

**Untersuchung der drei Isoformen des
Elongationsfaktors 1A von *Xenopus laevis*: 42Sp50 versus
EF1A-1 / EF1A-2**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Hannah Schneider
aus
Würzburg

Würzburg 2009

Eingereicht am:.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin J. Müller
Gutachter: Prof. Dr. Dr. Ulrich Scheer
Gutachter: Prof. Dr. Christoph Winkler

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meinen Eltern!

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
Summary	4
2. Einleitung	6
2.1 Das Modellsystem <i>Xenopus laevis</i>	6
2.1.1 Die Hoden und die Spermatogenese von <i>Xenopus laevis</i>	7
2.1.2 Das Ovar von <i>Xenopus laevis</i>	9
2.1.3 Die Oogenese von <i>Xenopus laevis</i>	10
2.2 Die Polarisierung der Oozyte	12
2.3 RNA Lokalisierungs-Mechanismen	12
2.3.1 Der Balbiani Body (Bb) oder Mitochondrial Cloud (MC)	13
2.3.2 Keimplasma und Germinal Granules	15
2.3.3 „Early pathway“ (METRO-pathway)	16
2.3.4 „Late pathway“	17
2.3.5 „Intermediate pathway“	17
2.4 Nuage	18
2.4.1 Chromatoid Body (CB)	20
2.5 Sm- und LSm-Proteine	21
2.6 Proteine mit Dimethylargininmotiven	22
2.7 Der Elongationsfaktor 1A	23
2.8 Die Isoformen des Elongationsfaktors 1A	24
2.9 Das Ribonukleoproteinpartikel (42S RNP) und andere RNPs prävitellogener Oozyten	25
2.10 Zielsetzung der Arbeit	28
3. Material	29
3.1 Biologisches Material	29
3.1.1 Bakterienstämme	29
3.1.2 Zelllinien	29
3.1.3 Tiere	27
3.1.4 Antikörper	29
3.1.4.1 Primäre Antikörper	29
3.1.4.2 Sekundäre Antikörper	29
3.2 Molekularbiologisches Material	30
3.2.1 Kits und Einzelbestandteile	30
3.2.2 DNA-Größenstandards	30
3.2.3 Protein-Größenstandards	30
3.2.4 Expressionsvektoren	30
3.2.4.1 pBluescript II SK (+)	30
3.2.4.2 pCMV-Myc	30
3.2.4.3 pCMV-Sport6	31
3.2.4.4 pCR®2.1-TOPO®	31
3.2.4.5 pEGFP-N1 bzw. -N2 bzw. -N3	31

3.2.4.6 pEGFP-C1 bzw. -C2 bzw. -C3	31
3.2.4.7 pmRFP-N3	31
3.2.4.8 pDsRed-Monomer-N1	32
3.2.4.9 pQC6xHis	32
3.2.5 Oligonukleotide	33
3.2.6 Enzyme	33
3.3 Chemikalien	33
3.4 Geräte	33
4. Methoden	35
4.1 Mikrobiologische Methoden	35
4.1.1 Kultivierung von Bakterien	35
4.1.1.1 Plattenkulturen	35
4.1.1.2 Flüssigkulturen	35
4.1.1.3 Glycerinkulturen	35
4.1.2 Photometrische Bestimmung der Bakteriendichte in einer Flüssigkultur	36
4.1.3 Herstellung kompetenter Bakterien	36
4.1.3.1 Kompetenztest	36
4.1.4 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien	37
4.2 Zellkultur	37
4.2.1 Kultivierung von Zellen	37
4.2.2 Passagieren adhärenter Zelllinien	37
4.2.3 Transfektion von Kulturzellen mit Effectene™(Qiagen)	38
4.3 Molekularbiologische Methoden	38
4.3.1 Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	38
4.3.1.1 Reverse Transkription	38
4.3.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	39
4.3.2 Kolonie-PCR	40
4.3.3 Mutagenese-PCR	41
4.3.3.1 Endständige Mutationen	41
4.3.3.2 Interne Punktmutationen	41
4.3.3.2.1 <i>Primer und Primerdesign</i>	42
4.3.4 Gewinnung von bakterieller Plasmid-DNA	42
4.3.4.1 GTE-System (alkalische Lyse)	42
4.3.4.2 Plasmid Miniprep (peQlab)	43
4.3.5 Restriktionsverdau	43
4.3.6 Herstellung glatter (blunt) Enden bei Plasmid-DNA-Sequenzen	44
4.3.7 Beladungspuffer für die DNA-Gelelektrophorese	44
4.3.8 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese	45
4.3.9 Reinigung von Nukleinsäuren	46
4.3.9.1 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen	46
4.3.9.2 Fällung von DNA	46

4.3.9.3	Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben	46
4.3.9.4	Extraktion von RNA mit RNeasy (Qiagen)	47
4.3.10	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren durch photometrische Messung	47
4.3.11	Sequenzierung von Nukleinsäuren	47
4.3.12	Klonierungen	48
4.3.12.1	Klonierung von PCR-Fragmenten	48
4.3.12.2	Klonierung von DNA-Fragmenten	49
4.3.12.2.1	<i>Gewinnung des Inserts</i>	49
4.3.12.2.2	<i>Dephosphorylierung des Vektors</i>	49
4.3.12.3	Ligation	50
4.3.12.4	Transformation	50
4.3.12.5	Test der erhaltenen Klone	50
4.3.13	in vitro Herstellung von mRNA zur Mikroinjektion in X.I. Oozyten	50
4.3.13.1	Linearisierung der Plasmid-DNA	50
4.3.13.2	Synthese von "capped" mRNA	51
4.3.13.3	Polyadenylierung der mRNA	51
4.3.13.4	Aufreinigung der mRNA	51
4.3.13.5	RNA-Gelelektrophorese	52
4.3.14	In vitro Transkription von 5S rRNA	52
4.4	Proteinbiochemische Methoden	53
4.4.1	Fällung von Proteinen	53
4.4.1.1	Methanol/Chloroform-Fällung	53
4.4.1.2	Acetonfällung	53
4.4.2	Dephosphorylierung von Proteinen	53
4.4.3	RNase-Verdau von Oozytenextrakt	54
4.4.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	54
4.4.5	Zweidimensionale Gelelektrophorese	56
4.4.5.1	Erste Dimension der isoelektrischen Fokussierung (IEF)	57
4.4.5.1.1	<i>Silikonisierung der Glasröhrchen</i>	57
4.4.5.1.2	<i>Rundgele</i>	57
4.4.5.1.3	<i>Vorelektrophorese</i>	58
4.4.5.1.4	<i>Vorbereitung der Proben</i>	58
4.4.5.1.5	<i>Bestimmung des pH-Gradienten im Rundgel</i>	59
4.4.5.2	Zweite Dimension: SDS-PAGE	59
4.4.5.3	Erste Dimension: NEPHGE	59
4.4.5.3.1	<i>Silikonisierung der Glasröhrchen</i>	60
4.4.5.3.2	<i>Vorbereitung der Proben</i>	60
4.4.6	Färbung von SDS-Gelen	60
4.4.6.1	Coomassie-Färbung	60
4.4.6.2	Silberfärbung	61
4.4.7	Trocknen von SDS-Gelen	61

