCACTACTTTTGAATGCGCAAGAGTTCGTGGCCAGAGTACTTGACCCAAATGGCATTATGTTGTGATGCGCTT 2255  
 A E S M P L L L E C A R V R G P E Y L T Q M W H F M C D A L  
 ATCAAGGGAATCGGAACAGAACCAGACTCTGATGTTCTTTCAGAATTAATGCATTCCCTTGCTAAATGCATTGAGGTAATGGTGTATGGC 2345  
 I K G I G T E P D S D V L S E L M H S L A K C I E V M G D G  
 TGCATAAAACAATGAACATTTTGAAGAGCTTGGTGAATACTGAAGAGCAACTAGAAGAGCACTTTAAAAACCAGGAACCTCCGACAAGTG 2435  
 C I N N E H F E E L G G I L K S K L E E H F K N Q E L R Q V  
 AAAAGACAAGATGAAGATTATGATGAGCAAGTTGAGGAGTCATTACAAGATGAAGATGATAATGATGTTTACATTTTACTAAAGTATCG 2525  
 K R Q D E D Y D E Q V E E S L Q D E D D N D V Y I L T K V S  
 GACGTTTTGCACTCTATATTCAGCAGCTACAAGAGAAGATCTTGCCCTGGTTGAGCAGTTGTTACCATTGTTTGTAACTTAATTTGT 2615  
 D V L H S I F S S Y K E K I L P W F E Q L L P L F V N L I C  
 CCTAACAGGCCTTGGCCGACAGACAATGGGGACTTTGTATTTTGTATGATGTAATAGAACATTGACGCCCATCTTCTTTAAATATGCA 2705  
 P N R P W P D R Q W G L C I F D D V I E H C S P S S F K Y A  
 GAGTATTTCTAAGGCCACTGCTACAGTCAATTTGTGACAGCAGCCCTGAAGTTAGGCAAGCTGCTGCTTATGGTATTGGTGTAAATGGCA 2795  
 E Y F L R P L L Q S I C D S S P E V R Q A A A Y G I G V M A  
 CAATTTGGAGGTGACAATATCGCCCTTCTGCACAGAAGCTCTTCCACTGCTTGTGCGGGTATCCAGGCTGCAGAGTCAAAAACCAAA 2885  
 Q F G G D N Y R P F C T E A A L P L L V G V I Q A A E S K T K  
 GAGAATTAATCAACGGAACTGCATTTCTGCAGTWGGCAAAATCATGAAGTTCCGACCAGACTGTATTAATGTGGAAGAGGTTCTG 2975  
 E N I N A T E N C I S A V G K I M K F R P D C I N V E E V L  
 CCACACTGGTTGTCATGGCTGCCCTTGCATGAGGACAAGAAGAGGCTGTTACACTTATAACTTCCTTTGTGACCTCATTGAAAGCAAC 3065  
 P H W L S W L P L H E D K E E A V H T Y N F L C D L I E S N  
 AATCAATTTGCTTGGACCTAACAATTTCAATTTACCCAAGATATTCAGTATAATAGCAGATGGAGGTGTCATGAATCCATTAAAAAT 3155  
 N P I V L G P N N S N L P K I F S I I A D G G V H E S I K N  
 GAAGAAGTATGGAAAAACGGCTTGAATGTATCCGTCAGTTTCCAGGCTCAGGAGTATTATTCACAGAATGTGTGCACAGCTCAAT 3245  
 E E V C G G K R L A N V I R Q V Q A S G V L F T E C V S Q L N  
 GCAGCCAGCAGAAAGCTTTACAGGACCTGCTCAGCACTGCGTGAAGGCCTTCCACACTACATATCAGGACAACAACTCAATAAACT 3335  
 A A Q Q K A L Q D L L S T A  
  
 TACCTCTTCTGTTTAGGTTTTCTGTTTTAGTTTTGAGCAAAAAGAACAGTAGTGCTTATAGGCCAAGTTTTAGCAGGCCATCAAAAAC 3425  
 AGCGGGCAGAAAACACTATGTATCAGACTTCATTGTCTGAATGGATCGTTCTACAAGAGAGCTGCCCCCTGCAGACTCACAATGGCTATA 3515  
 AAAGGATTATTTTTCTATCCTTATGTCTTCCCTCCTTATACATTTTCCACGTTTTGTGGTAGGGAGGTTCACTTTGCCYAGTTCCAAT 3605  
 AAATTAGGACTGTGGGTGCTACTTTTGGTTTCATATGACAAATTTCCCATGCACTGGAAGTACTTTGCGACACTTTTTGACATGGCAGC 3695  
 ATCAATGTGGTTCCACCACGTGAGTTGATACAGTTAACATCTGTGCTTAGAATGATGTTGCCACAGTCAATAATGAACTCTGATATTTTA 3785  
 CTTAATAAGTGGGATAGAAAAATTCCTTGTGCTTTGAAACATATCCCAAACCAAGGATGAAGGTATTGTGGAATTTTACGCACAGATT 3875  
 CATATTGGCATAAGGTTTTTTTTTTTGTGCCATCAGCTGTTTTATAGGATTTATGGATTGAGGCAGGAAAAATTTTAGCTTCTGGCCCT 3965  
 TGAATGTAAAAATGTCTTTTGGCATGTCTTGAACCTATTCACTCCTCAATAACAACAATGAAATATCTCAACCAGCAAAAAA 4055  
 AAAAAA 4062

**Abbildung 29: Karyopherin β3 Sequenz.**

Untranslatierte Region (UTR) und kodierende Sequenz von Karyopherin β3. Darstellung der kodierenden Nukleotide mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Nicht translatierte Nukleotide repräsentieren 5 Nukleotide der 5'UTR und 775 Nukleotide identifizierter 3'UTR.

## X. I. Karyopherin $\alpha 3$

```
ATGTCCAACAATGAGAATGGTGCCCGTCTCACTAGGTTCAAGAACAAGGGCAAGGACTCCACGGAAATGAGGAGGAGGAGGATTGAGGTG 90
M S N N E N G A R L T R F K N K G K D S T E M R R R R I E V
AACGTGGAGCTGCGTAAGGCCAAGAAAGATGATCAGATGCTAAAGAGGAGAAATGTCAGCACCTTCCCAGATGAGCCAACTCTCCCTC 180
N V E L R K A K K D D O M L K R R N V S T F P D E P T S P L
CAGGAGAAGAACCAGAATGGGCAGACCTTTCACAGTGGAGTGTGAGGAGATTGTCGAGGTGTCGCCAACCTTAGCCTGGACATACAG 270
Q E K N Q N G Q T S S Q W S V E E I V R G V A N P S L D I Q
CTACAGGCCACACAGGCTGCAAGGAACTTTTGTCCAGAGAGCGTGAGCCACCAATTGACCGCATCATTAAAGCTGGTCTCATTCCCAAG 360
L Q A T Q A A R K L L S R E R E P P I D R I I K A G L I P K
CTGGTAACTTTTCTGGCCACTCTGACTGCAGCCCCATTTCAGTTGAGGCTGCCTGGGCTTTGACGAACATTGCTTCTGGAACCTTCTGAT 450
L V T F L A H S D C S P I Q F E A A W A L T N I A S G T S D
CAAACCAAGGCTGTTGTTGAAGGCGGTGGTGTCCCGGCTTCATCTCTCTTTGGCATCTCCTCATCCTCACATCAGCGAGCAGGCTGTG 540
Q T K A V V E G G G V P A F I S L L A S P H P H I S E Q A V
TGGGCTTTGGGAAACATTGCAGGTGATGGATCTGCTTACAGAGATCTGGTTATTAACATGGAGCTGTTGGGCTCTGTTAGCTTTATTG 630
W A L G N I A G D G S A Y R D L V I K H G A V G P L L A L L
GCTGGTCTGACCTCTCCACATTAGCTACTGGTTACCTCAGAAACGTTACATGGACTCTTTCAAACCTGTGCCGCAACAGAATCCAGCC 720
A G P D L S T L A T G Y L R N V T W T L S N L C R N K N P A
CCACCGCTGGATGCCATTGACGAGATCTTGCACCAATAGTGAGACTACTGCATCATGATGACCGAGAGGTAAGTGGCTGATACCTGCTGG 810
P P L D A I Q Q I L P T I V R L L H H D D R E V L A D T C W
GCAGTGTCTACCTCACTGATGGTTCAAATGACCGCATCGACGTGGTGGTCCGACAGGCTTAGTCTCTCGCATTGTCCAGCTACTGGCC 900
A V S Y L T D G S N D R I D V V V R T G L V S R I V Q L L A
TGTGGAGAGCTGACAGTTGTGACCCCTTGTCTGAGAATATTGGAAACATTGTGACTGGCACAGATGAGCAGACCCAAGTGGTCTTTGAC 990
C G E L T V V T P C L R T I G N I V T G T D E Q T Q V V L D
GCTGGGGCTTTTCTGCCCTTACTGAGCTGCTCAGCACCAACAAGAATAACATCCAGAAGGAAAGCTGCCTGGACATTGTCACACATTACT 1080
A G A L S A F T E L L T H H K N N I Q K E A A W T L S N I T
GCTGGGCTGACAGACAGATCCAGGAAGTGGTCAATTTGGGCTAATTCCTACCTCGTTGAAATCCTTAGGAAGGGTACTACAAGACC 1170
A G R Q D Q I Q E V V N C G L I P Y L V E I L R K G D Y K T
CAGAAAGAAGCTATTTGGGCAGTCACAACTACACAAGTGGGGGAACAATAGATCAAATATCTACCTCGTCCAATGTGGTATCATCGAG 1260
Q K E A I W A V T N Y T S G G T I D Q I I Y L V Q C G I I E
CCTCTGTCAAATCTCTGTGACTCAAGGACAGCAAGACTGTGCTGGTCACTGATGATGCATTACCAATATATTTGCTGCTGCTGATAAG 1350
P L S N L L S V K D S K T V L V M L D A F T N I F A A A D K
ATTGGGAAACTGAGAAGCTGTGCCTAATGGTAGAGGAATGTGGTGGTCTTGACCGCATTGAGGCTTTGCAATCTCATGAGAATGAGCAG 1440
I G E T E K L C L M V E E C G G L D R I E A L Q S H E N E Q
GTTTACAAAGCATCGGCTGCTCTCATTTGAGAAATACTTCTCTGCAGAGGATGGAGAAGATGAATCATTGGCTCCTGAGACCACAGCCGAC 1530
V Y K A S A A L I E K Y F S A E D G E D E S L A P E T T A D
GGCTATGCTTTCCAGGTGGAAGGTGGAACACACTACATTTAACTTAAACACTGCCATGTCTGTCCCTTTTTTCTATGTGAACC 1620
G Y A F Q V E G G T H T T F N F

TGCACCTTTGTCTTATTCAAGTGTCTTCTCCACACTGTAATATACTGTGAATCTTAAATCTGTGTTCAAATTTAATAAAATGTGTGAAA 1710
TATATTTCTTTTAAATTTACAGCAGGCAGCAGCTGCCAGACCAGCCTTTTCTCATTCAAACGCAAAGGTAGCTGTGACCCACATAACCTCT 1800
TAATGCAGAGATTTTATTGTTTTGGAACAATTCAGCCACTGTCAGCACTTAGACAATTTTAGATAAAGGGGTTTCTGAAAATAAATTG 1890
GTAATAAAATTTGAGTTGTGATCCCTGTGCCTTATATAAACCACTGTTTGTCTGGTCTGGGTCCACTTATGTCCAGGTTCCAGTAAC 1980
AATCCATAGACTTGCCATCTCTGCTCTGAGCCCCCTGTATAACTAAGAACTAGCTTTAGCTTGGAGGCTGCACACTGATGTTCTTTGTAC 2070
AGCCTCTTATATTGCAACTGTTTACAATAAATTCCTTTTGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2160
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2187
```

### Abbildung 30: Nukleotidsequenz mit abgeleiteter Proteinsequenz der kodierenden Nukleotide von Karyopherin $\alpha 3$ aus *Xenopus laevis*.

UTR (untranslatierte Region) und kodierende Sequenz von Karyopherin  $\alpha 3$ . Über den kodierenden Nukleotiden ist die abgeleitete Aminosäuresequenz dargestellt.

## X. I. Karyopherin $\alpha 4$

```
GTAACCGGGCAGTGGGAAGACGCAGAAGAAGCAGCCGCCATGGCGGACAACGCCGGCCTAGATAACCACCGTATCAAGAGCTTTAAGAAC 90
M A D N A G L D N H R I K S F K N
AAGGGCGGAGATGTGGAGACTATGAGAAGACACAGAAATGAAGTGACTGTTGAGCTGCGAAAAGAACAACGAGACGAGCACCTGTTGAAA 180
K G R D V E T M R R H R N E V T V E L R K N K R D E H L L K
AAAAGAAATGTCCACAGAAGAGAGTTTTAGAAGATTCAGATGTCGATGGAGATTTAAATCGCAAATGAAACACTCGAAGCAATATTG 270
K R N V P Q E E S L E D S D V D G D F K S Q N E T L E A I L
CGGAATGCCACCAACGATAATCCAGCAGTCCAACCTAAGTGCAGTGAAGCAGCAAGAAAATTACTGTCCAGTGACAGAAATCCACCTATT 360
R N A T N D N P A V Q L S A V Q A A R K L L S S D R N P P I
GATGATCTAATAAAATCGGGAATTTTCCGATTCTAGTGAATGCTTAGAGGCAGATGATAACCCTCCTTTACAGTTTGAAGCAGCATGG 450
D D L I K S G I L P I L V K C L E A D D N P P L Q F E A A W
GCTTTAACTAACATAGCATCAGGAACCTCGGCACAAACCCAGGCAGTGGTTCAGTCCAATGCTGTGCCTCTCTTCTGCGACTTCTCCAT 540
A L T N I A S G T S A Q T Q A A V V Q S N A V P L F L R L L H
TCCCTGCATCAAAATGTTTGTGAACAAGCAGTGTGGGCACCTGGAAACATTATAGGTGATGGTCCTCAGTGTAGAGATTATGTCATCTCG 630
S L H Q N V C E Q A V W A L G N I I G D G P Q C R D Y V I S
CTTGGAGTTGTCAAACCTCTTCTGTCATTTCATCAACCCCTCAATCCCCATCACCTTTCCTTTCGTAACGTCACCTTGGGTCATTGTAATCTC 720
L G V V K P L L S F I N P S I P I T F L R N V T W V I V N L
TGCCGAAATAAGGACCTCCCCACCCATGGAGACTGTCCAGGAGATTTTACCTGCTTTGTGTCTCATATATACATACAGACTTCAAT 810
C R N K D P P P P M E T V Q E I L P A L C V L I Y H T D F N
ATTCTAGTGGATACTGTATGGGCTTTGTCTTACCTGACTGATGGTGGAAATGAGCAAATACAGATGGTGTAGATTCTGGAGTCGCTCCA 900
I L V D T V W A L S Y L T D G G N E Q I Q M V I D S G V A P
TTTTTAGTACCTCTTTGAGCCACCAGGAAGTAAAGTACAACCTGACAGCCCTAAGGGCTGTTGGTAAACATTGTTACTGGAACAGATGAA 990
F L V P L L S H Q E V K V Q T A A L R A V G N I V T G T D E
CAGACTCAAGTCGTCTTAAACTGTGATGTTCTTCTCATTTTTCAATCTTCTAACCCACCTAAAGAGAAAAATCAACAAGGAAGCAGTG 1080
Q T Q V V L N C D V P S H F H N L L T H P K E K I N K E A V
TGTTCTTATCTAATATTACAGCAGGAAACCAGCAACAAGTCAAGCTGTCATAGATGCCGGTCTAATACCTATGATTATACATCAGCTG 1170
W F L S N I T A G N Q Q Q V Q A V I D A G L I P M I I H Q L
GCCAAGGGGGATTTTGAACCCAGAAGGAAGCTGCCTGGGCTATCAGTAACCTGACGATAAGTGGCAGAAAAGATCAGGTGGAGTACCTT 1260
A K G D F G T Q K E A A W A I S N L T I S G R K D Q V E Y L
GTGCAGCAAAATGTTATCCCCCGTTCTGCAGTTTGTGTCTGTGAAGGATTCTCAAGTGGTGAAGTTGTTTTGGACGGTTTGAAAAAC 1350
V Q Q N V I P P F C S L L S V K D S Q V V Q V V L D G L K N
ATTCTAATAATGGCAGGAGATGAAGCTAGCACTATTGCTGAGATTATTGAAGAATGTGAAGGATTGGAGAAAAATAGAAGCACTGCAACAA 1440
I L I M A G D E A S T I A E I I E E C E G L E K I E A L Q Q
CACGAGAATGAAGAAATCTATAAACTAGCATTGAGATCATAGACCAGTATTTCTCTGGTGATGATATTGATGAAGATCAAAGCCTTGT 1530
H E N E E I Y K L A F E I I D Q Y F S G D D I D E D Q S L V
CCTGACGCTACCCAGGAGGTACATATCATTTTTGAACCCACAGCCAGTTTGCAAACAAGGAATTTAACTTCTAAGTATTGTTACTGTGCA 1620
P D A T P G G T Y H F E P T A S L Q T K E F N F .
GCTTTTCTGTCCCTCAGCATACACCACCACCCAGACCAACCTGTTGAAGAAACATTAAGGCTTAAAGGCCAAAAAATAAAAAAAAAA 1710
AAAAAAAAA 1719
```

### Abbildung 31 : Nukleotidsequenz mit abgeleiteter Proteinsequenz der kodierenden Nukleotide von Karyopherin $\alpha 4$ aus *Xenopus laevis*.

Untranslatierte Region (UTR) und kodierende Sequenz von Karyopherin  $\alpha 4$ . Über den kodierenden Nukleotiden ist die abgeleitete Aminosäuresequenz dargestellt.