4.4.8	Westernblot	62
4.4.9	Spezifischer Proteinnachweis mit Antikörpern	63
4.4.10	Enhanced Chemi-Luminescence (ECL)	63
4.4.11	Entfernung gebundener Antikörper (Strippen)	63
4.4.12	Proteine mit Histidin-tag	64
4.4.12.1	Herstellung eines Proteins mit C-terminalem Histidin-tag	64
4.4.12.2	Denaturierende Aufreinigung des Proteins mit C-terminalem Histidin-tag	64
4.4.13	Bestimmung der Proteinkonzentration durch eine BSA-Reihe	65
4.4.14	Renaturierung aufgereinigter Proteine	65
4.5	Arbeiten mit <i>Xenopus laevis</i>	65
4.5.1	Operative Entnahme von Ovar	65
4.5.2	Operative Entnahme von Hoden und Geweben	66
4.5.3	Herstellung eines Oozytenextrakts	66
4.5.4	Stimulierung der Eireifung	66
4.5.5	In vitro Fertilisation	66
4.5.6	Embryonenhaltung und Isolation	67
4.5.7	Manuelle Isolierung von Oozyten	67
4.5.8	Isolierung von Oozyten durch Collagenase-Verdau	67
4.5.9	Mikroinjektion in das Zytoplasma von Oozyten	67
4.5.10	Mikroinjektion in das Zytoplasma von somatischen Zellen	68
4.5.11	Inkubation der Oozyten mit Zellgiften	68
4.6	Immunologische Methoden	68
4.6.1	Immunpräzipitation mit Sheep anti-mouse IgG Dynabeads® M-450 (Invitrogen)	68
4.6.2	Immunlokalisationen	69
4.6.2.1	Fixierung von somatischen Kulturzellen	69
4.6.2.1.1	<i>Methanol/Aceton-Fixierung</i>	69
4.6.2.1.2	<i>Formaldehyd/Triton-Fixierung</i>	70
4.6.2.2	Indirekte Immunfluoreszenz bei somatischen Kulturzellen	70
4.6.3	Indirekte Immunlokalisation mit Gefrierschnitten von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	70
4.6.3.1	Vorbereitung des Gewebes	70
4.6.3.2	Schneiden und Fixieren des Gewebes	71
4.6.3.3	Immunlokalisation	71
4.6.4	Indirekte Immunlokalisation auf in Polyesterwachs eingebetteten <i>X. laevis</i> Oozyten	71
4.6.4.1	Fixieren des Gewebes	71
4.6.4.2	Einbettung von Ovar in Polyesterwachs	72
4.6.4.3	Schneiden des Gewebes	72
4.6.4.4	Immunlokalisation	72
4.6.5	Whole-mount Immunfluoreszenz von <i>Xenopus</i> Oozyten	72
4.6.5.1	Vorbereitung des Gewebes	72

4.6.5.2	Immunlokalisation	72
4.6.6	Immungoldlokalisation an Gefrierschnitten von <i>X. laevis</i> Oozyten (Pre-embedding)	73
4.6.7	Immunlokalisation an Gefrierschnitten mit Ultrasmall Nanogold und anschließender Silberverstärkung (Pre-embedding)	73
4.6.8	Einbettung von Gewebe in LR-White mit anschließender Immunlokalisation (Post-embedding)	74
4.7	Einbettung von <i>Xenopus</i> Ovar in Epon	75
4.8	Kontrastierung von EponUltradünnschnitten	76
4.9	Mikroskopie	76
4.9.1	Analyse von Fluoreszenzpräparaten am Epifluoreszenzmikroskop	76
4.9.2	Analyse am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM)	76
4.9.3	Lebendbeobachtung von Zellen unter dem Mikroskop	77
4.9.3.1	Kulturzellen	77
4.9.3.2	<i>Xenopus laevis</i> Oozyten	77
4.9.4	Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)	77
4.9.5	Bioinformatische Programme	77
5.	Ergebnisse	78
5.1	Verteilung des Antikörpers IV'D4 in verschiedenen Zelltypen und Geweben	78
5.1.1	Lichtmikroskopische Lokalisation an Gefrierschnitten von prävitello-genen <i>Xenopus</i> Oozyten	78
5.1.2	Einbettung prävitellogener <i>Xenopus</i> Oozyten in Polyesterwachs	80
5.1.3	Whole-mount Immunfluoreszenz mit IV'D4 an prävitello-genen <i>Xenopus</i> Oozyten	80
5.1.4	Elektronenmikroskopische Untersuchungen prävitellogener <i>Xenopus</i> Oozyten	81
5.1.5	Immungold-EM mit IV'D4 an <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	83
5.1.6	Lichtmikroskopische Lokalisation des Antigens von IV'D4 an Gefrierschnitten von <i>Xenopus</i> Hoden	84
5.1.7	Immunfluoreszenz mit IV'D4 an somatischen <i>Xenopuszellen</i>	85
5.1.8	Vergleich der Markierungsmuster von IV'D4 und Antikörper Y12	85
5.1.9	EM-Immungoldlokalisationen an <i>Xenopus laevis</i> Oozyten mit Y12	86
5.2	Veränderung der Nuage-Strukturen durch zelluläre Inhibitoren	87
5.2.1	Inkubation mit Actinomycin D (AMD), Cycloheximid (CHX) und Leptomycin B (LMB)	87
5.2.2	Inkubation mit Methyltransferase-Hemmern	90
5.3	Biochemische Identifizierung des IV'D4-Antigens	93
5.3.1	Immunblot mit prävitellogenem <i>Xenopus</i> Oozytenextrakt	93
5.3.2	Expression während der Oogenese	94
5.3.3	Vergleichende Immunblots mit IV'D4 und einem Antikörper gegen EF1A mit Extrakten verschiedener Oozytenstadien	95
5.3.4	Expression von EF1A in verschiedenen Oozytenstadien und Geweben	96
5.3.5	Immunpräzipitationen mit den Antikörpern IV'D4 und anti-EF1A	96
5.3.6	Bakterielle Expression und Aufreinigung von 42Sp50	97