## X. I. Karyopherin $\alpha 5.1$

ATGGACACCATGGCAAGCCCCGGAAGGACAACAGTCGGATGAAGAGCTACAAGAACAAGGCTCTGAACCCGTAAGAGATGCGCCGGCGT 90  
M D T M A S P G K D N S R M K S Y K N K A L N P E E M R R R  
CGTGAGGAAGAAGGCATCCAGCTCCGGAACAGAAAGAGGGAACAACAGCTCTTTAAACGTCGGAATGTGGAGTTGGCTCCAGAGGATACC 180  
R E E E G I Q L R K Q K R E Q Q L F K R R N V E L A P E D T  
GCCATGTTTGACGGACCACTGATGGATTCTCATGTCAGCTCTACCACCCCTGGGATGGAGTTATTACCCGCGAGATGGTAGCATTACT 270  
A M F D G P L M D S H V S S T T P G D G V I T R E M V A L L  
CTCTCTGATGACCTGACCTACAATTAGCTACTACACAGAAATTCAGAAAGCTCTTATCCAAAGAGCCAAATCCACCAATAGATGAGGTG 360  
L S D D P D L Q L A T T Q K F R K L L S K E P N P P I D E V  
ATCAATGCCCCAGGAGTAGTAGAGCGATTGTAGAATTTCTGAAGAAGAGTGACAACATACTACTACAGTTTGAAGCTGCCTGGGCCCTT 450  
I N A P G V E R F V E F L K K S D N Y T L Q F E A A W A L  
ACGAATATAGCTTCTGGAACCTCACAACAAACAAAATCGTAATAGAAGCAGGGGAGTTCCAATTTTCATTACAGTCTAAACTCTGAC 540  
T N I A S G T S Q Q T K I V I E A G A V P I F I Q L L N S D  
TATGAAGATGTACAAGAACAGGCTGTTGGGCTCTGGGAACATCGAGGTGACAGTTTCAGTGTGCAGAGACTATGTTCAAGCTGTGAC 630  
Y E D V Q E Q A V W A L G N I A G D S S V C R D Y V L S C D  
ATCCTTCTCTCTTCTCAATCTCCTTACCAATCAACCCGCTCACCATGACCCGAAATGCAGTCTGGGCTTGTCTAACCTTTGTGCGA 720  
I L P P L L N L L T K S T R L T M T R N A V W A L S N L C R  
GGAAAGAACCCTCCAGACTTGGACAAGGTGCTCCGCTCTCTCTGTCTCTGCTCTCTTCTATTTCAGCAGTTCAGACCTGTTA 810  
G K N P P P D F D K V S P C L P V L S R L L F S S D S D L L  
GCCGATGCCTGCTGGGCGCTTTCTTATCTCTCCGATGGCCCTAATGAGAAGATTCAGGCGGTTCATAGACTCTGGAGTCTGCCGAGGCTA 900  
A D A C W A L S Y L S D G P N E K I Q A V I D S G V C R R L  
GTGGAGCTCCTAATGCACAATGATTACAAGGTGGCTTCTCCAGCACTCAGGCTGTAGGAAATATTGCTACTGGAGATGATATCCAGACA 990  
V E L L M H N D Y K V A S P A L R A V G N I V T G D D I Q T  
CAGGTCATCTTAACTGTTTCAGCTCTTCCCTGCCTCCTTCTCTTTTGGAGCAGCCAAAGAGTCCATCCGGAAGGAGGCTGCTGGACA 1080  
Q V I L N C S A L P C L L H L L S S P K E S I R K E A C W T  
ATTTCAAACATTACTGCTGGCAACAGAGGCAAAATACAGGTTGTGTCTGATGCAAAACATTTTTCCAGTTTTGATTGAGATTTTGCAAAA 1170  
I S N I T A G N R G Q I Q V A D A N I F P V L I E I L Q K  
GCTGAATTTGCAACCCGAAAAGAGGCTGCATGGCAATCACTAATGCAACATCTGGTGGCACACCAGAGCAAAATCAGGTACCTGGTGAAC 1260  
A E F R T R K E A A W A I T N A T S G G T P E Q I R Y L V N  
CTTGGCTGCATTAACCTTTGTGTGACCTTCTCACAGTCAAGGCTCAAAGATTTGTTTCAGGTTGCCCTAAATGGACTGGAAAATATACTA 1350  
L G C I K P L C D L T V M D S K I V Q V A L N G L E N I L  
CGGCTTGGTGAGCAAGAAGCAAGCATGGAGGCAATGGTATCAACCCATATTGTGGACTGATTGAAGAGGCATACGGCTTGGACAAAATA 1440  
R L G E Q E A K H G G N G I N P Y C G L I E E A Y G L D K I  
GAGTTCTGCAGAGCCACGAGAACCAGGAAATCTACAAAAAGCATTGAAATGATAGAACATTACTTTGGAGTGGAGGAAGATGACCCCT 1530  
E F L Q S H E N Q E I Y Q K A F E L I E H Y F G V E E D D P  
CAGCTGGTCCCCTCTGTTGATGAATCTCAGCAGCAATATATCTTTTCAGCAACAGAAAGCACCTATGGAAGGATTTTCAGCTCTAA 1614  
Q L V P S V D E S Q Q Q Y I F Q Q T E A P M E G F Q L .

## X. I. Karyopherin $\alpha 5.2$

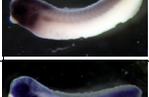
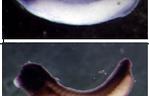
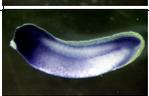
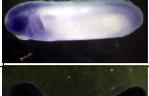
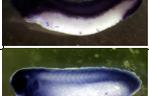
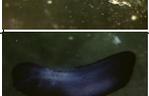
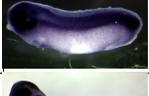
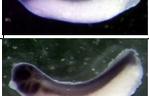
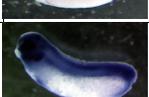
ATGGACACCATGGCAAGCCCCGGAAGGACATCAGTCGGATGAAGAGCTACAAGAACAAGGCTCTGAACCCGTAAGAGATGCGCCGGCGT 90  
M D T M A S P G K D I S R M K S Y K N K A L N P E E M R R R  
CGTGAGGAAGAAGGCATCCAGCTCCGCAACAGAAAGAGGAGCAACAGCTCTTTAAACGACGTAATGTGGAGTTGGCTCCAGAAGATACC 180  
R E E E G I Q L R K Q K R E Q Q L F K R R N V E L A P E D T  
GCCATGTTTGACGGACCACTGATGGATTCTGTAGAATTTCTGAAGAAGAGTGACAACATACTACTACAGTTTGAAGCTGCCTGGGCCCTT 270  
A M F D G P L M D S C V S S T T P G D G V I T H E M V A L L  
CTCTCTGATGACCTGACCTACAGTTAGCTACTACACAGAAATTCAGAAAGCTCTTATCCAAAGAGCCAAATCCACCGATAGATGAGGTG 360  
L S D D P D L Q L A T T Q K F R K L L S K E P N P P I D E V  
ATCAGTTCCCCAGGAGTAGTAGAGAGATTGTAGAATTTCTGAAGAAGAGTGACAACATACTACTACAGTTTGAAGCTGCCTGGGCCCTT 450  
I S S P G V E R F V E F L K K S D N Y T L Q F E A A W A L  
ACGAATATAGCTTCTGGCACTCCCAACAACCAAGATTGTAATAGAAGCAGGAGCAGTTCCAATTTTCATTACAGTCTAAACTCTGAC 540  
T N I A S G T S Q Q T K I V I E A G A V P I F I Q L L N S D  
TATGAAGATGTGCAAGAACAGGCTGTTGGGCTCTGGGAACATCGAGGTGACAGTTTCAGTGTGCAGAGACTATGTTCAAGCTGTGAC 630  
Y E D V Q E Q A V W A L G N I A G D S S V C R D Y V L S C D  
ATCCTTCTCTCTTCTCAACCTCCTTACAAAATCGACCCGCTCACCATGACCCGAAATGCAGTCTGGGCTTATCTAACCTTTGTGCGA 720  
I L L P L L N L L T K S T R L T M T R N A V W A L S N L C R  
GGAAAGAACCPCCTCCAGFTTGTGATAAGGTGCTCAGTGTCTCTCTGTCTGTCTCGCTTCTATTTCAGCAGTTCAGACCTGTTA 810  
G K N P P P D K V S P C L P V L S R L L F S S D S D L L  
GCCGAGCCTGCTGGGCACTTTCTTATCTCTGATGGTCTAATGAGAAGATCCAGGAGTTCATAGACTCAGGAGTCTGCCGAGGCTG 900  
A D A C W A L S Y L S D G P N E K I Q A V I D S G V C R R L  
GTGGAGCTCCTAATGCACAATGATTACAAGGTGGCTTCTCCAGCACTCAGGCTGTAGGAAATATTGCTACTGGAGATGATATCCAGACA 990  
V E L L M H N D Y K V A S P A L R A V G N I V T G D D I Q T  
CAGGTCATCTTAACTGTTTCAGCTCTTCCCTGCCTCCTTCTCTTTTGGAGCAGCCAAAGAGTCCATCCGGAAGGAGGCTGCTGGACA 1080  
Q V I L N C S A L P C L L H L L S S P K E S I R K E A C W T  
ATTTCAAACATTACTGCTGGCAACAGAGGCAAAATACAGGTTGTGTCTGATGCAAAACATTTTTCCAGTTTTGATTGAGATTTTGCAAAA 1170  
I S N I T A G N R G Q I Q V A D A N I F P V L I E I L Q K  
GCTGAATTTGCAACCCGAAAAGAGGCTGCATGGCAATCACTAATGCAACATCTGGTGGCACACCAGAGCAAAATCAGGTACCTGGTGAAC 1260  
A E F R T R K E A A W A I T N A T S G G T P E Q I R Y L V N  
ATTGGCTGCATTAACCTTTGTGTGACCTTCTCACAGTCAAGGCTCAAAGATTTGTTTCAGGTTGCCCTAAATGGACTGGAAAATATACTA 1350  
L G C I K P L C D L T V M D S K I V Q V A L N G L E N I L  
CGGCTTGGTGAGCAAGAAGCAAGCATGGAGGCAATGGTATCAACCCATATTGTGGACTGATTGAAGAGGCATACGGCTTGGACAAAATA 1440  
R L G E Q E A K H G G N G I N P Y C G L I E E A Y G L D K I  
GAGTTCTGCAGAGCCACGAGAACCAGGAAATCTACAAAAAGCATTGAAATGATAGAACATTACTTTGGAGTGGAGGAAGATGACCCCT 1530  
E F L Q S H E N Q E I Y Q K A F E L I E H Y F G V E E D D P  
CAGCTGGTCCCCTCTGTTGATGAATCTCAGCAGCAATATATCTTTTCAGCAACAGAAAGCACCTATGGAAGGATTTTCAGCTCTAA 1614  
Q L V P S V D E S Q Q Q Y I F Q Q T E A P M E G F Q L .

**Abbildung 32: Nukleotidsequenz mit abgeleiteter Proteinsequenz der kodierenden Nukleotide von den Karyopherin  $\alpha$  Varianten  $\alpha 5.1$  und  $\alpha 5.2$  aus *Xenopus laevis*.**

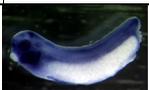
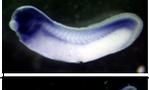
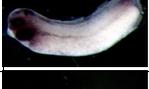
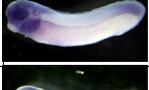
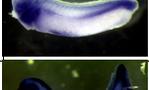
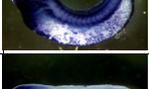
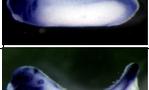
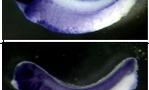
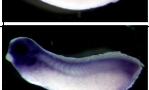
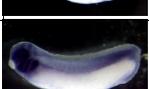
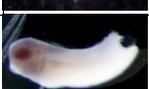
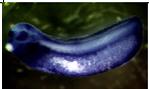
Untranslatierte Region (UTR) und kodierende Sequenz von Karyopherin  $\alpha 5.1$  und  $\alpha 5.2$ . Darstellung der kodierenden Nukleotide und abgeleiteten Aminosäuresequenzen.

Nr.	Kandidaten	Bild	ähnlichste(s)	Spezies	Zugriffsnummer	Beschreibung und Bemerkungen	spez. Funktion	Funktions-zuordnung
			Protein / RNA / DNA					
1	3p21f1		KIAA0755 gene product	Homo sapiens	gi 7662659	SEC24 related gene family, member D; KIAA0755 gene product; SEC24 (S. cerevisiae) homolog D Identities = 51/104 (49%), Positives = 74/104 (71%)	SEC24 related gene family, member D	vesikulärer Transport
2	3p8g1		eukaryotic translation initiation factor 2	Homo sapiens	ref NP_001406.1	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3   gtp-binding elongation factor family	eukaryotic translation factor	Translation
3	4p1h2		translation elongation factor EF-1 gamma	Xenopus laevis	pir  51237	Expression of elongation factor 1 alpha (EF-1 alpha) and 1 beta gamma (EF-1 beta gamma) are uncoupled in early Xenopus embryos binds specifically to the p110 subunit of eIF3 which is responsible to its recruitment to the 40S ribosomal subunit	eukaryotic translation factor	Translation
4	3p21a5		Fascin	Xenopus laevis	sp Q91837	FASCIN >gi 481915 pir  S40128 fascin [FUNCTION] ORGANIZES FILAMENTOUS ACTIN INTO BUNDLES.	Cytosklett	Strukturprotein
5	3P7C8		TUBULIN ALPHA CHAIN (ALPHA T6).	Torpedo marmorata	sp P36220	TUBULIN ALPHA CHAIN (ALPHA T6) BINDS TWO MOLES OF GTP, ONE AT AN EXCHANGEABLE SITE ON THE BETA CHAIN AND ONE AT A NONEXCHANGEABLE SITE ON THE ALPHA-CHAIN. IS THE MAJOR CONSTITUENT OF MICROTUBULES.	tubulin group Cytosklett	Strukturprotein
6	3p11b9		AW158401	Xenopus laevis	za41a05.x1	EST's; T7-Sequenzierung ergibt Nucleotid Homologie zu gb BC002964.1 BC002964 H.s., profilin 2, clone MGC:1684  binds to actin and affects the structure of the cytoskeleton. at high concentrations, profilin prevents the polymerization of actin, whereas it enhances it at low concentrations. by binding to pip2, it inhibits the formation of ip3 and dg.	profilin family Cytosklett	Strukturprotein
7	4p1d10		RACK1	Xenopus laevis	gi 5326785	activated protein kinase C receptor; RACK1 [gi 1090736 prf  2019408A neural differentiation-associated protein [Mus musculus]Identities = 237/253 (93%), Positives = 246/253 (96%)]	G protein	Signaltransduktion
8	3p15g1		PGLa	Xenopus laevis	emb X13391.1	Hormon   Xenopus laevis prepro-PGLa gene exon 4 (3' UTR) PGLa = peptide with amino-terminal glycine and carboxy-terminal leucinamide	signaling molecule	Signaltransduktion
9	3p8c6		(PROGESTERONE RECEPTOR COMPLEX P23)	Homo sapiens	ref NP_006592.1	unactive progesterone receptor, 23 kD [SUBUNIT: BINDS TO TELOMERASE AND TO THE PROGESTERONE RECEPTOR]	p23 / vos2 family. Receptor	Signaltransduktion
10	3p4a1		radical fringe	Xenopus laevis	gb U77641.1	Blast n Werte: 1001 / 0.0 radical fringe mRNA CG7323 gene product Drosophila (Score 33; E V: 1.7)   lunatic Fringe can induce mesoderm and reveal that the Fringe proteins are a family of vertebrate signaling molecules]	signaling molecule	Signaltransduktion
11	3p10d8		(AF302423)	Xenopus laevis	gb AAG22819.1	AF302423_1 RNA helicase II/Gu	HELICASE	RNA
12	3P7D2		HEL117	Rattus norvegicus	pir  A57514	RNA helicase HEL117	HELICASE	RNA
13	3P7G3		RNA helicase	Homo sapiens	ref NM_016130.1	putative RNA helicase (LOC51139), mRNA	HELICASE	RNA
14	3p2c5		CG9253 gene product	Drosophila melanogaster	gb AAF53963.1	PUTATIVE ATP-DEPENDENT RNA HELICASE	HELICASE	RNA
15	3p2f1		hnRNP L	Homo sapiens	ref XP_008903.1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L contains 3 ma recognition motifs (mnp). this protein is a component of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnmp) complexes which provide the substrate for the processing events that pre-mrnas undergo before becoming functional [größe 1,5kb]	hnRNP	RNA
16	3p12c4		hnRNP A0 protein: A0	Homo sapiens	gb AAB50657.1	A0=heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	hnRNP	RNA
17	3p4a10		polyA binding protein	Xenopus laevis	emb CAA40721.1	(X57483) polyA binding protein	-	RNA
18	3p4e11		COLD-INDUCIBLE RNA-BINDING PROTEIN	Xenopus laevis	sp O93235	COLD-INDUCIBLE RNA-BINDING PROTEIN EXPRESSION INCREASES RAPIDLY DURING GASTRULATION. SUBCELLULAR LOCATION: NUCLEAR; NUCLEOPLASM (BY SIMILARITY).	-	RNA
19	3p8d4		dsRNA-binding protein 4F.1 mRNA	Xenopus laevis	gb U07155.1	dsRNA-binding protein 4.1 mRNA, complete cds mit nls	-	RNA
20	3p4d10		ELONGATION FACTOR 1-ALPHA	Xenopus laevis	sp P13549	[bad sequence DATA --> homology o.k.]. THIS PROTEIN PROMOTES THE GTP-DEPENDENT BINDING OF AMINOACYL-tRNA TO THE A-SITE OF RIBOSOMES DURING PROTEIN BIOSYNTHESIS. EXPRESSED UNDER DIFFERENT DEVELOPMENTAL Control	eukaryotic translation factor	RNA

Blastx		Blast n		Blast EST		Revers Sequenziert	Yeast-Suche nach maximaler Sequenz	Signaturen	Signatur Bewertung	Aug	Kiemenbögen	Schwanzspitze	Hirn	Pronephros	Endoderm	Haftdrüse	Neuralrohr	Ohrplacode	Epidermis	Somiten	Notochord	Nerven	Herz	Proctodeum	Epiphyse	Nasenplacode	Hypophyse	Schlupfdrüse
E-Value	Score	E-Value	Score	e(bits)/E-Value	Scor					Au	Kb	Ss	Hi	Pn	En	Ce	Nr	Op	Ep	So	No	Ne	He	Pd	Pi	Np	Py	Ha
1,0E-21	103								6	6	6	6	6	0	2	3	6	1	1	1	1	6	6	6	2	6	6	
3,0E-77	288								6	6	6	6	6	1	0	4	6	3	2	2	4	4	2	1	6	5	4	
1,0E-101	235								6	6	6	6	6	0	0	4	5	5	1	0	0	6	5	3	5	6	4	
2,0E-99	362	0,00E+00	916						6	6	5	5	4	0	1	2	6	1	1	1	1	2	0	6	6	6	6	
6,0E-92	337								6	6	6	6	6	1	0	6	6	4	1	0	0	6	6	1	6	6	6	
-	-	2,00E-02	46	1,00E-97	361	za41a 05.x1 773 0.0			6	6	3	5	5	1	1	3	4	2	3	2	5	2	2	1	6	5	4	
e-135	481								6	6	6	5	6	0	0	4	6	4	1	0	0	6	6	2	6	6	6	
8,7E-01	35	1,00E-31	143						6	6	6	6	3	0	1	1	6	2	2	1	1	6	3	6	6	6	6	
9,0E-15	81								6	6	6	6	6	1	0	4	6	2	1	1	5	5	5	5	6	6	6	
1,7E+00	33	0,00E+00	1001						6	6	5	5	6	1	1	3	6	2	1	0	0	5	2	1	6	5	6	
1,0E-111	400								6	6	6	6	6	1	1	6	6	2	6	1	6	5	3	5	6	6	6	
2,0E-88	208								6	5	5	5	4	0	0	1	3	1	1	3	0	1	1	1	4	6	5	
-	-	6,00E-11	74						6	6	5	6	5	0	0	2	5	2	1	0	0	5	1	2	6	6	6	
8,0E-50	196								6	4	4	5	0	0	0	1	3	1	1	2	0	1	2	1	2	2	1	
1,0E-113	409								6	6	5	6	3	0	0	1	6	3	1	0	0	4	0	1	6	6	6	
2,0E-76	286								6	6	6	6	6	2	0	2	6	3	1	0	5	6	4	0	6	6	6	
5,0E-94	344								6	5	5	3	4	0	0	2	4	3	1	0	0	1	3	1	4	3	4	
5,0E-19	94	2,00E-87	327						6	6	6	4	6	0	2	5	6	5	1	0	0	6	6	6	6	6	6	
-	-	0,00E+00	1183						6	6	6	6	6	1	0	6	6	5	4	1	6	6	6	0	6	6	6	
3,0E-40	99								6	6	6	6	6	0	0	5	6	5	1	0	0	6	6	6	6	6	6	

Nr.	Kandidaten	Bild	ähnlichste(s)	Spezies	Zugriffsnummer	Beschreibung und Bemerkungen	spez. Funktion	Funktions-zuordnung
			Protein / RNA / DNA					
21	3p4d11		translation initiation factor 4	Homo sapiens	ref NP_001409.1	eukaryotic translation initiation factor 4 [translation repressor NAT1]	eukaryotic translation factor	RNA
22	3p10c8		translation initiation factor eIF3 p66 subunit	Homo sapiens	ref NP_003744.1	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 7 (zeta, 66/67kD)	eukaryotic translation factor	RNA
23	3p2b12		eukaryotic translation initiation factor 3	Homo sapiens	ref NP_003747.1	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 3 (gamma, 40kD)	eukaryotic translation factor	RNA
24	4p1d11		nucleolin	Xenopus laevis	emb X63091.1	nucleolin is the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells. it is found associated with intranucleolar chromatin and preribosomal particles. it is thought to play a role in pre-rna transcription and ribosome assembly. a specific DNA helicase and DNA-dependent ATPase, also acting as a sequence-specific RNA binding protein an autoantigen, a component of B cell specific transcription factor, involved in ribosome biogenesis, cytokinesis, nucleogenesis, cell proliferation and	Eukaryotic RNA-binding region RNP-1 proteins RIBOSOMEN-BIOGENESE	RNA
25	3p4d1		SPLICING FACTOR, ARGININE/SERINE-RICH 5	Homo sapiens	Q13243	PLAYS A ROLE IN CONSTITUTIVE SPLICING AND CAN MODULATE THE SELECTION OF ALTERNATIVE SPLICE SITES. NUCLEAR, [ALTERNATIVE PRODUCTS] FOUR ISOFORMS; SRP40-1 (SHOWN HERE), SRP40-2, SRP40-3 AND SRP40-4; ARE PRODUCED BY ALTERNATIVE SPLICING	SPLICING FACTOR	RNA
26	3p22h8		AW158433	Xenopus laevis	Za41d05.x1	AW158433 za41d05.x1 Xenopus EST library Xenop... EST's ergeben Ähnlichkeit mit SFR5_HUMAN Q13243 SPLICING FACTOR, ARGININE/SERINE-RICH 5 ]	SPLICING FACTOR	RNA
27	3p15f1		SPLICING FACTOR, ARGININE/SERINE-RICH2	Mus musculus	gi 3929383	SPLICING FACTOR, ARGININE/SERINE-RICH2	SPLICING FACTOR	RNA
28	3p22b1		non-histone chromosome protein 2	Homo sapiens	ref XP_010021.1	non-histone chromosome protein 2 (S. cerevisiae)-like 1 [this protein appears to be a highly conserved nuclear protein that is a component of the [U4/U6.U5] tri-snRNP. It binds to the 5' stem-loop of U4 snRNA.]	SPLICING FACTOR	RNA
29	3p19f3		KIAA0099	Homo sapiens	Q14671	Q14671 PROTEIN (FRAGMENT). 1199 aa KIAA0099 is related to D.melanogaster pumilio [Biochemical identification of Xenopus Pumilio as a sequence-specific Cyclin B1 mRNA-binding protein that physically interacts with a Nanos homolog (Xcat-2) and a cytoplasmic polyadenylation element-binding Protein (CPEB)]	Pumilio-family translational control	RNA
30	3p8b10		ribosomal protein L1a	Xenopus laevis	emb X05216.1	XLRPL1AR Xenopus mRNA for ribosomal protein L1a	ribosomal protein	ribosomal
31	3p21c5		RIBOSOMAL PROTEIN S2	Mus musculus	gi 1710758	RS2_MOUSE 40S RIBOSOMAL PROTEIN S2	s2p family OF ribosomal proteins	ribosomal
32	4p1d5		12sRNA	Xenopus laevis	gb M27605.1	X.laevis mitochondrial 12S rRNA	ribosomal RNA	ribosomal
33	3p8h5		ribosomal protein L10	Homo sapiens	ref NP_006004.1	ribosomal protein L10	ribosomal protein	ribosomal
34	4p1c1		RIBOSOMAL PROTEIN L8	Xenopus laevis	sp P41116	RL8_XENLA 60S RIBOSOMAL PROTEIN L8	L2P FAMILY OF ribosomal PROTEINS	ribosomal
35	3p10e1		60S ACIDIC RIBOSOMAL PROTEIN P1	Mus musculus	ref NP_061341.1	ribosomal protein, large, P1; acidic ribosomal phosphoprotein P1	ribosomal protein	ribosomal
36	3P7A5		40S RIBOSOMAL PROTEIN SA	Urechis caupo	sp P38981	40S RIBOSOMAL PROTEIN SA (P40) (34/67 KD LAMININ BINDING PROTEIN) probably a component of the translational machinery in Urechis caupo oocytes and embryos	S2P FAMILY OF ribosomal PROTEINS	ribosomal
37	4p1b8		RIBOSOMAL PROTEIN S27	Xenopus laevis	sp P47904	40S RIBOSOMAL PROTEIN S27	S27E FAMILY OF ribosomal PROTEINS	ribosomal
38	3p2f11		L18A	Rattus norvegicus	sp P11249	60S RIBOSOMAL PROTEIN L18A	ribosomal protein	ribosomal
39	4p1a4		40S RIBOSOMAL PROTEIN S3A	Oryzias latipes	gb AAD10201.1	40S RIBOSOMAL PROTEIN S3A	s3ae family of ribosomal proteins	ribosomal
40	4p1h8		RIBOSOMAL PROTEIN SA (P40)	Gallus gallus	sp P50890	40S RIBOSOMAL PROTEIN SA (P40) (34/67 KDA LAMININ RECEPTOR)	s2p family of ribosomal proteins	ribosomal

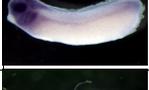
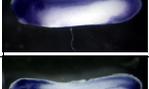
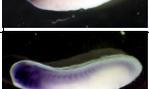
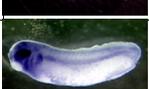
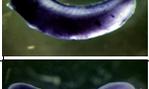
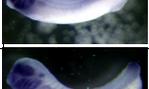
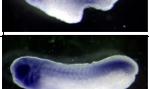
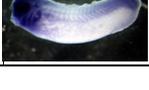
Blastx		Blast n		Blast EST		Revers Sequenziert	Yeast-Suche nach maximaler Sequenz	Signaturen	Signatur Bewertung	Aug	Kiemenbögen	Schwanzspitze	Hirn	Pronephros	Endoderm	Haftdrüse	Neuralrohr	Ohrplacode	Epidermis	Somiten	Notochord	Nerven	Herz	Proctodeum	Epiphyse	Nasenplacode	Hypophyse	Schlupfdrüse
E-Value	Score	E-Value	Score	e(bits)/E-Value	Scor					Au	Kb	Ss	Hi	Pn	En	Ce	Nr	Op	Ep	So	No	Ne	He	Pd	Pi	Np	Py	Ha
2,0E-73	276								6	5	5	5	3	0	0	1	3	2	1	1	0	3	1	2	4	4	2	
1,0E-101	370								6	6	6	6	6	1	1	6	6	2	6	1	6	6	5	5	6	6	6	
2,0E-49	195								6	6	5	6	4	1	0	2	6	1	1	0	0	5	1	0	6	6	6	
-	-	0,00E+00	684						6	6	6	4	5	0	0	1	3	2	1	0	0	5	4	1	5	5	6	
4,0E-44	177								6	6	6	6	6	0	0	5	6	5	1	0	0	6	3	1	6	6	6	
-	-	2,00E-11	76	0.0	797		ref[NP_012289.1] Transcriptional activator for allantoin an... 28 2.8		6	6	6	6	6	0	0	4	6	2	4	1	1	6	3	6	6	6	6	
2,0E-08	60								6	6	6	6	6	0	0	4	6	2	1	1	1	5	2	6	6	6	6	
2,0E-51	203								6	6	6	6	6	0	0	1	6	1	1	1	1	6	4	6	6	6	6	
2,5E-95	957								6	5	4	3	3	0	0	1	5	1	1	1	1	2	3	2	3	3	3	
3,0E-20	100	1,10E-01	44						6	6	6	6	6	0	1	6	6	1	6	1	6	6	6	6	6	6	6	
2,0E-86	319	1,00E-119	432						6	6	6	6	4	0	2	4	5	2	1	1	1	6	5	6	6	6	6	
-	-	0,00E+00	954						6	6	6	6	6	0	5	0	6	6	1	6	0	6	6	6	6	6	6	
1,0E-110	397								6	6	5	6	6	1	1	4	6	3	4	1	5	5	5	0	6	6	6	
1,0E-91	324								4	6	6	4	6	0	0	3	4	5	1	0	0	5	5	1	6	5	2	
1,0E-23	110								6	6	6	6	6	1	1	6	6	2	6	1	6	3	6	5	6	6	6	
3,0E-43	102								6	6	6	6	6	1	1	6	6	4	1	0	0	6	6	1	6	6	6	
5,0E-37	155								6	5	6	3	5	0	0	3	3	2	1	0	0	3	1	2	4	4	2	
1,0E-52	205								6	6	6	6	5	1	0	6	5	3	1	0	0	6	1	0	6	4	6	
1,0E-98	359								6	5	6	6	6	0	0	5	6	5	1	0	0	5	4	0	6	6	6	
3,0E-90	333								6	6	6	5	6	0	0	5	6	2	1	0	0	6	3	2	6	6	6	

Nr.	Kandidaten	Bild	ähnlichste(s)	Spezies	Zugriffsnummer	Beschreibung und Bemerkungen	spez. Funktion	Funktions-zuordnung
			Protein / RNA / DNA					
41	4p1c9		RIBOSOMAL PROTEIN L15	Xenopus laevis	sp P41051	60S RIBOSOMAL PROTEIN L15	L15E FAMILY OF ribosomal PROTEINS	ribosomal
42	3p2e8		L13A	Sus scrofa	sp Q95307	60S RIBOSOMAL PROTEIN L13A	I13p family OF ribosomal proteins	ribosomal
43	4p1f3		60S RIBOSOMAL PROTEIN L4A (L1A)	Xenopus laevis	sp P08429	60S RIBOSOMAL PROTEIN L4A (L1A)	L4E FAMILY OF ribosomal PROTEINS	ribosomal
44	3p18c3		Sam68deltaKH	Homo sapiens	gi 1841747	(U78971) Sam68deltaKH 404 aa [1,7 kb]	Transportassoziiert	nuclear transport
45	3p1b10		importin alpha3	Homo sapiens	ref NP_002257.1	karyopherin alpha 2; RAG cohort 1; importin alpha 1 [Xenopus :importin alpha 1b-->181 4e-45 Identities = 85/143 (59%), Positives = 112/143 (77%)] [ca 2 kb vorhanden ca. 1 kb 5' Sequenz fehlt noch]	karyopherin alpha Transportfaktor	nuclear transport
46	3P7E11		ORNITHINE DECARBOXYLASE (ODC)	Xenopus laevis	sp P27120	ORNITHINE DECARBOXYLASE (ODC) LEVELS INCREASE IN THE EMBRYOS 1.5-2 HOURS AFTER FERTILIZATION AND REACH A MAXIMUM AT 6 HOURS POST-FERTILIZATION, THEN DECREASE TO A VERY LOW LEVEL IN EARLY GASTRULATING EMBRYOS	decarboxylase	enzym
47	3p13d1		methylenetetrahydrofolat dehydrogenase	Xenopus laevis	ref NP_032664.1	methylenetetrahydrofolat dehydrogenase	dehydrogenase	enzym
48	3p21b3		NADH dehydrogenase subunit 4	Xenopus laevis	gi 5834991	NADH dehydrogenase subunit 4	dehydrogenase	enzym
49	3p18g7		Acetolactate synthase	Homo sapiens	gi 3184263	(AC004794) Acetolactate synthase	synthase oder synthetasen	enzym
50	3p21d2		ADE2	Gallus gallus	gi 585761	MULTIFUNCTIONAL PROTEIN ADE2 [INCLUDES: PHOSPHORIBOSYLAMINOIMIDAZOLE-SUCCINOCARBOXAMIDE SYNTHASE (SAICAR SYNTHETASE); PHOSPHORIBOSYLAMINOIMIDAZOLE CARBOXYLASE (AIR CARBOXYLASE) (AIRC)]	synthase und carboxylase	enzym
51	3P7F6		phospholipase C gamma-1a	Xenopus laevis	gb AAD03594.1	(AF090111) phospholipase C-gamma-1a	phospholipase	enzym
52	3p1b6		uridine kinase	Danio rerio	gb AAF06019.1	-	kinase	enzym
53	4p1b11		PROTEASOME SUBUNIT L	Rattus norvegicus	ref NP_058977.1	proteasome (prosome, macropain) subunit alpha type 4	Protease	enzym
54	3p10c1		Ubc9p	Xenopus laevis	gb AAB57736.1	(U88561) E2 ubiquitin conjugating enzyme [CATALYZES THE COVALENT ATTACHMENT OF UBIQUITIN TO OTHER PROTEINS. INTERACTS WITH E1A AND E2A. CONJUGATES THE SUMO PROTEIN]	UBIQUITIN Pathway	enzym
55	4p1h10		GLUTAMINE SYNTHETASE	Xenopus laevis	sp P51121	THIS GLUTAMINE SYNTHETASE MAY PLAY AN IMPORTANT ROLE IN THE EARLY STAGES OF VERTEBRATE NEURAL DEVELOPMENT.ATP + L-GLUTAMATE + NH(3) = ADP + GLUTAMINE +ORTHOPHOSPHATE. UP-REGULATED DURING EARLY NEURAL DEVELOPMENT	synthase oder synthetasen	enzym
56	3p1a1		PROTEASOME THETA-CHAIN, CHAIN 13, - COMPONENT C10-II	Oncorhynchus mykiss	sp O73817	THE PROTEASOME IS A MULTICATALYTIC PROTEINASE COMPLEX. HAS AN ATP-DEPENDENT PROTEOLYTIC ACTIVITY. IS INVOLVED IN AN ATP/UBIQUITIN-DEPENDENT NON-LYSOSOMAL PROTEOLYTIC PATHWAY. PROTEASOME B-TYPE FAMILY; THETA SUBFAMILY.	UBIQUITIN Pathway	enzym
57	3p8e5		ubiquitination factor E4B	Homo sapiens	ref XP_001371.1	ubiquitination factor E4B (homologous to yeast UFD2) ubiquitin chain assembly in conjunction with E1, E2, and E3.[Sehr schlechte Sequenzierung identifizierung mit dem Consensus von 2x CMV 1x T3 Sequenziersätzen]	UBIQUITIN Pathway	enzym
58	3p4c10		zygotic DNA replication factor MCM6b	Xenopus laevis	gb AAC41267.1	[bad sequence DATA --> homology o.k.] DEFINITION zygotic DNA replication factor MCM6b   824 aa	nucleic acid enzym	DNA
59	3p15g7		Xath-3.	Xenopus laevis	dbj D85188.1	mRNA for atonal homolog-3; Xath-3.[the bHLH protein Atonal suggests a conserved role in neurogenesis]	bHLH transcription factor	DNA
60	3p10a11		(AB013138) ATF4	Gallus gallus	dbj BAA76466.1	cAMP abhängiger activating transcription factor 4	bZIP transcription factor	DNA