5.4	2D-Gelelektrophorese von EF1A in Oozyten und Leber	98
5.5	Molekulare Charakterisierung der drei EF1A-Isoformen von <i>Xenopus laevis</i>	101
5.5.1	Analyse der Nukleotidsequenzen	101
5.5.2	Analyse der Aminosäuresequenzen	103
5.5.3	Vergleich der EF1A-Familie in verschiedenen Spezies	106
5.6	Expression der EF1A-Genfamilie während der Oogenese und in verschiedenen Geweben von <i>Xenopus laevis</i> mittels RT-PCR	107
5.7	Herstellung verschiedener Fusionskonstrukte der drei <i>Xenopus</i> EF1A-Isoformen mit fluoreszierenden Proteinen	110
5.8	Lokalisierung der EF1A-Fusionsproteine in Kulturzellen	111
5.9	Lokalisation der EF1A-Fusionsproteine in prävitellogenen <i>Xenopus</i> Oozyten	114
5.10	Analyse der in vivo-Interaktionen zwischen den EF1A-Isoformen und 42Sp43	115
5.10.1	Herstellung verschiedener Fusionskonstrukte von 42Sp43	116
5.10.2	Lokalisation von 42Sp43-Konstrukten in COS7-Zellen	116
5.10.3	Lokalisation von 42Sp43-Fusionsproteinen in prävitellogenen <i>Xenopus</i> Oozyten	118
5.10.4	Lokalisation von EGFP in prävitellogenen <i>Xenopus</i> Oozyten	119
5.10.5	Koexpression der EF1A-Isoformen mit 42Sp43 in Kulturzellen	119
5.10.6	Quantitative Auswertung der Koexpressionsversuche	123
5.10.7	Koexpression der EF1A-Isoformen mit 42Sp43 in prävitellogenen <i>Xenopus</i> Oozyten	125
6.	Diskussion	127
6.1	Identifizierung des Antigens von IV'D4 und Charakterisierung von Nuage	127
6.2	In <i>Xenopus</i> existieren drei Isoformen des IV'D4-Antigens	130
6.3	Analyse der differentiellen Genexpression der EF1A-Familie auf mRNA-Ebene	132
6.4	Expression von EF1A-Fusionsproteinen in Kulturzellen und Oozyten	133
6.5	Expression von 42Sp43 in Kulturzellen und Oozyten	134
6.6	Nachweis der in vivo Interaktionen zwischen den beiden Proteinkomponenten der 42S Ribonukleoproteinpartikel	134
7.	Literaturverzeichnis	137
8.	Abbildungsverzeichnis	149
9.	Anhang	151
9.1	Primerliste	151
9.2	Abkürzungen	153
	Publikationen	157
	Lebenslauf	158
	Danksagung	159
	Erklärung	160

1. Zusammenfassung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der monoklonale Antikörper IV'D4 biochemisch charakterisiert und die zelluläre Verteilung des Antigens mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Der Antikörper stammte aus einer monoklonalen Antikörper-Bibliothek, die durch Immunisierung einer Maus mit einem Extrakt aus prävitellogenen Oozyten von *Xenopus laevis* erhalten wurde. Der Antikörper wurde ausgewählt, weil er punktartige, perinukleäre Strukturen in jungen Oozyten anfärbte. Diese Strukturen wurden zunächst näher charakterisiert. Durch elektronenmikroskopische Lokalisierungsexperimente wurde gezeigt, dass es sich dabei um Nuage handelt. Nuage sind charakteristische elektronendichte Körperchen, die um den Oozytenkern vieler Spezies angereichert sind und häufig mit der zytoplasmatischen Seite der Kernporenkomplexe in struktureller Verbindung stehen. In *Xenopus* Oozyten sind sie ausschließlich in prävitellogenen Stadien vorhanden. Es wird angenommen, dass es sich um Vorläuferstrukturen von Germinal Granules handelt. Germinal Granules wiederum sind elektronendichte Anordnungen des Keimplasmas in *Xenopus* Oozyten, die zahlreiche RNAs und Proteine enthalten und mit Mitochondrien assoziiert sind. Obwohl der Antikörper eine oozytenspezifische Struktur markierte, färbte er in der Immunfluoreszenz überraschenderweise auch somatische *Xenopus* Kulturzellen (A6 und XTC) an. Allerdings war in diesen Fällen das gesamte Zytoplasma gleichförmig angefärbt.

Als nächstes wurde das Antigen von IV'D4 und damit eine neue Proteinkomponente der Nuage identifiziert. Durch Immunblots von prävitellogenen Oozyten und Expression rekombinanter Proteine wurde festgestellt, dass der Antikörper das Protein 42Sp50 erkennt. Dieses Protein ist Bestandteil des oozytenspezifischen 42S RNP Partikels und gehört zur Familie des Translations-Elongationsfaktors 1A (EF1A). In *Xenopus* existieren hiervon drei Isoformen. Zwei davon stellen traditionelle Elongationsfaktoren 1A dar, die ~90% Sequenzidentität mit den entsprechenden Säugerproteinen aufweisen. Zusätzlich gibt es bei *Xenopus*, nicht aber bei Säugern, eine dritte Isoform als Bestandteil der 42S Partikel, genannt 42Sp50. Durch Immunblots konnte gezeigt werden, dass das Antigen von IV'D4 nicht nur in allen Oozytenstadien vorliegt, sondern überraschenderweise auch in somatischen Zellen und Geweben. Daher lag die Vermutung nahe, dass der Antikörper nicht nur 42Sp50 erkennt, sondern auch die beiden somatischen EF1A- Isoformen. Da alle drei EF1A-Isoformen sehr ähnliche Molekularmassen und isoelektrische Punkte aufweisen, konnten sie selbst in 2D-Immunblots nicht unterschieden werden. Erschwerend kam hinzu, dass sie in zahlreichen Phosphorylierungsvarianten vorlagen. Daher konnte mit diesen proteinbiochemischen Ansätzen nicht geklärt werden, ob prävitellogene Oozyten neben 42Sp50 auch die somatischen Isoformen exprimieren. Aus diesem Grund konnte der Beweis nicht geführt werden, dass die Nuage tatsächlich 42Sp50 enthalten und somit Orte der 42S RNP Bildung sind. Es war nicht auszuschließen, dass die Nuage lediglich die somatischen EF1A-Isoformen akkumulieren.

Tatsächlich werden alle drei EF1A-Isoformen in Oozyten exprimiert, wie RT-PCR-Experimente belegten. Die Expressionsanalyse wurde auch auf frühe Embryonalstadien, somatische Gewebe von adulten Fröschen und *Xenopus*-Zelllinien ausgedehnt. Die Ergebnisse zeigen, dass 42Sp50 mRNA in allen Oozytenstadien vorhanden ist, aber auch in Eiern und frühen Embryos, vermutlich aufgrund persistierender maternaler mRNA. In Kulturzellen sowie in adulten somatischen Geweben wie Leber und Herz, mit der interessanten Ausnahme von Hirn, konnte jedoch keine 42Sp50-mRNA nachgewiesen werden. Die ubiquitäre Expression und hohe Sequenzverwandtschaft der beiden

traditionellen *Xenopus* EF1A-Isoformen mit denen der Säuger veranlassten uns, die Nomenklatur anzugleichen (*Xenopus* EF1A-1 für EF1A-S und EF1A-2 für EF1A-O).