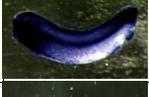
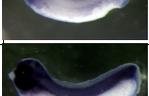
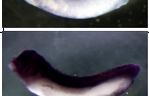
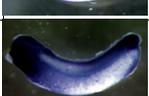
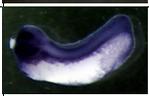
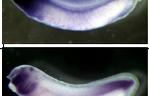
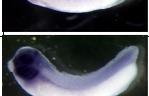
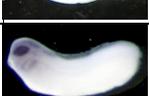
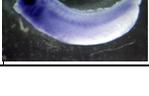
Blastx		Blast n		Blast EST		Revers Sequenziert	Yeast-Suche nach maximaler Sequenz	Signaturen	Signatur Bewertung	Aug	Kiemenbögen	Schwanzspitze	Hirn	Pronephros	Endoderm	Haftdrüse	Neuralrohr	Ohrplacode	Epidermis	Somiten	Notochord	Nerven	Herz	Proctodeum	Epiphys	Nasenplacode	Hypophyse	Schlupfdrüse
E-Value	Score	E-Value	Score	e(bits)/E-Value	Scor					Au	Kb	Ss	Hi	Pn	En	Ce	Nr	Op	Ep	So	No	Ne	He	Pd	Pi	Np	Py	Ha
2,0E-92	338								6	6	6	5	6	0	0	4	3	3	1	0	0	5	3	2	6	5	2	
9,0E-61	233								6	6	6	6	6	0	0	6	6	3	1	6	0	6	2	0	6	6	6	
1,0E-90	333								6	6	6	6	6	0	0	4	3	5	1	0	0	6	6	1	4	4	2	
5,0E-18	92								6	6	5	6	5	0	1	1	6	1	2	1	1	6	2	2	6	6	6	
1,0E-53	209	1,50E-02	46						6	6	5	6	6	1	0	2	4	2	1	1	3	1	1	2	5	5	4	
1,0E-112	405								6	5	5	3	3	0	0	1	4	2	1	0	0	1	0	0	2	3	2	
4,0E-93	341								5	6	6	1	5	0	0	2	4	1	2	1	1	3	0	1	1	1	1	
9,0E-45	181								6	6	6	6	6	0	4	6	6	2	2	1	1	6	5	6	6	6	6	
8,0E-59	227								6	5	5	5	2	0	1	1	6	1	1	1	1	1	3	5	5	5	5	
8,0E-80	297								6	6	6	5	6	0	1	2	6	1	1	1	1	2	5	3	6	6	6	
2,0E-89	329	0,00E+00	868						6	6	6	6	6	0	0	4	6	3	1	0	0	6	4	0	6	6	2	
5,0E-22	104	3,00E-03	48						6	4	4	4	2	0	0	1	4	0	1	0	0	3	3	1	2	3	2	
9,0E-30	122								6	5	4	4	6	1	0	1	3	2	1	0	0	2	1	2	3	3	3	
2,0E-91	360								6	5	6	6	6	1	1	4	4	2	2	1	5	1	2	2	6	6	6	
1,0E-108	390								6	6	5	5	5	0	0	1	3	1	1	0	0	5	4	2	6	5	4	
6,0E-43	174								6	5	5	4	4	0	0	0	3	0	1	0	0	1	0	1	1	2	1	
5,0E-13	74								6	5	4	5	4	1	0	2	5	2	3	0	2	2	3	1	4	3	3	
4,0E-24	111								6	6	6	4	6	0	0	4	5	5	1	0	0	6	6	1	6	6	5	
-	-	1,00E-112	412						6	5	5	5	5	0	1	2	4	1	1	1	1	3	4	4	4	4	4	
2,0E-21	103								6	5	4	6	2	1	1	2	6	2	3	5	3	1	1	0	6	5	6	

Nr.	Kandidaten	Bild	ähnlichste(s)	Spezies	Zugriffsnummer	Beschreibung und Bemerkungen	spez. Funktion	Funktions-zuordnung
			Protein / RNA / DNA					
61	3p21a4		COUP transcription factor 1 mRNA	Xenopus laevis	gb AF157558.1	Xenopus laevis COUP transcription factor 1 mRNA, complete cds COUP-TF1; chicken ovalbumine upstream promoter transcription factor 1 [Nuc. hormone receptor DNA-binding region nuclear hormone receptors family. nr2 subfamily	nuclear hormone receptors	DNA
62	3p19g4		Q9UN16 PROTEIN INHIBITOR OF ACTIVATED STAT	Homo sapiens	ref NP_056981.1	3p19g4_a Q9UN16 PROTEIN INHIBITOR OF ACTIVATED STAT, mRNA sequence 510 aa ; Putative DNA-binding (bihelical)	transcription repressor	DNA
63	4p1h7		hnRNP A/B homology	Gallus gallus	gb U14942.1	BINDET DNA UND RNA   GGU14942 ribonucleoprotein mRNA [A protein binding to CarG box motifs and to single-stranded DNA]	transcription repressor	DNA
64	3p18d2		SSB2	Xenopus laevis	emb X83674.1	XLSB2 X.laevis SSB2 gene single-stranded DNA binding protein.	ssb family nucleic acid enzym	DNA
65	3p12b10		H3	Homo sapiens	ref NP_002098.1	H3 histone, family 3A	Histon Chromatin	DNA
66	3p19c5		chromatin remodelling factor SWI1Lalpha	Homo sapiens	gb AAG17549.1	(AF219114) chromatin remodelling factor SWI1Lalpha, binds dna non-specifically contains 1 arid domain. Human SNF/SWI 250 kDa protein is a homologue of Drosophila eyeld	Chromatin	DNA
67	4p1b2		HMG1	Gallus gallus	pir S22359	HIGH MOBILITY GROUP PROTEIN HMG1 binds preferentially single-stranded dna and unwinds double stranded dna.	HMG1/2 proteins	DNA
68	3p21h2		hypothetical protein DKFZp761D081	Homo sapiens	gi 8922165	hypothetical protein DKFZp761D081 137 aa weitere schlechte homologe zu mehreren Homeobox Proteinen	homeo domain transcription factor	DNA
69	3p22f10		Q61412	Mus musculus	gb BG020445.1	BG161411 dc50g08.y1 NICHD XGC Emb3 T7 Sequenzierung 3' similar to SW:CX10_MOUSE Q61412 HOMEBOX PROTEIN 745 0.0	homeo domain transcription factor	DNA
70	3P7C3		(AF109733)	Homo sapiens	gb AAD23390.1	(AF109733) SWI/SNF-related,, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin D1	Chromatin	Chromatin
71	3P7C10		HMG-17	Xenopus laevis	emb CAB75859.1	(AJ272075) high mobility group 17 protein (non histone chromosomal protein), nucleosomal binding protein altering the structure of the chromatin fiber and enhancing transcription, only from chromatin templates, released from chromatin in the absence of transcription	HMG16/17 Chromatin	Chromatin
72	3p21f12		BE189131	Xenopus laevis	gb BE189131.2	db62g09.x1 Wellcome CRC pSK egg Xen... similar to TR:Q15254 Q15254 PROTHYMOSIN potential a modulator of the interaction of histone 1 with chromatin, covalently linked to a small rna of about 20 nucleotides, nuclear, may mediate immune function by conferring resistance to certain opportunistic infections	Chromatin	Chromatin
73	3p4h7		HISTONE DEACETYLASE 1-2	Xenopus laevis	sp O42227	PROBABLE HISTONE DEACETYLASE 1-2 (HD1) [ gb AF020658.1 deacetylase (RPD3) mRNA]	DEACETYLASE	Chromatin
74	3p18g1		XCAP-C	Xenopus laevis	gi 1722855	CHROMOSOME ASSEMBLY PROTEIN XCAP-C REQUIRED FOR BOTH ASSEMBLY AND STRUCTURAL MAINTENANCE OF MITOTIC CHROMOSOMES	SMC FAMILY Chromatin	Chromatin
75	3p10g7		PROBABLE HISTONE DEACETYLASE 1-1 (HD1)	Xenopus laevis	sp Q91695	PROBABLE HISTONE DEACETYLASE 1-1 (HD1)	DEACETYLASE	Chromatin
76	3p8c1		WS-betaTRP	Homo sapiens	gb AAD28083.1	(AF056183) WS beta-transducin repeats protein	Transkriptions-regulation	Chromatin
77	3P7F1		SSXT PROTEIN	Homo sapiens	sp Q15532	SSXT PROTEIN (SYNOVIAL SARCOMA, TRANSLOCATED TO X CHROMOSOME) 387 aa could act as a modulator of transcription homology to Kruppel associated box, KRAB   ssx family. [1kb]	transcription repressor	Chromatin
78	3p4a5		KIAA1047	Homo sapiens	dbj BAA82999.1	(AB028970) KIAA1047 protein nuclear receptor co-repressor 1; THYROID HORMONE- AND RETINOIC ACID RECEPTOR-ASSOCIATED COREPRESSOR 1 mediates the transcriptional repression activity of some nuclear receptors by promoting chromatin condensation, thus preventing access of the basal transcription subunit; forms a large corepressor complex that contains sin3a/b and histone deacetylases hdac1 and hdac2. this complex associates with the thyroid (tr) and the	transcription repressor	Chromatin
79	3p21f3		TCF-3 CO-REPRESSOR CTBP	Xenopus laevis	gi 12229611	(TCF-3 CO-REPRESSOR CTBP) (XCTBP) CO-REPRESSOR TARGETING DIVERSE TRANSCRIPTION REGULATORS. INTERACTS WITH THE C-TERMINUS OF TCF-3 VIA THE CONSENSUS MOTIFS P-X-[DNS]-L-[STVA]. (POTENTIAL) NUCLEAR. LOCALIZED TO DISCRETE STRUCTURES DURING NEURULATION. THE PAT	transcription repressor	Chromatin
80	3p19b2		14-3-3 protein epsilon	Xenopus laevis	gb AF033311.1	Regulation of Histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localisation [alt : 14-3-3 protein epsilon mRNA, act as negative regulators of the mitotic inducer Cdc25 in Xenopus egg extracts]	Transkriptions-regulation	Chromatin

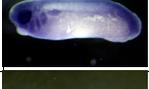
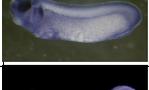
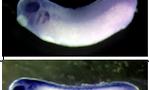
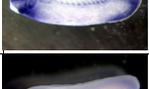
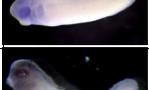
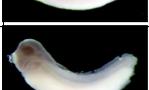
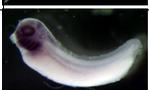
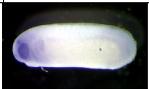
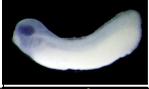
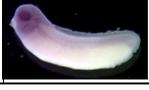
Blastx		Blast n		Blast EST		Revers Sequenziert	Yeast-Suche nach maximaler Sequenz	Signaturen	Signatur Bewertung	Aug	Kiemenbögen	Schwanzspitze	Hirn	Pronephros	Endoderm	Haftdrüse	Neuralrohr	Ohrplacode	Epidermis	Somiten	Notochord	Nerven	Herz	Proctodeum	Epiphyse	Nasenplacode	Hypophyse	Schlupfdrüse
E-Value	Score	E-Value	Score	e(bits)/E-Value	Scor					Au	Kb	Ss	Hi	Pn	En	Ce	Nr	Op	Ep	So	No	Ne	He	Pd	Pi	Np	Py	Ha
-	-	0,00E+00	1164	1,00E-89	329				6	5	5	4	5	0	1	3	5	2	1	1	1	2	2	6	5	5	5	
2,4E-56	322								5	5	6	3	3	0	0	1	2	2	1	1	1	2	6	2	1	2	1	
6,0E-04	45	1,00E-65	256	0.0	977				6	5	4	6	5	0	0	1	6	2	1	0	0	5	0	2	6	6	5	
2,9E+00	33	2,00E-55	222						6	6	6	6	5	0	1	1	6	2	3	1	1	6	1	2	6	6	6	
4,0E-70	265								6	6	4	6	6	1	1	2	6	2	4	2	4	1	1	2	6	6	6	
1,0E-29	130								6	6	6	2	6	0	0	1	4	1	2	1	1	4	3	2	4	2	4	
9,0E-81	300								6	5	4	5	4	0	0	2	4	1	1	0	2	1	2	0	4	3	2	
2,0E-14	80					keine signifik ante Homologie			6	6	6	3	4	0	1	1	4	1	1	1	1	2	1	1	1	3	3	
3,8E+00	33	2,10E-02	46	e-129	460	dc50g 08.x1 745 0.0			6	5	6	4	5	0	0	3	2	2	1	1	1	6	6	5	5	5	5	
2,0E-33	143								6	6	5	6	6	1	0	1	6	2	1	2	0	6	2	0	6	6	6	
1,0E-13	77	1,00E-102	379						6	6	5	3	5	0	0	0	3	2	1	0	0	4	3	0	2	3	5	
-	-	6,00E-03	48	e-157	553				6	6	6	6	6	0	1	6	6	1	2	1	1	6	6	6	6	6	6	
1,0E-115	414	0,00E+00	1178						6	5	3	5	0	0	0	0	4	0	1	0	0	1	0	0	4	4	3	
1,0E-39	163								6	6	6	6	6	0	0	1	6	1	4	1	1	6	2	2	6	6	6	
1,0E-131	469								6	6	5	5	3	1	0	0	4	2	1	1	1	2	1	1	5	5	2	
1,0E-86	319								6	6	3	5	6	1	0	2	6	2	1	1	2	4	2	5	6	5	5	
2,0E-92	339								6	6	5	6	5	0	0	3	3	2	1	0	0	3	3	0	4	4	4	
3,0E-75	282								6	6	5	5	4	1	0	2	4	2	1	0	0	2	2	0	5	4	4	
8,0E-80	297								6	5	5	5	4	0	1	1	4	1	1	1	1	2	1	2	2	2	2	
9,2E+00	31	1,00E-46	192						5	6	5	2	5	0	0	1	1	1	1	1	1	2	6	2	2	2	2	

Nr.	Kandidaten	Bild	ähnlichste(s)	Spezies	Zugriffsnummer	Beschreibung und Bemerkungen	spez. Funktion	Funktions-zuordnung
			Protein / RNA / DNA					
81	3p20h5		Q9NPJ1	Homo sapiens	Q9NPJ1	MKKS_HUMAN Q9NPJ1 MCKUSICK-KAUFMAN/BARDET-BIEDL SYNDROMES PUTATIVEIN. 570aa [FUNCTION] MAY PLAY A ROLE IN PROTEIN PROCESSING IN LIMB, CARDIAC AND REPRODUCTIVE SYSTEM DEVELOPMENT, AUTOSOMAL RECESSIVE	Chaperon	Chaperon
82	3p4b1		FK506-BINDING PROTEIN	Xenopus laevis	sp O42123	PPIASES ACCELERATE THE FOLDING OF PROTEINS.CIS-TRANS ISOMERIZATION OF PROLINE IMIDICPEPTIDE BONDS IN OLIGOPEPTIDES.	Chaperon	Chaperon
83	3p8h2		HEC	Homo sapiens	ref NP_006092.1	highly expressed in cancer, rich in leucine heptad repeats [TITLE HEC, a novel nuclear protein rich in leucine heptad repeats specifically involved in mitosis(M.C.B.17(10),6049-6056(1997) [2 kb highly expressed in cancer]	V-type ATPase 116kDa subunit family	cell cycle
84	3P7E3		APOPTOSIS INHIBITOR SURVIVIN	Homo sapiens	sp O15392	similar to SW:IAP4_HUMAN O15392 APOPTOSIS INHIBITOR SURVIVIN [IAP repeat-containing 5 (survivin)] [1 kb]	IAP-family	cell cycle
85	3p18a10		CDC47-2p	Xenopus laevis	gi 2231293	(U66710) CDC47-2p note="required for DNA replication; a component of a putative replication licensing factor; MCM family gene" [function: acts as a factor that allows the dna to undergo a single round of replication per cell; nuclear (by similarity).]	MCM family	cell cycle
86	3p4g2		KIAA1726	Homo sapiens	gi 12697997	(AB051513) KIAA1726 protein 624 AA. [1,2 kb Ist KIAA0615 nur ähnlich Klon ist Durchsequenziert]	-	-
87	3p12c11		Mab21	Xenopus laevis	gb AAF67175.1	(AF240183) MAB21L2 [TITLE Analysis of the vertebrate Mab21 genes suggests conserved biological roles] 359 aa	-	-
88	3p21d10		-	Unbekannt	-	-	-	-
89	3p13h11		AK022728	Homo sapiens	dbj BAB14208.1	(AK022728) unnamed protein product 192 aa	-	-
90	3p21e1		nucleolar phosphoprotein	Xenopus laevis	pir  I51618	nucleolar phosphoprotein	-	-
91	3p19a3		DKFZP564M2423 protein	Homo sapiens	ref XM_001389.1	DKFZP564M2423 protein evolutionär Konserviert bis C.e. [Kandidat da wurmfam8 homolog wie Kap3 -1,6 kb]	-	-
92	3p20c2		AW634714	Xenopus laevis	gb AW634714.1	bl24b03.w1 Blackshear/Soares normali...	-	-
93	3p6g11		ARS2	Homo sapiens	ref NP_056992.1	arsenate resistance protein ARS2; arsenite-resistance protein 2 (p-sort: 78.3 %: nuclear)	-	-
94	3p20f1		-	Unbekannt	-	-	-	-
95	3p21h12		-	Unbekannt	-	-	-	-
96	3p21e4		-	Unbekannt	-	-	-	-
97	3P7D5		BG161660	Xenopus laevis	gb BG161660.1	BG161660 de41g05.x1 Wellcome CRC pRN3 dorsal ...	-	-
98	3p19d3		AW637133	Xenopus laevis	bl54h03.w1	AW637133 bl54h03.w1 Blackshear/Soares normali... [blastx: gene for albumin including HP1 enhancer TITLE: Tissue-specificity of liver gene expression]	-	-
99	3p14e3		BF612543	Xenopus laevis	df08f10.y1	BF612543 df08f10.y1 Wellcome CRC pRN3 St13 17... [2 kb]	-	-
100	3p21a10		-	Unbekannt	-	-	-	-

Blastx		Blast n		Blast EST		Revers Sequenziertheit	Yeast-Suche nach maximaler Sequenz	Signaturen	Signatur Bewertung	Auge	Kiemebögen	Schwanzspitze	Hirn	Pronephros	Endoderm	Hafdrüse	Neuralrohr	Ohrplacode	Epidermis	Somiten	Notochord	Nerven	Herz	Proctodeum	Epiphyse	Nasenplacode	Hypophyse	Schlupfdrüse
E-Value	Score	E-Value	Score	e(bits)/E-Value	Scor								Au	Kb	Ss	Hi	Pn	En	Ce	Nr	Op	Ep	So	No	Ne	He	Pd	Pi
1,3E-50	535								6	6	6	6	6	0	1	4	6	1	4	1	1	1	1	4	6	6	6	6
1,0E-50	199								6	6	5	6	4	1	0	4	6	1	1	0	0	3	1	1	6	6	5	
8,0E-31	134	5,00E-03	48						6	5	4	5	5	1	0	1	6	1	1	1	1	3	1	1	5	4	4	
-	-	3,71E+04	38	3,00E-11	74	de90e01.x18350.0			6	6	5	6	6	0	2	4	6	1	1	0	0	6	5	3	6	6	6	
1,0E-114	410								6	5	6	5	4	0	1	1	5	1	1	1	1	2	6	2	4	4	1	
4,0E-82	306	3,10E-01	42					RCC1 ABC Ribo   Signaturen mit Consensus	6	6	4	5	3	0	0	5	4	0	0	0	0	2	3	1	4	6	4	
2,0E-21	103							ABC Ribo	6	5	3	6	6	1	0	2	6	1	1	0	4	2	1	0	6	4	3	
-	-	3,70E+04	40	3,00E-50	198	keine signifik ante Homologie		-	6	5	3	5	4	0	0	1	4	1	1	1	1	2	1	4	2	4	4	
4,0E-59	228					dd88c09.x18310.0		-	6	5	4	5	2	0	0	1	2	0	1	1	1	1	1	2	2	2	1	
1,0E-43	177	8,60E-02	44	e-169	593			ABC Ribo	6	6	5	6	4	0	1	2	5	1	1	1	1	6	1	2	6	6	6	
-	-	3,00E-72	278					RCC1 ABC Ribo   Gute Signaturen mit consensus (unvollständig)	6	6	5	4	3	0	0	1	5	1	2	1	1	2	1	2	5	3	3	
2,3E+00	33	8,60E-02	44	0.0	991	ref NP_009761.1  MCM3 protein homolog (S. cerevisiae); Cdc47p 28 1.8		-	6	6	6	6	6	5	0	4	5	2	1	1	4	5	4	4	6	6	6	
1,0E-50	200							RCC1 ABC Ribo Histon HMG (p-sort: 78.3 %: nuclear) Gute Sign.m.Homolog u.Sequenz	6	6	3	6	5	0	1	1	5	0	1	2	5	3	2	2	6	6	6	
9,9E-01	63	2,20E-02	46	2,00E-07	56	daa48h06.x1422e-117		-	6	5	6	3	3	0	2	1	5	1	2	1	1	1	1	2	4	5	5	
6,1E-01	35	8,60E-02	44	0.020	40	keine signifik ante Homologie	30 0.56	-	6	5	5	4	3	0	1	1	2	1	1	2	1	5	1	5	3	3	3	
-	-	2,50E-02	46	3,00E-10	66	daa31a11.x12623e-69		-	6	6	4	4	4	0	1	0	5	0	0	0	0	0	1	1	4	3	4	
1,8E+00	34	4,00E-10	72	0,00E+00	704			-	6	6	3	4	5	0	0	1	3	1	1	2	0	1	1	1	2	1		
-	-	7,00E-40	170	0.0	1013	ref NP_011840.1  Yhl023cp 28 1.6		ABC Ribo + ..... (kurze Seq; p-sort: 43.5 %: cytoplasmic 26.1 %: mitochondrial 13.0	6	6	5	3	1	1	0	1	5	1	3	1	1	4	1	2	5	3	4	
-	-	3,69E+04	40	0.0	735	ref NP_013454.1  Yir350wp 28 1.8		-	6	5	5	3	3	0	0	1	4	0	0	1	1	1	2	2	1	1	1	
8,3E+00	28	2,70E-01	42	0.19	36	dg18g02.y13357e-92		RCC1 Ribo kurzes peptid	6	6	5	5	4	0	1	1	6	1	2	2	1	2	1	6	6	6	6	

Nr.	Kandidaten	Bild	ähnlichste(s)	Spezies	Zugriffsnummer	Beschreibung und Bemerkungen	spez. Funktion	Funktions-zuordnung
			Protein / RNA / DNA					
101	3p4f4		-	Unbekannt	-	Kurzer guter Match   ribosomal protein L10; QM gene: DNA segment on chromosome X (unique) 648 expressed sequence [emb] AJ131847.1  XLA131847 Xenopus laevis mRNA for aquaporin function: forms a water-specific channel that provide kidney medullary collecting duct with high permeability to water, thereby permitting water to move in the direction of an osmotic gradient. may function as a water and urea exit mechanism in antidiuresis in collecting duct cells. also slightly	-	-
102	3p21e7		AF312865	Homo sapiens	gi 12017959	(AF312865) C1orf28 [nach P-Sort: bipartite: RRAATENIPVVRPRDK at 76; bipartite: KKQGCQRENETLIQRRK at 392]	-	-
103	3p10f6		-	Unbekannt	-	~1.6 kb	-	-
104	3p22f2		-	Unbekannt	-	-	-	-
105	3p20b11		AW646388	Xenopus laevis	gb AW646388.1	cm64d05.w1 Blackshear/Soares normali...	-	-
106	4p1g9		-	Unbekannt	-	-	-	-
107	3p4h4		AW637346	Xenopus laevis	bi57f03.w1	mehrere EST vorhanden	-	-
108	3p18f6		-	Unbekannt	gb BG163109.1	BG163109 df29c03.y1 Wellcome CRC pRN3 head	-	-
109	3p8e3		L32987.1	Pleurodeles waltlii	gb L32987.1	geringe Homologie	-	-
110	3p4d12		CG111103 gene product	Drosophila melanogaster	gb AAF48318.1	224 aa CG11103 gene product [Drosophila melanogaster].	-	-
111	3p11a6		-	Unbekannt	-	Unvollständig: YLQRKMADTDVDTTAEVPTKDLKEKVEVVEPEKAENGKEDAPNSNGKEENGTD HGAKNQDAEEDEEGDVEGEGED EEEEEGEGDENETDGLSVKRPAAEEEEETTKKOKTENGSTEVKESA [Expressionsmusteranalyse Es existieren 2 varianten mit similarity von ca. 95% geschätzt ~1 kb]	-	-
112	3P7G1		-	Unbekannt	-	-	-	-
113	3p22f9		p4.1 TFF gene	Xenopus laevis	emb AJ249176.1	Xenopus laevis partial p4.1 TFF gene, exon 5 [differentially expressed to its duplicated homolog xP4.2] EST: [gb BE575706.1 BE575706 dc62g05.x1 NICHDXGC 3' similar to gb gb AF139986.1 AF139986 Xenopus laevis cleavage and polyadenylation (XENOPUS)]	-	-
114	3p22c8		WDR 3	Homo sapiens	XP_001989	WD repeat-containing protein 3 [Celera :prs_protein hCP48116 /version_id=178000000506102 /len=954 /tran... 228 8e-60]	-	-
115	3P7E9		U23535.1	Xenopus laevis	gb U23535.1	-	-	-
116	3p2c4		RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE PROTEIN R1 CLASS I	Danio rerio	sp P79732	PROVIDES THE PRECURSORS NECESSARY FOR DNA SYNTHESIS. FIRST REACTION IN THE DNA REPLICATION PATHWAY. HETERODIMER OF A LARGE (M1) AND A SMALL CHAIN (M2) DEOXYRIBONUCLEOSIDE DIPHOSPHATE + OXIDIZED THIOREDOXIN + H2O = RIBONUCLEOSIDE DIPHOSPHATE + REDUCED THIOREDOXIN.	nucleic acid enzym	DNA
117	4p1e10		-	Unbekannt	-	> 1 kb	-	-
118	3P7B12		beta-B1 crystallin	Mus musculus	gb AAD42048.1	(AF106853) beta-B1 crystallin [dbj BAA76898.1  (D88186) beta B1 crystallin Xenopus 202 2e-51]	beta/gamma-crystallin family	-
119	3P7A2		-	Unbekannt	dbj BAB20070.1	(AB044946) NDRG4-H [ NDRG4, is specifically expressed in brain and heart]	-	-
120	3p21f8		-	Unbekannt	-	-	-	-

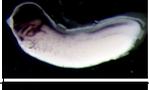
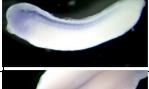
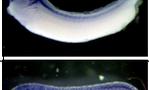
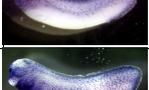
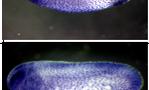
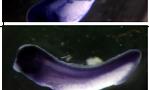
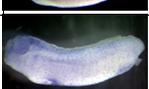
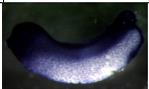
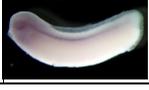
Blastx		Blast n		Blast EST		Revers Sequenziertheit	Yeast-Suche nach maximaler Sequenz	Signaturen	Signatur Bewertung	Aug	Kiemenbögen	Schwanzspitze	Hirn	Pronephros	Endoderm	Haftdrüse	Neuralrohr	Ohrplacode	Epidermis	Somiten	Notochord	Nerven	Herz	Proctodeum	Epiphyse	Nasenplacode	Hypophyse	Schlupfdrüse
E-Value	Score	E-Value	Score	e(bits)/E-Value	Scor					Au	Kb	Ss	Hi	Pn	En	Ce	Nr	Op	Ep	So	No	Ne	He	Pd	Pi	Np	Py	Ha
8,0E-04	45	3,00E-81	280						6	6	5	6	2	1	0	6	6	1	1	0	0	2	0	0	6	6	6	6
3,0E-67	255					de61e01.y111480.0		RCC1 ABC Ribo kurzes peptid 82.6 %: nuclear (34.8 %: mitochondrial 30.4 %: cytoplasmic 17.4	6	6	6	6	6	0	2	6	6	3	1	1	1	6	6	6	6	6	6	6
-	-	7,80E-02	44	3,71E+04	38			RCC1 Ribo; Kurzes Peptid	6	6	6	6	6	1	1	3	6	2	4	1	3	6	3	5	6	6	6	6
8,6E+00	32	1,00E-06	60	4,00E-12	72	keine signifik ante Homologie	27 4.7		6	5	6	6	6	0	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	6	5	6	6
-	-	7,40E+00	38	3,00E-46	190				6	6	6	6	4	0	1	5	5	1	1	1	3	5	1	6	6	6	6	6
-	-	-	-	4,00E-12	72				6	6	6	6	6	0	1	6	6	4	6	6	0	5	5	1	6	6	6	6
1,7E+00	34	2,80E-01	42	0.0	882	df72a07.x17140.0			6	6	6	6	6	1	0	6	6	5	1	6	0	6	6	6	6	6	6	6
-	-	2,50E-01	30	5,00E-28	121				6	6	6	6	6	0	1	6	6	3	1	1	4	6	4	6	6	6	6	6
7,0E-26	123					da87h11.y17080.0		Ribo	6	6	6	6	6	1	0	5	5	3	4	1	6	5	5	0	6	6	6	6
7,0E-38	157					dg10e01.y16740.0			6	6	5	6	6	0	0	4	6	5	1	0	0	6	4	0	6	6	6	6
-	-	5,00E-03	48	0.0	674	da29g02.x18210.0		RCC1 Ribo (69.6 %: nuclear 17.4 %: cyto-plasmic	6	6	6	6	6	1	0	3	6	2	2	1	5	6	5	0	6	6	6	6
4,7E+00	32	2,70E-01	42	0.029	39	keine signifik ante Homologie	[ref NP_011509.1  putative vacuolar Ca2+ ATPase; Pmc1p 27 2.3][ref NP_011971.1  involved in bud growth		6	6	6	5	6	0	0	6	6	4	1	0	0	6	5	0	6	6	4	4
-	-	2,00E-18	100	9,00E-51	200				6	6	6	6	5	0	0	4	4	2	1	1	1	5	3	1	6	2	6	6
3,0E-58	225							ABC (Ribo)	6	6	6	6	3	0	0	1	6	1	4	1	1	5	1	6	6	6	6	6
7,9E-02	38	1,00E-98	365	e-111	404				6	6	3	5	6	0	1	1	6	2	1	0	0	5	1	0	6	5	6	6
6,0E-41	155								6	3	0	3	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
5,7E+00	32	3,70E+04	40	0.13	42				6	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
8,0E-58	223								6	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
8,0E-21	69	1,00E-11	78	2,00E-63	242				6	3	3	4	2	0	1	1	3	1	1	0	1	1	2	1	2	3	2	2
-	-	2,10E-02	46	3,70E+04	34				5	4	2	4	4	0	1	1	3	1	1	1	1	2	1	1	1	3	1	

Nr.	Kandidaten	Bild	ähnlichste(s)	Spezies	Zugriffsnummer	Beschreibung und Bemerkungen	spez. Funktion	Funktions-zuordnung
			Protein / RNA / DNA					
121	3p15c5		-	Unbekannt	-	-	-	-
122	3p8b4		-	Unbekannt	-	1 kb	-	-
123	3p20h12		methionine adenosyltransferase II, alpha	Homo sapiens	gi 5174529	methionine adenosyltransferase II, alpha	Transferase	enzym
124	3p19b7		Pax6	Xenopus laevis	gb U77532.1	Pax6 mRNA ; Dorsoventrale Musterbildung, ZNS.	homeo domain transcription factor	DNA
125	3p15f4		KIAA1341 protein	Homo sapiens	gi 7243063	(AB037762) KIAA1341 protein 620 aa [gi 536926 gb AAA78270.1  (U13262) myelin gene expression factor ssDNA binding protein 186 2e-46]	transcription repressor	DNA
126	3p19g6		NEUROGENIC DIFFERENTIATION FACTOR 1	Xenopus laevis	Q91616	NDF1_XENLA NEUROGENIC DIFFERENTIATION FACTOR 1 352aa ; bHLH ==> Neuro D	bHLH transcription factor	DNA
127	3p18e6		-	Unbekannt	gb BG018000.1	dg31h04.x1 Xenopus laevis gastrula non normalized Xenopus laevis	-	-
128	3p21g7		Idx	Xenopus laevis	pir  51278	negative regulatory element Idx; Xidx, a dominant negative regulator of bHLH function in early Xenopus embryos	transcription repressor	-
129	3p13b9		Symplekin	Homo sapiens	ref NP_004810.1	Symplekin; Huntinglin interacting protein [analyses have revealed that the protein occurs in all these diverse cells in nucleoplasm, and only in those cells forming tight junctions is it recruited. function in the nucleus as well as in the plaques]	Cytosklett	Strukturprotein
130	3p1e1		targeting protein for Xkfp2; TPX2	Xenopus laevis	gb AAF81694.1	Cellcycle, Cytosklett  mediates binding of Xkfp2 to microtubules; stabilizes spindle poles; stage Oocyte	Cytosklett	Strukturprotein
131	3p1c6		U1 SNRNP A	Xenopus laevis	sp P45429	U1 SMALL NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN A (U1 SNRNP A PROTEIN) [Nuclear Import of the U1A Spliceosome Protein Is Mediated by Importin alpha /beta and Ran in living Mammalian Cells]	Eukaryotic RNA-binding region RNP-1 proteins	RNA
132	3p2h6		TRNA-RIBOSYL TRANSFERASE	Oryctolagus cuniculus	sp P40826	tRNA-GUANINE TRANSGLYCOSYLASE SYNTHESIZE QUEUOSINE (NUCLEOSIDE Q) BY THE IRREVERSIBLE BASE-FOR-BASE EXCHANGE OF QUEUINE (Q BASE) FOR GUANINE AT TRNA POSITION 34.	Transferase	RNA
133	3p1a6		(DKFZP564M2423), mRNA	Homo sapiens	ref NM_015640.1	DKFZP564M2423 protein (DKFZP564M2423), mRNA Length = 2201,PAI-1 mRNA-binding protein; actin binding LIM protein	-	RNA
134	3p4h3		(L10911) splicing factor	Homo sapiens	gb AAA16347.1	Putative splicing factor with RNA-binding domains and unique arginine/serine motif	SPLICING FACTOR	RNA
135	3p9e12		XFG 5-1 and XFG 5-2	Xenopus laevis	emb X71067.1	XFG 5-1 and XFG 5-2	zinc finger	RNA
136	3p4f3		(AF218007)	Homo sapiens	gb AAG17249.1	unknown protein Homo sapiens (HASJ4442), mRNA similar to putative methyltransferase   Titel: Novel Human cDNA clones with function of inhibiting cancer cell growth.	Transferase	enzym
137	3P7D10		DNA methyltransferase 1	Xenopus laevis	gb AAF06333.1	(AF192996) DNA methyltransferase 1	Transferase	DNA
138	3p19a2		SSB1	Xenopus laevis	emb X83673.1	X.laevis SSB1 gene ;mitochondrial protein; single-stranded DNA binding protein	ssb family	DNA
139	4p1d3		H2A	Homo sapiens	ref NP_036544.1	ref NP_036544.1  purine-rich element binding protein B (h2A histone family, member Z)	Histon	DNA
140	4p1f1		HIRA interacting protein 4	Homo sapiens	ref NP_005871.1	412 aa, HIRA interacting protein 4 (dnaJ-like) HIRA protein shares sequence similarity with Hir1p and Hir2p, the two corepressors of histone gene transcription(yeast); DnaJ molecular chaperone homology domain	DnaJ subfamily A	Chaperon