Durch Mikroinjektion entsprechender mRNAs wurden Fluoreszenz-EF1A Fusionsproteine (gekoppelt an EGFP, monomeres DsRed oder monomeres RFP) in lebenden Oozyten exprimiert und lokalisiert. Alle Isoformen (EF1A-1, EF1A-2 und 42Sp50) waren vom Zellkern ausgeschlossen und gleichförmig im gesamten Zytoplasma verteilt, allerdings ohne deutliche Akkumulation in Nuage-vergleichbaren perinukleären Strukturen. Möglicherweise war eine Anreicherung in Nuage durch das relativ starke zytoplasmatische Signal überdeckt. Außerdem besteht die formale Möglichkeit, dass sich neu synthetisierte Fusionsproteine nur vorübergehend in den Nuage anreichern, bevor sie sich im gesamten Zytoplasma verteilen. Wenn die Aufenthaltsdauer in den Nuage kürzer als die Reifungszeit des fluoreszierenden Proteins ist, könnte dies das negative Resultat erklären.

Neben 42Sp50 wurde auch die zweite Proteinkomponente der 42S Partikel, 42Sp43, in Form von fluoreszierenden Fusionsproteinen in Oozyten exprimiert und lokalisiert. Das mit dem Transkriptionsfaktor TFIIIA verwandte Protein war ebenfalls im gesamten Zytoplasma verteilt, zusätzlich aber in den zahlreichen amplifizierten Nukleolen konzentriert. Eine Akkumulation in den Nuage wurde jedoch ebenfalls nicht beobachtet.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde die Dynamik der Nuage untersucht. Dazu wurden Versuche mit verschiedenen Inhibitoren durchgeführt. Es sollte überprüft werden, ob die Hemmung unterschiedlicher zellulärer Prozesse Einfluss auf die strukturelle Organisation der Nuage hat. Mittels elektronenmikroskopischer Analysen wurde beobachtet, dass durch die Hemmung der Translation mit Cycloheximid die Nuage dichter gepackt vorliegen und sich scheinbar von der Kernhülle bzw. den Kernporenkomplexen ablösen. Die Hemmung der Transkription durch Actinomycin D und Hemmung des Exportin1-vermittelten Kernexports durch Leptomycin D zeigten dagegen keine Veränderungen. Interessanterweise führte die Hemmung der Proteinmethylierung durch Zugabe der Inhibitoren MTA oder Adox zur partiellen Entfaltung der Nuages, so dass nur noch filamentöse Reststrukturen sichtbar waren. Offenbar ist die strukturelle Integrität der Nuages abhängig von Proteinmethylierungen.

Zu Beginn der Arbeit lagen keine Kenntnisse darüber vor, in welchem Zellkompartiment das Assembly der 42S RNPs stattfindet. Zunächst wurden deshalb die beiden Proteine 42Sp50 und 42Sp43 als fluoreszierende Fusionsproteine in prävitellogenen Oozyten koexprimiert. Hierbei kam es zu einer Umverteilung von 42Sp43. Das nukleoläre Signal war im Vergleich zur Einzelexpression deutlich schwächer, so dass der Eindruck gewonnen wurde, dass 42Sp43 durch Interaktion mit 42Sp50 im Zytoplasma zurückgehalten wurde. Durch die Koexpression der beiden anderen EF1A-Isoformen mit 42Sp43 kam es, im Vergleich zu den Einzelexpressionen, nicht zur Umverteilung einer Proteinkomponente. Somit konnte in dieser Arbeit erstmals *in vivo* gezeigt werden, dass die beiden Proteinkomponenten des 42S RNP Partikels spezifisch miteinander interagieren und dass die Bildung der 42S Partikel vermutlich im Zytoplasma stattfindet.

Ein eindeutiger Nachweis der spezifischen Interaktion zwischen 42Sp43 und 42Sp50 gelang insbesondere durch die transiente Expression der entsprechenden fluoreszenzmarkierten Proteinpaare in somatischen Kulturzellen (*Xenopus* A6 und Säuger COS-7 Zellen). Wurden die drei EF1A-Isoformen einzeln exprimiert, waren sie gleichförmig im gesamten Zytoplasma verteilt und vom Kern ausgeschlossen. Lediglich 42Sp50 zeigte in ~15% der Fälle eine schwache Anreicherung in den Nukleolen. Im Gegensatz dazu war 42Sp43 nach Einzelexpression in den Nukleolen konzentriert. Die räumliche Trennung blieb auch nach Koexpression von 42Sp43 (im Nukleolus) und den beiden somatischen EF1A-Isoformen (im Cytoplasma) erhalten. Ganz anders verhielt sich 42Sp50, das nach

Koexpression mit 42Sp43 vom Zytoplasma in die Nukleolen umverteilt wurde. Vermutlich wird 42Sp50 durch Interaktion mit 42Sp43 in die Nukleolen transportiert und dort festgehalten. Zusammenfassend lässt sich demnach feststellen, dass 42Sp50, aber nicht die anderen EF1A-Isoformen mit 42Sp43 interagieren.

Die hier beschriebene Koexpression von Proteinpaaren mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen in Säugerzellen stellt eine einfache Methode dar, um in vivo Interaktionen mikroskopisch sichtbar zu machen. Damit sollte es möglich sein, durch gezielte Mutationen und Deletionen von 42Sp50 und 42Sp43 diejenigen Aminosäuren und strukturellen Determinanten zu identifizieren, die bei der spezifischen Interaktion und damit beim Assembly der 42S Partikel eine Rolle spielen.

Summary

In the first part of the present work the monoclonal antibody IV'D4 was characterized biochemically and the cellular distribution of the antigen was analyzed using immunofluorescence microscopy. The antibody originated from a monoclonal antibody library, which was obtained by immunization of a mouse with previtellogenic oocyte extract from *Xenopus*. The antibody was chosen due to the fact that it stained dot-like, perinuclear structures in young oocytes. Electron microscopic localization experiments identified them as nuage. Nuage are characteristic electron dense bodies, accumulated around the oocyte nucleus of many species and often in structural association with the cytoplasmic side of nuclear pores. In *Xenopus*, they are abundant exclusively in previtellogenic stages. It is assumed that they are precursor structures of germinal granules. Germinal granules are electron dense arrangements of *Xenopus* germ plasma in oocytes. The granules contain numerous RNAs and proteins and are associated with mitochondria. Although the antibody marked an oocyte specific structure, immunofluorescence surprisingly showed that it also stained somatic *Xenopus* culture cells (A6 and XTC). However, the cytoplasm was stained uniformly in those cases.

Next, the antigen recognized by IV'D4 was identified as a new protein component of nuage. By immunoblotting of previtellogenic oocytes and by expression of recombinant proteins it was observed that the antibody recognizes the protein 42Sp50. This protein is a component of the oocyte-specific 42S particle and belongs to the family of translation elongation factors 1A (EF1A). In *Xenopus*, three isoforms exist. Two of them are traditional elongation factors 1A, showing ~90% sequence identity with homologous mammalian proteins. Additionally, a third isoform, which has no mammalian counterpart, is a component of the 42S particle, named 42Sp50. Surprisingly, immunoblotting experiments showed that the IV'D4 antigen is present not only in every oocyte stage, but also in somatic cells and tissues. Therefore, it was assumed that the antibody does not recognize only 42Sp50, but also both somatic EF1A-isoforms. Since all three EF1A-isoforms have very similar molecular masses and isoelectric points, it was not possible to distinguish between them even by 2D-immunoblotting. Furthermore, they were present in numerous phosphorylation variants. Therefore, protein biochemical approaches did not allow to solve the question, as to whether previtellogenic oocytes express somatic isoforms beside 42Sp50. Hence, it was impossible to obtain evidence that nuage really contain 42Sp50 and therefore are sites of 42S RNP formation. It could not be excluded that nuage accumulate only somatic EF1A-isoforms.

RT-PCR experiments demonstrated that in fact, all three isoforms are expressed in oocytes. The expression analysis was extended with probes of early embryonic stages as well as somatic tissues and *Xenopus* cell lines. The results show, that 42Sp50 is present in all oocytes stages, but also in eggs and early embryos, probably due to persistent maternal mRNA. In culture cells and adult somatic tissues like liver and heart, no 42Sp50-mRNAs were detectable. An interesting exception was brain tissue. The ubiquitous expression and the high sequence similarity of traditional *Xenopus* EF1A-isoforms prompted us to adopt the nomenclature (*Xenopus* EF1A-1 for EF1A-S and EF1A-2 for EF1A-2).

Fluorescent EF1A fusion proteins (linked to EGFP, monomeric DsRed and monomeric RFP) were expressed and localized in living oocytes by microinjection of accordant mRNAs. All isoforms were excluded from the nucleus and dispersed throughout the cytoplasm, but without an explicit accumulation in nuage-related perinuclear structures. Possibly, the strong cytoplasmic signal covered an enrichment within nuage. It could also be possible that newly synthesized fusion proteins are accumulated only temporarily in nuage

before they are released into cytoplasm. A reason for the negative result could be the fact that the residence time in nuage is shorter than the maturation time of the fluorescent protein.

Beside 42Sp50, the second protein component of the 42S particle, 42Sp43, was expressed and localized as fluorescent fusion protein in oocytes. This protein, which is related to transcription factor IIIA, was also dispersed throughout the whole cytoplasm. Additionally, it was concentrated in the amplified nucleoli. However, again, an accumulation within nuage was not observed.

The dynamics of nuage were analyzed in another part of the present work. For that purpose, experiments were carried out with different inhibitors. It was analyzed if the structural organization of nuage was influenced by the inhibition of different cellular processes. Using electron microscopic approaches, it was clearly seen that the inhibition of translation with cycloheximide resulted in densely packed nuage apparently detaching from the nuclear envelope and the nuclear pores. Transcriptional inhibition caused by actinomycin D and inhibition of exportin-1 mediated nuclear export by leptomycin B showed no structural changes. Interestingly, inhibition of protein methylation by addition of MTA or Adox resulted in a partial unfolding of nuage with only filamentous structures remaining visible. Obviously, the structural integrity of nuage depends on protein methylations.

At the beginning of the present work it was unknown in which compartment of the cell the assembly of 42S RNPs takes place. Therefore, both proteins of the 42S particle were coexpressed in previtellogenic *Xenopus* oocytes as fluorescent fusion proteins which resulted in a conspicuous spatial redistribution of 42Sp43. Compared to single expression, the nucleolar signal of 42Sp43 was clearly weakened and it appeared that 42Sp43 was retained in the cytoplasm by interaction with 42Sp50. No redistribution, compared to single expression experiments, was observed when the other EF1A-isoforms were expressed along with 42Sp43. Hence, the present work showed for the first time that the protein components of the 42S particle interact with each other specifically.

Distinct evidence for a specific interaction between 42Sp43 and 42Sp50 was obtained by transient expression of the fluorescence labeled protein pairs in somatic culture cells (*Xenopus* A6 and mammalian COS7 cells). When the three EF1A-isoforms were expressed alone, they were distributed throughout the cytoplasm homogenously and excluded from the nucleus. Merely 42Sp50 showed a weak accumulation within the nucleolus in ~15% of all cases. In contrast, 42Sp43 was concentrated within the nucleoli. The spatial separation was maintained after coexpression of 42Sp43 (nucleolus) and the two somatic EF1A-isoforms (cytoplasm). 42Sp50 showed a completely different behaviour, as it redistributed from the cytoplasm into the nucleoli after coexpression with 42Sp43. Probably, 42Sp50 is transported to and retained within the nucleoli by interaction with 42Sp43. In summary, it can be asserted that 42Sp50, but not the other EF1A-isoforms interact with 42Sp43.

The described coexpression of protein pairs with different fluorescent dyes in mammalian cells describes a simple method to visualize in vivo interactions microscopically. By analyzing specific mutations and deletions of 42Sp50 and 42Sp43 it should be possible to identify those amino acids and structural determinants which are responsible for specific interactions important for the assembly of 42S particles.

2. Einleitung

2.1 Das Modellsystem *Xenopus laevis*

Ein hervorragend geeignetes Modellsystem der Zell- und Entwicklungsbiologie von Vertebraten stellt der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* dar. Da die Embryonalentwicklung vollständig außerhalb des Mutterleibes stattfindet, eignet er sich besonders für Studien der frühen Embryogenese. Zusätzlich bietet die enorme Größe der Oozyten und Eier viele Vorteile bei zellbiologischen Experimenten. Unter Laborbedingungen ist die Haltung und Aufzucht sehr einfach, da die Tiere einen Temperaturbereich von 16 bis 22°C tolerieren. Epidermale und endogene Faktoren machen ihn gegen Infektionen relativ resistent (Zaslhoff, 1987; Ali et al., 2001), weshalb eine rigorose Asepsis bei Operationen (z.B. zur Entnahme von Ovar) nicht zwingend nötig ist. Ausgewachsene Krallenfrösche erreichen eine Körpergröße von 13 bis 15 cm. Hierbei sind die weiblichen Tiere die größeren, die männlichen meist die kleineren Exemplare. In Gefangenschaft gezüchtete Krallenfrösche bleiben meist etwas kleiner. Mit ca. 2 Jahren werden *X. laevis* geschlechtsreif. Die Weibchen sind durch ihre massivere Größe und die Kloakalpalpillen im Genitalbereich gut von den Männchen zu unterscheiden. Die aus dem südlichen Afrika stammenden Amphibien weisen an den inneren drei Zehen schwarze Krallen auf, die für die Gattung namensgebend sind.