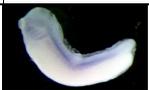
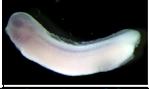
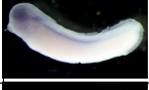
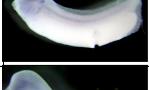
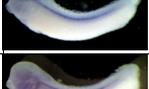
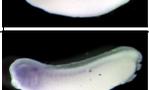
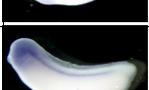
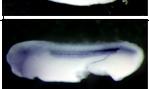
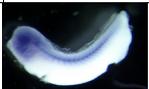
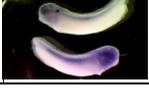
Blastx		Blast n		Blast EST		Revers Sequenziert	Yeast-Suche nach maximaler Sequenz	Signaturen	Signatur Bewertung	Aug	Kiemenbögen	Schwanzspitze	Hirn	Pronephros	Endoderm	Haftdrüse	Neuralrohr	Ohrplacode	Epidermis	Somiten	Notochord	Nerven	Herz	Proctodeum	Epiphys	Nasenplacode	Hypophyse	Schlupfdrüse
E-Value	Score	E-Value	Score	e(bits)/E-Value	Scor					Au	Kb	Ss	Hi	Pn	En	Ce	Nr	Op	Ep	So	No	Ne	He	Pd	Pi	Np	Py	Ha
9,0E-01	35	4,00E-04	52	2,00E-33	143				5	4	2	3	3	0	1	1	3	2	1	0	1	1	1	2	3	3	3	
5,2E+00	32	3,69E+04	40	0.39	40				6	5	2	2	5	1	0	3	4	1	4	2	3	1	5	1	2	2	2	
3,0E-13	77								6	5	4	4	1	1	1	1	3	1	1	1	1	2	3	5	3	3	3	
3,2E+00	38	9,00E-88	329						6	6	2	4	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	3	3	
7,0E-47	187					da07h 11.x1 577 e- 164			6	5	4	3	5	0	1	2	3	1	1	1	1	2	1	4	4	3	2	
6,9E-54	566								6	4	3	5	4	2	1	3	2	3	2	2	1	4	1	6	2	1	3	2
2,2E+00	34	9,80E-02	44	2,00E-97	355				6	4	4	3	2	0	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1	1	
2,0E-56	219								6	3	4	5	3	0	0	5	1	1	1	1	1	5	5	1	2	1	1	
8,0E-70	264								5	4	4	4	4	0	0	1	4	0	0	0	1	0	1	1	4	4	4	
3,0E-62	238								5	4	3	4	0	0	0	1	3	1	1	2	0	2	0	0	3	3	3	
7,0E-37	153								5	4	3	4	4	0	0	0	3	0	1	0	0	1	2	1	1	3	2	
1,0E-43	175								5	4	1	4	5	0	0	0	2	0	1	2	3	0	0	0	0	1	2	
2,0E-45	188								5	4	0	4	2	0	0	1	3	1	1	0	0	1	0	2	1	2	2	
4,0E-64	244								5	3	0	2	5	0	0	0	3	0	1	2	0	1	0	0	1	2	2	
3,7E+04	33	8,00E-49	200						5	2	1	2	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	2	2	1	
1,0E-47	189	1,00E-03	50						5	3	3	4	1	0	0	0	2	0	1	2	0	3	0	1	2	4	1	
1,0E-116	416	0,00E+00	1197						6	6	0	4	4	0	0	0	3	1	1	3	0	1	0	2	3	3		
-	-	3,00E-32	145						5	4	4	4	2	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
3,0E-56	219								6	2	0	1	3	0	0	0	3	0	1	2	0	1	1	1	1	1	1	
1,0E-91	336								5	3	3	3	4	0	0	0	4	1	1	1	0	1	1	1	2	2	1	

Nr.	Kandidaten	Bild	ähnlichste(s)	Spezies	Zugriffsnummer	Beschreibung und Bemerkungen	spez. Funktion	Funktions-zuordnung
			Protein / RNA / DNA					
141	4p1g7		tetratricopeptide repeat domain 2	Homo sapiens	ref NP_003306.1	tetratricopeptide repeat domain 2, DnaJ molecular chaperone homology domain	Chaperon	Chaperon
142	3p4h8		cullin 3	Homo sapiens	gb AAC36682.1	Human CUL-1, but not other cullin family members, selectively interacts with SKP1 to form a complex with SKP2 and cyclin A	cullin family	cell cycle
143	3p4f12		-	Unbekannt	-	2 kb	-	-
144	3P7A1		AW640554	Xenopus laevis	b 96d08.w1	EST's	-	-
145	3p8c5		-	Unbekannt	sp O14524	Kurzer perfekter stretch am Anfang HYPOTHETICAL PROTEIN KIAA0286 (HA6800) POTENTIAL Transmembrane region [2,7 kb]	-	-
146	3p10e8		XP_001712.1	Homo sapiens	ref XP_001712.1	novel putative protein similar to YIL091C yeast hypothetical 84 kD protein from SGA1-KTR7	-	-
147	3p4e2		-	Unbekannt	-	1,3 [kb]	-	-
148	3p10a4		-	Unbekannt	-	1 kb	-	-
149	3p4f10		-	Unbekannt	-	-	-	-
150	3p8e2		-	Unbekannt	-	2kb	-	-
151	3P7C1		-	Unbekannt	-	-	-	-
152	3p13b12		-	Unbekannt	-	2 kb	-	-
153	3p11f6		-	Unbekannt	-	-	-	-
154	3p10a12		(AE003524) CG6479 gene product	Drosophila melanogaster	gb AAF49357.1	ca. 500 Aa	-	-
155	3p4f11		nonsyndromic hearing impairment protein	Mus musculus	NP_061239	[bad sequence DATA --> homology o.k.] 512 aa DEFINITION nonsyndromic hearing impairment protein	-	-
156	3p1e10		-	Unbekannt	-	-	-	-
157	3p18f12		ubiquitin specific protease 8	Homo sapiens	gi 4827054	ubiquitin specific protease 8 1118 aa [putative Zell proliferationsregulationsfunktion]	UBIQUITIN Pathway	enzym
158	3P7F2		KIAA0874 protein	Homo sapiens	dbj BAA74897.1	(AB020681) KIAA0874 protein	-	-
159	3p6b10		-	Unbekannt	-	-	-	-
160	4p1f10		TUBULIN BETA 2 CHAIN	Xenopus laevis	sp P13602	TUBULIN BETA-2 CHAIN a nervous system-specific, class II beta-tubulin	tubulin group Cytosklett	Strukturprotein

Blastx		Blast n		Blast EST		Revers Sequenziert	Yeast-Suche nach maximaler Sequenz	Signaturen	Signatur Bewertung	Aug	Kiemenbögen	Schwanzspitze	Hirn	Pronephros	Endoderm	Haftdrüse	Neuralrohr	Ohrplacode	Epidermis	Somiten	Notochord	Nerven	Herz	Proctodeum	Epiphyse	Nasenplacode	Hypophyse	Schlupfdrüse
E-Value	Score	E-Value	Score	e(bits)/E-Value	Scor								Au	Kb	Ss	Hi	Pn	En	Ce	Nr	Op	Ep	So	No	Ne	He	Pd	Pi
4,0E-97	354								6	5	1	3	1	1	0	1	2	1	1	0	0	2	0	2	1	1	2	
1,0E-80	299								5	4	1	4	3	0	0	0	4	0	1	1	0	1	1	1	2	3	3	
3,3E+00	33	3,69E+04	40	0.096	42	df89b0 6.y1 654 0.0			5	4	3	4	3	0	0	0	6	1	1	0	0	5	2	6	6	3	5	
-	-	9,70E-01	40	1,00E-59	234				6	5	1	5	5	0	1	2	3	2	1	2	1	2	1	4	5	4	4	
2,0E-03	43	2,90E-01	42						6	5	2	5	5	1	0	2	5	2	2	2	2	2	1	1	2	3	3	
1,0E-114	371								5	4	5	4	1	1	0	2	4	1	2	4	2	1	2	2	4	4	2	
-	-	1,00E-03	50	9,00E-05	52				6	4	1	5	1	0	1	1	5	1	1	0	0	4	0	5	4	5	5	
-	-	2,00E-11	76	2,00E-12	78				6	4	1	5	3	0	1	1	5	1	0	1	1	1	1	2	3	4	6	
-	-	8,00E-06	56	3,00E-07	60				6	4	3	3	2	0	1	2	4	3	1	0	0	1	2	2	2	3	2	
3,3E+00	33	7,60E-02	44	4,00E-04	50	za40g 12.x1 196 2e-49			6	4	2	5	4	1	0	1	4	1	1	1	2	1	1	1	2	2	2	
-	-	2,10E-02	46	0.12	42	keine signifik ante Homolo gie			5	4	4	4	3	1	0	1	3	2	1	0	0	1	2	1	2	2	2	
-	-	2,30E-02	46	0.025	44	dab64 g02.x1 174 5e-43	ref NP_012745.1  Lst4p 28 1.8		5	4	3	4	4	0	0	0	4	0	0	0	1	1	1	1	3	2	2	
6,2E+00	32	7,80E-02	44	0.009	46				6	1	2	2	1	0	1	1	4	2	1	1	5	1	0	1	2	2	1	
3,0E-26	119	3,10E-01	42						6	2	0	5	0	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	2	3	2	2	
2,0E-11	70								5	5	1	3	3	0	0	1	2	0	1	0	0	1	1	1	2	2	2	
-	-	7,60E-02	44	0.10	42				5	3	1	3	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	2	1	2	1	
3,0E-73	275								1	1	0	1	1	0	5	1	5	0	1	2	1	1	1	1	1	1	1	
4,0E-20	99								4	3	3	2	1	0	5	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	
3,7E+00	33	-	-	0.034	44		ref NP_015064.1  medium subunit of the clathrin-associated ... 28 1.5		2	4	1	2	1	0	0	1	5	1	1	2	2	6	1	2	4	1	1	
1,0E-86	320								1	0	0	6	0	0	0	6	0	0	1	0	6	0	0	1	0	1	0	

Nr.	Kandidaten	Bild	ähnlichste(s)	Spezies	Zugriffsnummer	Beschreibung und Bemerkungen	spez. Funktion	Funktions-zuordnung
			Protein / RNA / DNA					
161	3p4g5		p75NTRa	Xenopus laevis	gb AF172400.1	AF172400 p75 neurotrophin receptor a-2 (p75NTRa) mRNA [Protein 55 1e-06 : gb AAC36357.1  (AF091342) neurofilament-M subunit Identities = 54/244 (22%), Positives = 101/244 (41%), Gaps = 18/244 (7%)]	receptor	Signaltransduktion
162	3p10a1		ALKYLDIHYDROXYACETONE PHOSPHATE SYNTHASE	Cavia porcellus	sp P97275	ALKYLDIHYDROXYACETONEPHOSPHATE SYNTHASE PRECURSOR (ALKYL-DHAP SYNTHASE) (ALKYLGLYCERONE-PHOSPHATE SYNTHASE)	synthase oder synthetasen	enzym
163	3p2g1		(AK027067)	Homo sapiens	dbj BAB15645.1	(AK027067) unnamed protein product [position-effect variegation Su(var) 3-9 homolog]	zinc finger Transkriptions-regulation	DNA
164	4p1c3		-	Unbekannt		1,6 kb	-	-
165	3p10a7		PHOSPHONEUROPROTEIN 14	Rattus norvegicus	sp Q63754	BETA-SYNUCLEIN (PHOSPHONEUROPROTEIN 14) [FUNCTION: MAY BE INVOLVED IN NEURONAL PLASTICITY.]	SYNUCLEIN FAMILY	-
166	4p1h3		tanabin	Xenopus laevis	gb M99387.1	A protein expressed in the growth cones of embryonic vertebrate neurons defines a new class of intermediate filament protein 1: Neuron 1992 Sep;9(3):417-28	INTERMEDIATE FILAMENT FAMILY	-
167	3p10h8		-	Unbekannt		-	-	-
168	3p15a4		TUBULIN ALPHA CHAIN	Xenopus laevis	emb CAA30093.1	(X07045) alpha-tubulin	tubulin group	Strukturprotein
169	3p11a11		tubulin-alpha	Macaca mulatta	gi 10881132	(AF141923) alpha-tubulin	tubulin group	Strukturprotein
170	3p22h3		Tubulin alpha 6	Mus musculus	gi 135424	tubulin alpha 6	tubulin group	Strukturprotein
171	3p19h9		cofilin 1	Xenopus laevis	gi 837295	XLU26270 Xenopus laevis cofilin 1 actin depolymerizing factor 388 aa	Cytoskelett	Strukturprotein
172	3p4f2		TUBULIN ALPHA CHAIN	Xenopus laevis	sp P08537	TUBULIN IS THE MAJOR CONSTITUENT OF MICROTUBULES. IT BINDS 2 MOLES OF GTP, ONE AT AN EXCHANGEABLE SITE ON THE BETA CHAIN AND 1 AT A NONEXCHANGEABLE SITE ON THE ALPHA-CHAIN. DIMER OF ALPHA AND BETA CHAINS. TUBULIN FAMILY.	tubulin group	Strukturprotein
173	4p1f2		tubulin alpha 1	Mus musculus	ref NP_035783.1	Six mouse alpha-tubulin mRNAs encode five distinct isotypes: Testis-specific expression of two sister genes JOURNAL Mol. Cell. Biol. 6, 2409-2419 (1986)	tubulin group	Strukturprotein
174	3p8c2		tubulin beta 5	Mus musculus	ref NP_035785.1	tubulin, beta 5 TUBULIN IS THE MAJOR CONSTITUENT OF MICROTUBULES	tubulin group	Strukturprotein
175	4p1f8		Arginine-rich protein	Homo sapiens	ref XP_002854.1	Arginine-rich protein	-	-
176	3p15b2		FERRITIN HEAVY CHAIN 1	Xenopus laevis	sp P17663	FERRITIN HEAVY CHAIN 1	ferritin family	iron storage
177	3p22d8		FERRITIN HEAVY CHAIN 2	Homo sapiens	sp P49948	FERRITIN HEAVY CHAIN 2 (XL2-17)	ferritin family	iron storage
178	4p1e5		iron storage protein H-ferritin	Trichosurus vulpecula	gb AAD38330.1	iron storage protein H-ferritin	ferritin family	iron storage
179	3p1d1		AW642277	Xenopus laevis	gb AW642277.1	[gb AW148070.1 ] 319 3e-85 XENOPUS_SOURCE_ID:xlnc001k14 3' similar to TR:O75822 O75822 EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR EIF3] EST name: cm16b06.w1 GenBank Acc: AW642277	eukaryotic translation factor	Translation
180	3p10e5		(AF092565)	Homo sapiens	gb AAC61776.1	U5 snRNP-specific protein (220 kD), ortholog of S. cerevisiae Prp8; splicing factor Prp8	SPLICING FACTOR	RNA

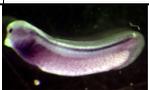
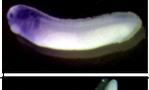
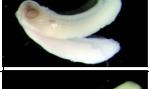
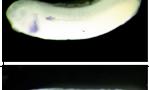
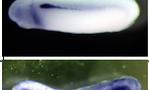
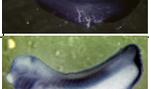
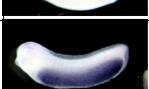
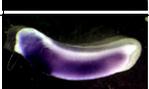
Blastx		Blast n		Blast EST		Revers Sequenziert	Yeast-Suche nach maximaler Sequenz	Signaturen	Signatur Bewertung	Aug	Kiemenbögen	Schwanzspitze	Hirn	Pronephros	Endoderm	Haftdrüse	Neuralrohr	Ohrplacode	Epidermis	Somiten	Notochord	Nerven	Herz	Proctodeum	Epiphyse	Nasenplacode	Hypophyse	Schlupfdrüse
E-Value	Score	E-Value	Score	e(bits)/E-Value	Scor					Au	Kb	Ss	Hi	Pn	En	Ce	Nr	Op	Ep	So	No	Ne	He	Pd	Pi	Np	Py	Ha
3,0E-06	53	9,00E-45	186						6	0	1	6	1	1	0	6	5	1	1	0	6	1	0	1	5	4	6	
7,0E-69	260								1	1	0	1	0	0	1	6	1	1	1	1	6	1	0	1	1	3	1	
1,0E-53	210								6	6	0	6	0	0	0	6	6	0	1	1	6	5	0	2	6	6	6	
-	-	1,80E-02	46	0.006	46				0	0	0	0	0	0	1	5	0	0	1	1	6	0	0	2	0	0	1	
2,0E-37	156								1	1	0	1	0	0	0	6	1	1	1	1	6	1	0	1	1	5	1	
2,4E+00	33	6,00E-18	98	0.38	40				1	1	0	5	0	3	0	5	0	1	1	0	6	1	1	1	1	1	1	
-	-	1,00E-06	60	5,00E-13	80				1	1	1	5	0	1	1	6	6	1	1	1	6	1	0	1	1	5	1	
4,0E-73	274	1,00E-163	581						5	2	0	3	1	0	0	4	3	4	1	1	1	1	1	2	3	1	1	
1,0E-132	473								4	3	2	2	2	1	1	1	2	5	1	1	2	3	3	6	3	4	2	
1,0E-117	421								2	4	1	2	1	0	0	1	1	5	1	1	1	6	5	2	1	3	1	
-	-	0,00E+00	771						6	2	0	5	1	0	0	1	4	5	1	1	2	3	4	3	2	3	3	
3,0E-70	264								6	6	1	6	2	0	1	6	6	1	1	1	6	5	0	6	6	6	6	
1,0E-109	395								6	5	6	6	6	1	0	6	6	3	1	1	0	5	0	6	6	6	6	
6,0E-43	174								6	6	6	6	6	1	1	6	6	2	4	1	6	6	6	5	6	6	6	
1,0E-38	160								3	2	2	1	5	2	0	3	3	4	1	0	0	1	2	2	5	3	6	
1,0E-97	356								2	1	1	1	1	0	1	1	1	4	1	1	6	1	1	1	1	1	5	
3,0E-89	328								3	2	1	1	1	2	3	1	2	3	1	1	1	1	6	1	1	2	5	
1,0E-65	249								6	6	6	6	6	0	6	6	6	5	1	6	0	6	6	6	6	6	6	
7,7E+00	31	7,00E-01	40	e-126	454				2	1	2	2	0	0	0	1	0	1	1	2	0	1	2	1	1	1	1	
1,0E-114	410								3	2	1	2	1	1	1	1	2	1	1	5	1	1	0	1	2	2	1	