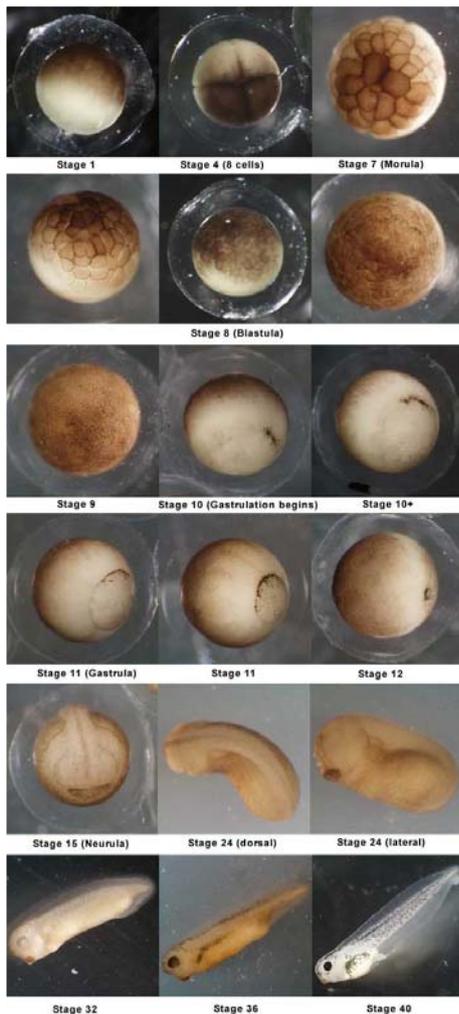


Abbildung 2-1 Männlicher (links) und weiblicher (rechts) *Xenopus laevis*.
Quelle: expasy.org/spotlight/back_issues/sptlt007.shtml

Durch die Injektion des humanen Schwangerschaftshormons Choriongonadotropin (hCG) in den dorsalen Lymphsack, können die Tiere zur Paarung oder Eiablage stimuliert werden, weshalb *X.laevis* auch als Apothekerfrosch bezeichnet wird und bis in die 1960er Jahre als biologischer Schwangerschaftstest verwendet wurde. Bei der Eiablage werden durchschnittlich bis zu 1000 Eier abgelaicht. Die Größe einer reifen Oozyte und eines Froscheis beträgt zwischen 1,0 bis 1,3 Millimeter, was experimentelle Manipulationen wie zum Beispiel Mikroinjektionen von Proteinen oder RNA erleichtert.

Die Oogenese und Spermatogenese verläuft in adulten Fröschen kontinuierlich ab, wobei die reifenden Keimzellen beider Prozesse in mehrere Stadien eingeteilt werden.

Die Oogenese wurde von Dumont (1972) in sechs verschiedene Stadien unterteilt, die Spermatogenese wird ebenfalls in verschiedene Abschnitte gegliedert. Beide Prozesse werden im Folgenden genauer beschrieben (2.1.1-2.1.3).



Eine Einteilung der Embryogenese in charakteristische Entwicklungsstadien wurde von Nieuwkoop und Faber bereits vor ca. 30 Jahren anhand einer Normtafel vorgenommen (Nieuwkoop and Faber, 1975; Abbildung 2-2). *Xenopus laevis* gehört zu den am besten charakterisierten entwicklungsbiologischen Modellsystemen. Genetische Analysen sind bei *X. laevis* nach wie vor nur eingeschränkt möglich, da das Genom des Tieres mit 18 Chromosomen und etwa $3,1 \times 10^9$ bp noch nicht vollständig durchsequenziert wurde (Olmo and Morescalchi, 1978). Im Vergleich dazu besitzt sein nächster Verwandter *Xenopus tropicalis* nur 10 Chromosomen und eine Genomgröße von $1,7 \times 10^9$ bp (de Sa and Hillis, 1990; Hirsch et al., 2002).

Abbildung 2-2 Einteilung der Embryogenese nach Nieuwkoop, P.D. and Faber, J. (1975). Quelle: swarthmore.edu

2.1.1 Die Hoden und die Spermatogenese von *Xenopus laevis*

Froschlurche haben rundliche Hoden. Sie sind über ein Mesorchium an der Rumpfwand oder der Urniere befestigt. Medial (in Richtung Medianebene) des Hodens ist ein deutlicher Fettkörper ausgebildet. Die Hodenläppchen enthalten jeweils zwei bis vier gewundene Samenkanälchen, die das Hodenparenchym darstellen. Ihre Wand besteht aus einer Bindegewebshülle mit kontraktionsfähigen Myofibroblasten, einer Basalmembran und dem Keimepithel.

Dieses Epithel besteht aus Keim- und Sertoli-Zellen und ist Ort der Spermienbildung (Spermatogenese). Dabei werden die aufeinanderfolgenden Entwicklungsstadien der Keimzellen (Spermatogonien → Spermatozyten → Spermatiden → Spermien) allmählich in Richtung Lumen transportiert. Spermien werden in adulten Männchen zeitlebens produziert. Die zweite wichtige Komponente der Samenkanälchen sind die Sertoli-Zellen, die radiär das gesamte Keimepithel bis zum Lumen durchziehen. Die Sertoli-Zellen sind über N-Cadherine mit den Keimzellen verbunden (Newton et al., 1993). Sie haben eine Stütz- und Ammenfunktion für die Samenzellen, sie ernähren die Samenzellen und bewerkstelligen über Plasmabewegungen deren Transport zum Lumen. Zudem phagozytieren die Sertolizellen degenerierte Samenzellen und Zellreste, die bei der Spermienentwicklung entstehen.