Nr.	Kandidaten	Bild	ähnlichste(s)	Spezies	Zugriffsnummer	Beschreibung und Bemerkungen	spez. Funktion	Funktions-zuordnung
			Protein / RNA / DNA					
181	3p10h12		ADENOSYLHOMOCYSTEINASE 2	Xenopus laevis	sp O93477	ADENOSYLHOMOCYSTEINASE 2 (S-ADENOSYL-L-HOMOCYSTEINE HYDROLASE 2)	hydrolase	enzym
182	3p10g1		ribosomal transcription factor xUBF	Xenopus laevis	emb X65697.1	xUBF alpha gene, exons 6, 7, 8, 9 and 10 Length = 2802bp Variants of the Xenopus laevis ribosomal transcription factor xUBF are developmentally regulated by differential splicing   RNA polymerase I transcription factor   Variants of the Xenopus laevis ribosomal transcription factor xUBF are developmentally regulated by differential splicing   DNA-binding motif basic residues of ubfHMG box 1	ubfHMG box 1 transcription factor	DNA
183	3p10g10		EGR1	Xenopus laevis	gb AF250346.1	AF250346 Xenopus laevis early growth responseXenopus laevis early growth response protein 1 (egr1) gene [The Spemann organizer-expressed zinc finger gene Xegr-1 responds to the MAP kinase/Ets-SRF signal transduction pathway]	zinc finger	DNA
184	3p10b11		CIDE-A	Mus musculus	ref NP_031728.1	cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A , CIDE-A (CELL DEATH-INDUCING DFFA-LIKE EFFECTOR A)	cell cycle	cell cycle
185	3p10b10		-	Unbekannt	-	-	-	-
186	3p10d11		-	Unbekannt	-	-	-	-
187	3p10h1		AW640420	Xenopus laevis	gb AW640420	EST: AW640420	-	-
188	3p10h9		(AL035289) hypothetical protein	Homo sapiens	emb CAA22893.1	(AL035289) hypothetical protein 781 aa	-	-
189	3p11g6		AB015330	Homo sapiens	dbj BAA34789.1	Hypothetisches Protein (AB015330) HRIHFB200	-	-
190	3p6g6		zinc finger protein 147	Homo sapiens	ref NP_005073.1	zinc finger protein 147 (estrogen-responsive finger protein); Zincfinger protein-147 ; RING finger, coiled-coil domains	zinc finger	-
191	4p1d1		-	Unbekannt	-	-	-	-
192	3p10b6		-	Unbekannt	-	-	-	-
193	3p10d3		-	Unbekannt	-	-	-	-
194	3p10h5		-	Unbekannt	-	-	-	-
195	3p20c3		-	Unbekannt	-	-	-	-
196	3p10f10		lamin B1	Xenopus laevis	gb AAC31543.1	(AF077838) lamin B1; lamins are components of the nuclear lamina, a fibrous layer on the nucleoplasmic side of the inner nuclear membrane, which is thought to provide a framework for the nuclear envelope and may also interact with chromatin	intermediate filament family nuclear lamina	Strukturprotein
197	3p10c4		EG5	Xenopus laevis	sp P28025	KINESIN-RELATED MOTOR PROTEIN EG5 [DEVELOPMENTAL STAGE: EGG MATURATION. IS NO LONGER SYNTHESIZED SOON AFTER FERTILIZATION]	spindle protein Cytosklett	Strukturprotein
198	3p6h5		disabled	Homo sapiens	ref XP_002049.1	disabled (Drosophila) homolog 1	phosphoprotein	Signaltransduction
199	3p10g11		(AC004982)	Homo sapiens	gb AAC31788.1	(AC004982) similar to yeast hypothetical protein ybk4 379 aa	-	-
200	3p11g7		-	Unbekannt	-	-	-	-

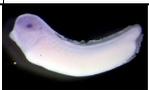
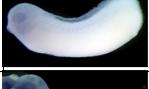
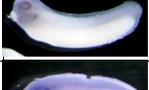
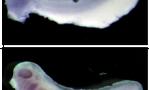
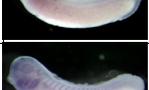
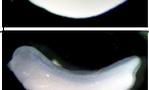
Blastx		Blast n		Blast EST		Revers Sequenziert	Yeast-Suche nach maximaler Sequenz	Signaturen	Signatur Bewertung	Aug	Kiemenbögen	Schwanzspitze	Hirn	Pronephros	Endoderm	Haftdrüse	Neuralrohr	Ohrplacode	Epidermis	Somiten	Notochord	Nerven	Herz	Proctodeum	Epiphyse	Nasenplacode	Hypophyse	Schlupfdrüse
E-Value	Score	E-Value	Score	e(bits)/E-Value	Scor					Au	Kb	Ss	Hi	Pn	En	Ce	Nr	Op	Ep	So	No	Ne	He	Pd	Pi	Np	Py	Ha
1,0E-113	406								1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5	1	1	0	1	1	1	1
-	-	9,00E-85	319						2	2	1	2	2	1	1	1	4	1	1	5	1	1	0	1	2	2	1	
-	-	0,00E+00	1106						2	2	1	1	1	1	1	1	4	1	1	5	1	1	0	1	2	2	1	
6,0E-48	191								0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	5	1	1	0	1	0	0	0	
3,4E+00	33	3,10E-01	42	0.027	44				0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	5	1	1	0	0	0	0	1	
3,3E-01	36	2,00E-14	86	3,00E-27	127				2	2	1	1	1	1	1	1	5	1	1	5	1	1	0	1	1	1	1	
4,7E+00	32	2,00E-02	46	e-153	545				2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5	1	1	1	1	2	1	1	
9,0E-18	91	3,69E+04	40						1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	6	1	1	0	3	1	1	1	
5,0E-05	49								2	3	1	2	1	1	1	1	2	1	2	6	3	1	0	1	2	2	1	
2,0E-26	120								2	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	5	1	0	0	1	1	1	1	
4,0E+00	32	2,80E-01	42	0.095	42				4	2	0	1	2	0	0	1	2	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1	
8,0E+00	32	7,90E-02	44	0.58	40				0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	5	1	1	0	1	1	1	1	
-	-	3,69E+04	40	0.14	42				2	2	1	2	1	1	0	1	5	1	1	5	1	1	0	1	2	1	1	
2,1E+00	33	3,10E-01	42	0.42	40				2	2	1	2	0	1	1	1	2	1	1	5	1	1	0	1	2	1	1	
-	-	3,80E-01	42	0.25	36				1	1	0	2	1	0	1	1	2	0	0	6	1	1	0	1	1	1	1	
2,0E-56	219	0,00E+00	1168						6	3	2	3	2	1	0	2	3	1	2	5	2	0	1	2	3	3	2	
7,0E-99	360								6	4	2	4	2	1	1	1	4	1	2	5	1	1	0	1	2	3	3	
4,0E-68	258								4	3	1	2	1	0	1	2	4	0	2	5	2	0	0	2	4	3	1	
4,0E-78	291								3	2	1	2	1	1	1	1	2	1	1	6	1	1	0	2	2	2	1	
5,6E-01	35	7,90E-02	44	0.54	40				5	3	1	4	0	1	1	1	6	1	3	6	5	1	0	1	2	2	2	

Nr.	Kandidaten	Bild	ähnlichste(s)	Spezies	Zugriffsnummer	Beschreibung und Bemerkungen	spez. Funktion	Funktions-zuordnung
			Protein / RNA / DNA					
201	3p10f1		KIAA1564	Homo sapiens	dbj BAB13390.1	(AB046784) KIAA1564 protein 1417 aa BLAST P Result Identities = 62/96 (64%), Positives = 80/96 (82%), Gaps = 1/96 (1%) [D.m. <b>KISMET</b> is required for both segmentation and segment identity]	transcription repressor	-
202	3p12a11		-	Unbekannt	-	-	-	-
203	3p8d3		-	Unbekannt	-	1,6 kb	-	-
204	3p10c7		REM 1 sequence	Xenopus laevis	emb X00678.1	REM 1 sequence	-	-
205	3P7F3		-	Unbekannt	-	-	-	-
206	3p10c6		-	Unbekannt	-	-	-	-
207	3p10a10		-	Unbekannt	-	0,9 kb	-	-
208	3p10b12		BE507779	Xenopus laevis	dc22f04.y1	NICHD XGC Li1	-	-
209	3p4c11		-	Unbekannt	gb AW644926.1	AW644926 cm47a05.w1 Blackshear/Soares normali...	-	-
210	3p8a1		-	Unbekannt	-	-	-	-
211	3p10b5		-	Unbekannt	-	-	-	-
212	3p6a1		COP-COATED VESICLE MEMBRANE PROTEIN P24	Cricetulus griseus	sp P49020	COP-COATED VESICLE MEMBRANE PROTEIN P24 PRECURSOR	vesikulärer Transport	vesikulärer Transport
213	3p8f3		otx-2	Xenopus laevis	gb AAB34353.1	(U19814) orthodenticle 2 Axis Formation (?)	homeo domain transcription factor	DNA
214	3p4f7		Hypothetical protein HES6	Homo sapiens	ref NP_061115.1	hypothetical protein HES6 [hairy and enhancer of split 6, (Drosophila) [Mus musculus] bHLH   [1,7 kb]	bHLH transcription factor	DNA
215	3p21a6		AW640241	Xenopus laevis	gb AW640241.1	bl92g09.w1 Blackshear/Soares normali... 476 e-132 [b BF611761.1 BF611761 de88d04.y1 Wellcome CRC pRN3 St19 26... 450 e-124   SYT INTERACTING PROTEIN SIP]	-	-
216	3p8h1		nrp-1B	Xenopus laevis	gb M34895.1	nervous system-specific RNA-binding protein (nrp-1B) mRNA	-	RNA
217	3P7G2		ATONAL PROTEIN HOMOLOG 3	Xenopus laevis	sp P79920	ATONAL PROTEIN HOMOLOG 3 (HELIX-LOOP-HELIX PROTEIN XATH-3) (XATH3) [APPEARS TO MEDIATE NEURONAL DIFFERENTIATION.]	bHLH Transkriptions-regulation	DNA
218	3p21b12		LIM domain-containing homeodomain LH-2A	Gallus gallus	pir JC5657	pir JC5657 LIM domain-containing homeodomain LH-2A [This protein plays a role in the determination and specification of the proximal-distal and anterior-posterior positional values, respectively.]	homeo domain transcription factor	DNA
219	4p1e1		EST name: cm34d08.w1 GenBank Acc: AW643835	Xenopus laevis	gb AW643835.1	[2,4 kb incl. Bam H I oder Xho I Schnittstelle ]	-	-
220	3p10f3		AW635901	Xenopus laevis	gb AW635901.1	ESTs: AW635901; AW645788	-	-

Blastx		Blast n		Blast EST		Revers Sequenziert	Yeast-Suche nach maximaler Sequenz	Signaturen	Signatur Bewertung	Aug	Kiemenbögen	Schwanzspitze	Hirn	Pronephros	Endoderm	Haftdrüse	Neuralrohr	Ohrplacode	Epidermis	Somiten	Notochord	Nerven	Herz	Proctodeum	Epiphyse	Nasenplacode	Hypophyse	Schlupfdrüse
E-Value	Score	E-Value	Score	e(bits)/E-Value	Scor					Au	Kb	Ss	Hi	Pn	En	Ce	Nr	Op	Ep	So	No	Ne	He	Pd	Pi	Np	Py	Ha
3,0E-27	122	5,00E-03	48	1,00E-04	52		ref NP_014948.1  ATPase component of a two subunit chromatin rem... 144 2e-34		4	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5	1	1	0	2	2	1	2
6,2E+00	32	2,00E-08	66	0.14	42				4	4	0	3	1	1	1	1	6	1	1	5	3	1	0	1	2	2	2	2
5,6E+00	32	3,69E+04	40	0.002	48		emb CAB57250.1  (AJ270223) putative ubiquitin carrier [Ento... 40 0.094		6	6	1	6	6	1	1	2	6	1	2	5	2	4	0	6	5	6	6	6
7,7E+00	32	1,00E-31	143						5	3	0	2	1	1	1	1	3	1	1	5	1	1	0	2	3	2	1	1
2,8E+00	33	3,10E-01	42	1,70E+00	38				2	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	6	0	0	0	0	1	1	1	1
-	-	3,00E-10	72	8,00E-25	119				5	2	0	2	1	0	1	1	2	1	1	6	1	1	0	1	2	2	2	2
-	-	3,00E-10	72	0.11	42				5	4	1	4	1	1	1	2	4	0	2	6	2	1	0	2	2	2	2	2
4,3E-01	36	7,90E-02	44	e-168	595				5	4	1	2	1	1	1	1	3	1	2	5	1	1	0	1	4	1	1	1
2,1E+00	34	2,00E-08	66	1,00E-150	531				5	2	0	1	0	0	0	0	1	0	1	4	0	1	0	2	1	1	1	1
-	-	5,30E-01	40	3,70E+04	38				6	4	1	6	3	1	1	1	6	1	2	5	3	2	0	5	6	6	4	4
6,2E+00	32	5,00E-03	48	4,00E-48	196				6	5	3	6	2	1	1	2	4	1	3	5	1	1	0	2	6	6	4	4
2,0E-83	309								2	2	0	2	5	0	5	1	4	0	2	6	2	1	0	2	3	1	1	1
8,0E-09	61	1,00E-157	559						6	0	0	6	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	6	1	1	1	1
3,0E-45	182								4	0	3	5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	5	0	1	1	1
-	-	3,60E-01	42	e-132	476				6	1	0	6	3	0	0	2	1	0	1	2	1	1	0	6	0	1	0	0
2,0E-05	50	1,00E-145	521						6	0	1	3	0	0	0	4	5	1	0	1	1	1	1	6	2	2	1	1
2,0E-75	283								6	5	0	5	5	0	0	0	5	0	1	5	1	6	0	6	5	5	5	5
6,0E-31	135	5,00E-37	161						6	4	0	5	1	0	1	1	4	0	1	2	1	2	0	6	2	5	5	5
4,3E+00	32	1,00E-03	50	0.0	708				2	5	6	4	3	0	0	3	2	4	1	0	0	5	3	1	1	6	1	1
8,6E-02	38	3,10E-01	42	0.0	965				3	3	1	2	0	1	1	1	4	1	1	1	1	1	0	6	2	2	1	1