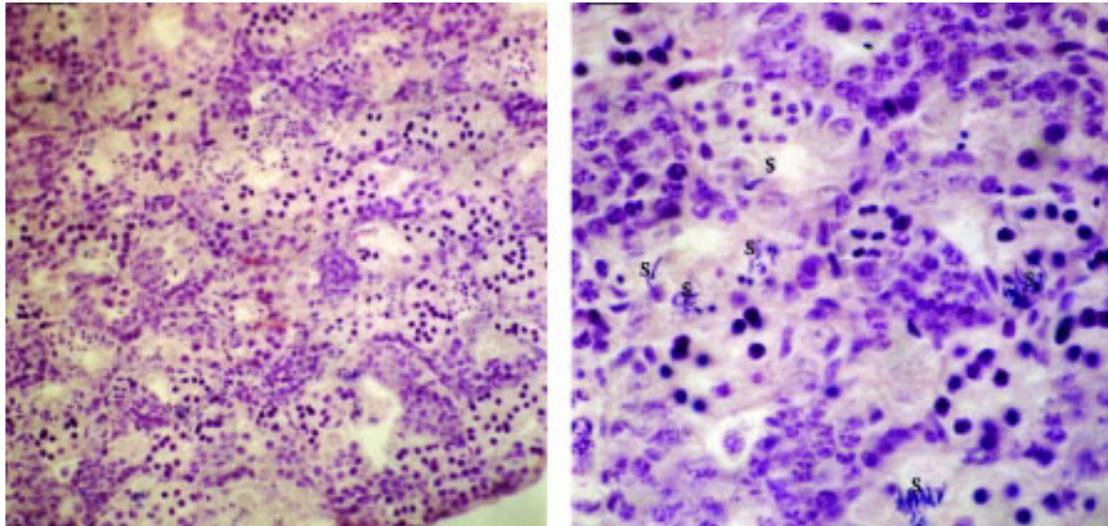


Abbildung 2-3 Histologische Schnitte eines *X. laevis* Hodens in 160-facher (links) und 400-facher (rechts) Vergrößerung (Qin et al., 2003). Zu erkennen sind die Tubuli mit zahlreichen Keimzellen unterschiedlicher Stadien.

Die Entstehung von Spermien wird als Spermatogenese bezeichnet. Diploide Spermatogonien erfüllen dabei die Funktion der Stammzellpopulation. Zunächst differenzieren Spermatogonien zu Spermatozyten 1. Ordnung (Zellvergrößerung). Zuvor teilen sie sich jedoch mitotisch, so dass der Bestand an Keimzellen im Organismus zeitlebens regeneriert wird (Spermatozytogenese). In der Meiose I teilen sich die Spermatozyten 1. Ordnung zu Spermatozyten 2. Ordnung. Das diploide Genom wird durch diesen Vorgang haploid. In der Meiose II teilen sich die Spermatozyten 2. Ordnung erneut und daraus gehen jeweils zwei Spermatozyten hervor. Aus einem einzelnen Spermatogonium gehen also durch Meiose vier Spermien hervor, wobei zwei davon ein X-Chromosom und zwei ein Y-Chromosom tragen. In dieser Zeit "wandern" die sich entwickelnden Keimzellen von der Basis der Hodenkanälchen zum Lumen der Hodenkanälchen. Die mitotische Teilung einiger Spermatogonien stellt zeitlebens den Bestand an Zellausgangspopulationen für die Spermatogenese sicher.

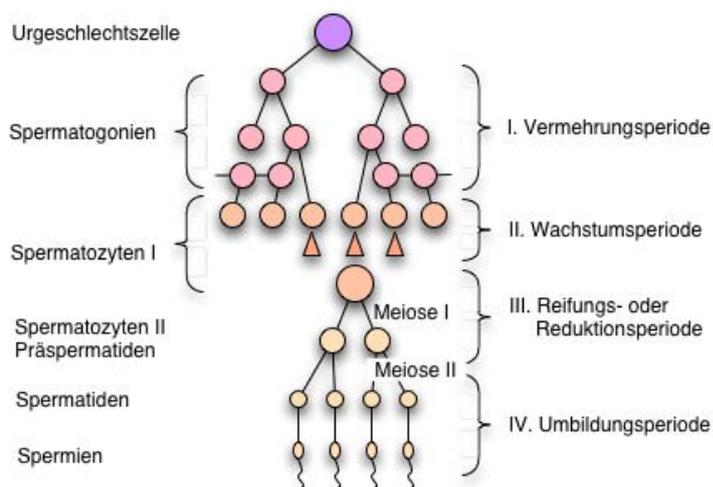


Abbildung 2-4 Die Spermatogenese von *Xenopus laevis*. Durch die Meiose entstehen aus diploiden Keimzellen haploide Spermien. Diploide Spermatogonien bilden im Hoden die Stammzellpopulation, aus der nach mehreren Teilungen diploide (primäre) Spermatozyten entstehen. Aus diesen Zellen gehen nach der Meiose jeweils vier haploide Spermatozyten hervor, die im Anschluss zu beweglichen Spermien reifen (Wolpert, 1999).

2.1.2 Das Ovar von *Xenopus laevis*

Das Ovar des weiblichen *Xenopus laevis* füllt einen großen Teil des Abdomens aus und stellt mit ca. 15% des Körpergewichts das größte Organ des adulten Tieres dar. Die zwei Ovarien (paarige Ovarien) sind in zahlreiche Lappen (ca. 24) unterteilt, von denen jeder, das ganze Jahr über, hunderte von Oozyten aller Entwicklungsstadien enthält (Rasar und Hammes, 2006). Die Oozyten sind von Ovarepithel, Blutgefäßen, Theka und Follikelepithel umhüllt. Das Ovar eines adulten Weibchens weist mehrere 10.000 Oozyten auf. Die Zeitspanne, in der eine Stadium I Oozyte zu einer Stadium VI Oozyte reift, variiert stark (zwischen 4-8 Monaten). Sie ist sowohl abhängig von Umwelteinflüssen, als auch von hormonellen Schwankungen des Tieres (Smith et al., 1991; King et al., 2005).

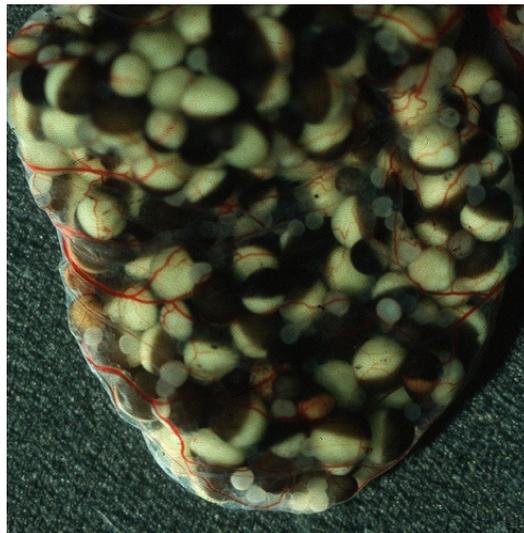


Abbildung 2-5 Aufnahme eines Ovarlappens von *Xenopus laevis* (flickr.com), der alle Oozytenstadien enthält.