Nr.	Kandidaten	Bild	ähnlichste(s)	Spezies	Zugriffsnummer	Beschreibung und Bemerkungen	spez. Funktion	Funktions-zuordnung
			Protein / RNA / DNA					
221	3p12b6		syntrophin, beta 2	Homo sapiens	ref XP_007836.1	dystrophin-associated protein	-	-
222	3p19e3		-	Unbekannt	-	3p19e3_a ; 3p19e3_b	-	-
223	3p19c10		BF614695	Xenopus laevis	dg16g02.y1	dg16g02.y1 Xenopus laevis gastrula n...	-	-
224	3p11b1		AW633329	Xenopus laevis	gb AW633329.1	AW633329 bl06d09.w2 Blackshear/Soare	-	-
225	3p4h6		pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase	Xenopus laevis	pir  51697	pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase XDCoH; dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1-alpha homeodomain protein transregulator; phenylalanine hydroxylase-stimulating protein PHS/PCD	dehydratase	enzym
226	3p13b1		BF231815	Xenopus laevis	df07b03.x1	df07b03.x1 Wellcome CRC pRN3 St13 17 egg animal cap cDNA clone IMAGE:3556541 3'. [Signal tritt auf bei Pharyngalendoderm und Pronephros (über dem Herz)]	-	-
227	3p18g8		Ndr1	Mus musculus	gi 6754810	N-myc downstream regulated 1 (DIFFERENTIATION-RELATED GENE 1 PROTEIN)	-	-
228	3p22g1		-	Unbekannt	-	-	-	-
229	3p4e10		creatine kinase (EC 2.7.3.2) isozyme IV	Xenopus laevis	pir A60098	Phosphotransferase, maternally derived CK-IV isoform persists far beyond the degradation of its maternal mRNA and into the zygotic expression period	Transferase	enzym
230	3p1a10		ANNEXIN VI (LIPOCORTIN VI) (P68) (P70) (PROTEIN III) (CHROMOBINDIN)	Bos taurus	sp P79134	MAY ASSOCIATE WITH CD21, REGULATE THE RELEASE OF CA(2+) FROM INTRACELLULAR STORES. CONTAINS EIGHT HOMOLOGOUS REPEATS --> ANNEXIN FAMILY PHOSPHORYLATED IN RESPONSE TO GROWTH FACTOR STIMULATION (BY SIMILARITY). SEEMS TO BIND ONE ION WITH HIGH AFFINITY. calcium/phospholipid-binding protein which promotes membrane fusion and is involved in exocytosis.	ANNEXIN FAMILY	ANNEXIN VI
231	3p4g8		CYTOCHROME C OXIDASE POLYPEPTIDE I	Xenopus laevis	gb AAA66460.1	TERMINAL STEP IN THE RESPIRATORY CHAIN. KEYWORDS Oxidoreductase; Heme; Copper; Mitochondrion; Transmembrane; Respiratory chain; Inner membrane.	heme-copper respiratory oxidase family	RESPIRATORY CHAIN
232	4p1h5		CYTOCHROME B	Xenopus laevis	sp P00160	CYTOCHROME B COMPONENT OF THE UBIQUINOL-CYTOCHROME C REDUCTASE	RESPIRATORY CHAIN	RESPIRATORY CHAIN
233	3P7D4		-	Unbekannt	-	[Ähnlich dem Expressionsmuster von distalless 2 Homolog]	-	-
234	3p1a9		hypothetical protein FLJ10142 (304 As)	Homo sapiens	ref NP_060478.1	2 kb	-	-
235	3p4b11		CREATINE KINASE	Gallus gallus	sp P70079	[schlechte Sequenzdaten --> Homologie o.k.] ATP + CREATINE = ADP + PHOSPHOCREATINE MITOCHONDRIAL PRECURSOR (J-MTCK)	kinase	enzym
236	3p11e8		-	Unbekannt	-	-	-	-
237	4p1b1		AW147681	Xenopus laevis	da15h02.y1	-	-	-
238	3p4g3		EXOSTOSIN-1	Mus musculus	sp P97464	APPEARS TO BE A TUMOR SUPPRESSOR.TYPE II MEMBRANE PROTEIN. ENDOPLASMIC RETICULUM (BY SIMILARITY)	exostosin family	-
239	3p2d8		RNA helicase Gu - human (fragment)	Homo sapiens	pir  PC6010	-	HELICASE	RNA
240	3p4a7		RNA POLYMERASE II, ELONGATION FACTOR	Homo sapiens	ref NP_036213.1	ELL-RELATED RNA POLYMERASE II, ELONGATION FACTOR	nucleic acid enzym	RNA

Blastx		Blast n		Blast EST		Revers Sequenziert	Yeast-Suche nach maximaler Sequenz	Signaturen	Signatur Bewertung	Aug	Kiemenbögen	Schwanzspitze	Hirn	Pronephros	Endoderm	Haftdrüse	Neuralrohr	Ohrplacode	Epidermis	Somiten	Notochord	Nerven	Herz	Proctodeum	Epiphyse	Nasenplacode	Hypophyse	Schlupfdrüse
E-Value	Score	E-Value	Score	e(bits)/E-Value	Scor					Au	Kb	Ss	Hi	Pn	En	Ce	Nr	Op	Ep	So	No	Ne	He	Pd	Pi	Np	Py	Ha
1,0E-48	193								2	6	4	2	4	1	0	6	5	5	1	2	4	6	1	0	2	6	1	
-	-	8,90E-02	44	0.22	36				6	5	5	2	2	1	0	2	4	1	1	2	5	2	2	2	2	6	2	
3,3E+00	33	2,30E-02	46	e-136	490				5	4	5	3	3	0	0	0	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	3
-	-	7,90E-02	44	0.0	1120				5	4	1	3	1	1	1	1	5	1	1	2	3	1	2	1	3	5	1	
3,0E-37	155								5	0	0	3	6	0	0	0	0	0	1	0	4	0	0	0	0	2	1	
2,0E-09	64	3,40E-01	42	2,00E-96	357				0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	1	0	6	0	0	0	1	0	
7,0E-92	337	3,00E-23	115						1	3	0	1	6	0	1	1	1	1	0	1	4	1	3	0	1	1	1	1
-	-	3,70E+04	40	0.019	40				2	6	1	0	6	1	0	1	1	2	1	1	1	6	2	1	1	1	1	
2,0E-99	362								5	0	0	2	1	0	4	1	2	0	6	5	0	5	0	0	0	0	2	1
5,0E-44	177								0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
2,0E-56	219								6	6	6	6	6	0	4	6	6	6	6	1	6	0	6	6	6	6	6	6
1,0E-102	370								2	5	5	2	3	1	0	3	1	3	1	1	0	0	1	6	2	1	2	4
-	-	2,40E-02	46	0.11	42				5	6	0	0	0	0	0	0	0	6	0	1	1	1	0	0	0	6	5	4
6,0E-41	167	1,40E-02	46						0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	2	0	0	2	0	6	1	
2,0E-14	79								0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3,2E+00	33	7,40E-01	40	1,90E+00	38				2	6	0	2	6	6	0	1	5	0	1	0	0	6	0	0	2	1	1	
-	-	3,00E-01	42	e-160	567	da15h 02.x1 971 0.0			6	6	6	6	5	3	2	2	6	5	1	6	0	6	6	6	6	6	6	6
4,0E-29	127								6	6	2	5	3	0	0	0	3	0	1	0	0	1	1	0	4	3	3	
9,0E-21	100								3	3	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	
6,0E-23	106								2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1

Nr.	Kandidaten	Bild	ähnlichste(s)	Spezies	Zugriffsnummer	Beschreibung und Bemerkungen	spez. Funktion	Funktions-zuordnung
			Protein / RNA / DNA					
241	3p9e7		NADH dehydrogenase subunit 5	Xenopus laevis	ref NP_008144.1	ND5_10422 NADH dehydrogenase subunit 5	dehydrogenase	enzym
242	3p9b11		NADH dehydrogenase	Homo sapiens	ref NP_004997.1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein	dehydrogenase	enzym
243	3p4f5		transcription elongation factor TFIIIS	Xenopus laevis	emb X97660.1	xTFIIIS.oA gene, exon 3	zinc finger transcription factor	DNA
244	3p10e4		TXz.1 transposase pseudogene	Pleuronectes platessa	gb U43659.1	[transposase emb CAB51372.1  Schwacher Match zieht sich durch die ganze Familie] [gb U43659.1 XLU43659 Xenopus laevis transposon TXz.1 transposase pseudogene]	Transposase	DNA
245	3p4b12		HOMEBOX PROTEIN SMOX-3	Schistosoma mansoni	sp Q26602	Match über die Homeobox (S.C. Homeobox-domain containing transcription factor) ==> Homeobox mit strengstem Consensus zu Helix (3/4 Consensus von Homeobox Genen [3kb]	homeo domain transcription factor	DNA
246	4p1f5		heterochromatin protein 1 gamma	Xenopus laevis	gb AAC60299.1	TITLE Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes Cell 91(3),311-323(1997)	Chromatin	Chromatin
247	3p1e6		AW645913	Xenopus laevis	cm58g11.w1	[2 kb]	-	-
248	3p13g10		-	Unbekannt	-	-	-	-
249	4p1b3		AW636607	Xenopus laevis	gb AW636607.1	bl48f10.w1   Frame in guter Qualität [1.] Identities = 41/184 (22%), Positives = 78/184 (42%), Gaps = 10/184 (5%) [2.] Identities = 31/131 (23%), Positives = 59/131 (44%)  [3.]D-Titin [Drosophila melanogaster] Protein 2 Mda	-	-
250	3P7A12		AW640142	Xenopus laevis	AW640142	AW640142 bl91g07.w1 EST's	-	-
251	3P7A4		-	Unbekannt	-	-	-	-
252	3p1b3		FLJ00069	Homo sapiens	dbj BAB15766.1	(AK024476) FLJ00069 protein	-	-
253	3p4e12		-	Unbekannt	-	[schlechte Sequenz evtl gb U81291.1 ] oviductin mRNA, the X.I. oviductal protease that processes egg envelope glycoprotein gp43, increases sperm binding to envelopes and is translated as part of an unusual mosaic protein composed of two protease and several CUB domains	-	-

Blastx		Blast n		Blast EST		Revers Sequenziert	Yeast-Suche nach maximaler Sequenz	Signaturen	Signatur Bewertung	Aug	Kiemenbögen	Schwanzspitze	Hirn	Pronephros	Endoderm	Haftdrüse	Neuralrohr	Ohrplacode	Epidermis	Somiten	Notochord	Nerven	Herz	Proctodeum	Epiphyse	Nasenplacode	Hypophyse	Schlupfdrüse
E-Value	Score	E-Value	Score	e(bits)/E-Value	Scor					Au	Kb	Ss	Hi	Pn	En	Ce	Nr	Op	Ep	So	No	Ne	He	Pd	Pi	Np	Py	Ha
4,0E-88	325								5	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	2	2	1
1,0E-85	317								4	4	2	4	1	2	0	2	4	3	1	2	2	4	3	0	5	4	4	
-	-	1,00E-34	153						5	3	0	3	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	2	0	2	2	3	1
2,5E-01	37	1,00E-74	285						4	3	2	3	1	1	1	1	2	2	2	5	1	1	1	2	3	3	2	
7,6E-02	38	7,50E-02	44	0.099	42				2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	
3,0E-52	205								5	5	2	1	2	0	0	0	1	0	1	1	0	0	3	0	1	2	2	2
2,0E+00	32	1,70E-01	42	0.0	928				5	4	2	3	2	0	0	0	2	0	1	1	0	0	1	2	1	1	1	1
-	-	2,00E-14	86	8,00E-15	86		rel NP_013413.1  regulatory protein of adenylate cyclase; C... 28 1.4		5	5	4	4	3	1	0	1	4	1	1	1	1	1	1	1	2	3	3	3
1,0E-02	41	2,70E-01	42	0.0	654				4	2	2	2	1	0	0	1	3	1	1	1	0	0	1	0	2	1	2	1
-	-	7,50E-02	44	0.0	866				3	4	1	1	2	1	0	1	3	1	1	2	0	1	1	0	1	1	1	1
-	-	3,10E-01	42	3,71E+04	38				2	4	2	2	2	0	0	0	3	1	1	0	0	1	1	2	1	2	1	
7,0E-64	240								1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
-	-	2,00E-04	52	42 0.069					0	0	0	0	0	0	1	4	0	0	1	1	5	0	0	2	0	0	1	

**Tabelle 13: Auszug aus der Rohdatentabelle zur Durchmusterung einer cDNA Bank aus embryonalem Augengewebe.**

Die Expressionsstärken der analysierten Klone in den verschiedenen embryonalen Geweben wurden entsprechend ihrer Intensität mit den Zahlen 1 bis 6 bewertet (1: sehr schwach, 2: schwach, 3: mittlere Expressionsstärke, 4: stärkere Expression, 5: starke Expression und 6: sehr starke Expression). Anhand der so erhaltenen Expressionsmatrix wurden die Klone nach verschiedenen Vektoren (Tabelle 14), die die Karyopherin  $\beta 3$  Synexpressionsgruppe definieren, in aufeinanderfolgenden Durchgängen sortiert. Nachdem die Karyopherin  $\beta 3$  Synexpressionsgruppe abgegrenzt wurde, erfolgte zur besseren Übersicht ein Sortierschritt nach der zugeordneten Funktion. Die Funktionszuordnung erfolgte auf der Grundlage von Sequenzhomologien der partiell sequenzierten Klone zu Sequenzen aus Protein- und Nukleotiddatenbanken. Mit Klonen, die andere Expressionsmuster zeigten, wurde mit geeigneten Vektoren (Tabelle 15) entsprechend verfahren. Klone die mit diesem Verfahren nicht eingeordnet werden konnten wurden manuell sortiert. Die ersten 115 Klone wurden der Karyopherin  $\beta 3$  Synexpressionsgruppe zugeordnet. Die restlichen Klone zeigen ein anderes Expressionsmuster.

Vektor I	Vektor II	Vektor III
Au, Kb, Ss, Hi, En, Ce	Au, Kb, Ss, Hi, Pn, En, Ce, Nr	Au, Kb, Ss, Hi, Pn, Op, Pi, Np, Ha, En, Ce, Nr, Ep, So, He, Pd, Pi

**Tabelle 14: Zur Gruppierung der Karyopherin  $\beta 3$  Synexpressionsgruppe verwendete Vektoren.**

Für die Bezeichnung der verschiedenen Gewebe wurden folgende Abkürzungen verwendet: Au, Auge, Kb, Kiemenbögen, Ss, Schwanzspitze, Hi, Gehirn, Pn, Pronephros, En, Endoderm, Ce, Haftdrüse, Nr, Neuralrohr, Op, Ohrplacode, Ep, Epidermis, So, Somiten, No, Notochord, Ne, Nerven, He, Herz, Pd, Proctodeum, Pi, Epiphyse, Np, Nasenplacode, Py, Hypophyse, Ha, Schlupfdrüse. Ein Vektor setzt sich aus der Summe von positiven Werten (grün dargestellten Geweben) und negativen Werten (rot dargestellten Geweben) zusammen.

Augen	Hirn Augen Neuralrohr	Epiphyse Hypophyse	Kopf Notochord Augen	Ohrplacode Haftdrüse
Au, Kb, Ss, Hi, Pn, En, Ce, Nr, Op, Ep, So, No, Ne, He, Pd, Pi, Np, Py, Ha	Au, Kb, Ss, Hi, En, Ce, Nr, Ep, So, No, Ne, He, Pd	Au, Kb, Ss, Hi, Pn, En, Ce, Nr, Op, Ep, So, No, Ne, He, Pd, Pi, Np, Py, Ha	Au, Kb, Ss, Hi, Pn, En, Ce, Nr, Ep, So, No, Ne, He, Pd, Np,	Ce, Op

**Tabelle 15: Zur Gruppierung von Genen mit anderen Expressionsmustern verwendete Vektoren.**

Die verwendeten Abkürzungen entsprechen denen aus Tabelle 14. Ein Vektor setzt sich aus der Summe von positiven Werten (grün dargestellten Geweben) und negativen Werten (rot dargestellten Geweben) zusammen.

---

## 8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. T. Pieler möchte ich für die guten Arbeitsmöglichkeiten danken. Bei Frau Prof. Dr. M. Schäfer bedanke ich für die bereitwillige Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit. Frau Prof. Dr. C. Gatz danke ich für die Übernahme des Korefferats. Für zur Verfügung gestellte cDNAs geht mein Dank an Marry Dasso für RanBP1, Ducan Sparrow für XSUMO-1, Dirk Görlich für Karyopherin  $\alpha 1$  und Karyopherin  $\alpha 2$  und an Gideon Dreyfuss für Transportin. Bei Klaus Schwamborn bedanke ich mich für das modifizierte pSV-beta Plasmid, bei Falko Rudt und Maike Claußen für den regen Tausch der Plasmide aus unserem Labor. Marion Sölter danke ich für den partiellen Karyopherin beta-3 Klon. Yong Long Chen danke ich für die Sequenz von Ran-TC4. Bei Gudrun Kracht, Tina Berneking, Ulrike Strube, Regina Buhl, Andreas Nolte und ganz besonders Helma Füllgrabe möchte ich mich für die technische Unterstützung bedanken. Dr. Falko Rudt, Dr. Kirstie Murdoch und Susanne Loop danke ich für die zur Verfügung gestellten Protokolle. Bei den Mitarbeitern und Marion Sölter, Susanne Loop, Marco Winkler, Tina Berneking, Bettina Spielbauer und Katja Horvay bedanke ich mich für das besonders angenehme Arbeitsklima. Bei Werner Ochotzki und der Werkstatt bedanke ich mich für die gute Kooperation.

---

## 9 Lebenslauf

Name: Wischnewski  
Vorname: Jörg  
Geburtsdatum: 15. März. 1968  
Geburtsort: Hannover  
Nationalität: Deutsch

### Ausbildung

1974 Einschulung in die Albert Schweitzer Schule, Hannover  
1974-1978 Grundschule Mariensee  
1978-1980 Orientierungsstufe Süd, Neustadt a. Rbge.  
1980-1984 Realschule, Neustadt a. Rbge.  
1984-1987 Kooperative Gesamtschule, Neustadt a. Rbge., mit Abiturabschluß  
am 27.05.87  
1987-1989 Zivildienst, Diakoniestation Neustadt a. Rbge.  
1989-1990 Aushilfstätigkeiten  
10/1990 Beginn des Studiums der Biologie an der Georg-August-Universität zu  
Göttingen  
10/1992 Diplomvorprüfung in den Fächern Zoologie, Genetik, Anorganische  
Chemie und Physikalische Chemie  
07/1994-09/1994 Laborpraktikum am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie,  
Abt. Molekulare Zellbiologie, Prof. Dr. Peter Gruss, Göttingen  
11/1995 Hauptdiplomprüfung in den Fächern Entwicklungsbiologie, Zoologie  
und Chemie  
11/1995-07/1997 Diplomarbeit mit dem Titel „Identifizierung von Kernlokalisierungs-  
signalsequenzen in *Xenopus laevis* TFIIIA“ am Institut für Biochemie  
und Molekulare Zellbiologie der Georg-August-Universität Göttingen  
in der Abteilung von Herrn Prof. Dr. T. Pieler  
08/1997-03/2002 Anfertigung der hier vorliegenden Dissertation mit dem Titel „Analyse  
der differentiellen Expression von Transportfaktoren und deren  
Funktion bei dem nukleocytoplasmatischen Transport von TFIIIA“ am  
Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie der Georg-August-  
Universität Göttingen in der Abteilung von Herrn Prof. Dr. T. Pieler