Die Entwicklung des Ovars beginnt bereits in einem sehr frühen Embryonalstadium. Primordiale Keimzellen werden im Embryo durch Einlagerung der speziellen Komponenten des Keimplasmas festgelegt (Czolowska, 1969; Ikenishi, 1998). Das Keimplasma enthält die sogenannten Germinal Granules und ist im Ei am vegetativen Pol lokalisiert. Im Embryo wird es schon nach wenigen Zellteilungen auf einzelne Zellen verteilt, die sich zu primordialen Keimzellen entwickeln und schließlich durch Migration innerhalb des Embryos mit der somatischen Keimdrüsen-Organanlage fusionieren (Matova und Cooley, 2000). Lange Zeit wurde angenommen, dass die Germinal Granules die determinierenden Komponenten der Keimzellen enthalten, was aufgrund von Versuchen an *Drosophila melanogaster* erhärtet wurde. Die Embryonen, deren Germinal Granules entfernt wurden, bildeten keine Polzellen, die späteren Keimzellen, aus (Lehmann und Nüsslein-Volhard, 1991). Bis dato wurden bereits mehrere Komponenten der Germinal Granules identifiziert, auf die in einem späteren Kapitel genauer eingegangen wird (2.3.2).

2.1.3 Die Oogenese von *Xenopus laevis*

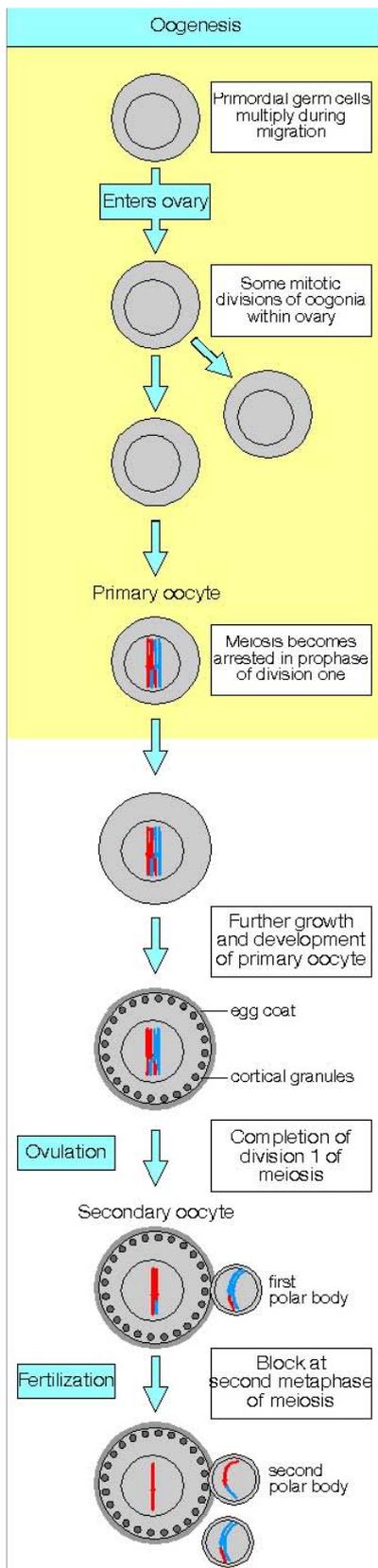


Abbildung 2-6 Schematische Darstellung der Oogenese (mun.ca). Aus einer diploiden Urkeimzelle im Embryo, entsteht eine sekundäre diploide reife Eizelle und ein Polkörperchen. Erst nach der Befruchtung wird die Arretierung in der Metaphase II aufgehoben und die Meiose vollendet.

Die Oogenese unterscheidet sich in mehrfacher Hinsicht von der Spermatogenese. Neben der Entstehung eines haploiden Chromosomensatzes muss ein Vorrat für die frühe Embryogenese in der Eizelle angelegt werden. Schon während der Embryogenese teilen sich diploide, primordiale Keimzellen mitotisch. Nach der Einwanderung in die Gonaden werden die Zellen, die sich weiterhin mitotisch teilen, als Oogonien bezeichnet. Im folgenden Entwicklungsabschnitt treten die reifenden Keimzellen in die Meiose ein. Die primären Oozyten sind nun in Prophase I der Meiose arretiert und reifen im erwachsenen Weibchen bis zu Stadium VI Oozyten heran, bis durch Progesteron die Eiablage veranlasst wird und die Zellen die Meiose I abschließen und in Metaphase II der Meiose arretiert werden. Nach der Befruchtung wird die Meiose II beendet und der Embryo entwickelt sich.

Der Prozess, in dem aus Oogonien reife Oozyten entstehen, wird als Oogenese bezeichnet. Sie ist in sechs Stadien unterteilt (Dumont 1972) und verläuft in adulten Fröschen asynchron, d.h. dass alle Oozytenstadien zu jedem Zeitpunkt nebeneinander im Ovar vorliegen (Abbildung 2-5 und 2-7). Die Oogonien stellen die Stammzellpopulation dar. Während der Oogenese sind die Oozyten in der Prophase I der Meiose arretiert. Stadium I Oozyten sind prävitellogen, weisen einen Durchmesser von ca. 300µm auf und besitzen eine besondere Struktur, den Bb (2.3.1). Dadurch, dass prävitellogene Oozyten transparent sind und gegenüber somatischen Zellen eine enorme Größe aufweisen, eignen sie sich besonders gut für die Mikroinjektion und die in vivo Beobachtung unter dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (CLSM). Die Vitellogenese setzt ab Stadium II der Oogenese (\varnothing 450µm) ein und schreitet in den Stadien III-V weiter voran. Außerdem werden die Oozyten immer deutlicher pigmentiert und entlang der animalen/vegetativen Achse (A/V-Achse) polarisiert. Stadium VI Oozyten weisen einen Durchmesser von ca. 1,2mm auf und können durch Progesteronstimulierung zu einem Ei heranreifen (King et al., 2005).



Abbildung 2-7 Die Oozytenstadien von *Xenopus laevis* nach Dumont (1972) (Smith et al., 1991).

Die Pigmentierung markiert den dunklen animalen und den hellen vegetativen Pol einer Oozyte sehr deutlich. Die vegetative Hemisphäre enthält mehr Dotter, weshalb der Zellkern in die animale Hälfte der Oozyte gedrängt wird (Danilchik und Gerhart, 1987). Außerdem sind einige maternale mRNAs nicht gleichmäßig in der Oozyte verteilt, sondern in bestimmten Regionen angereichert. RNAs, die in der animalen Hemisphäre konzentriert werden, sind dort homogen verteilt, wohingegen RNAs am vegetativen Pol durch Verankerung mit dem Zytoskelett räumlich konzentriert angereichert werden (King, 1995). Die Asymmetrie der reifen Oozyten (A/V-Achse) stellt die Basis für die Entwicklung der drei Keimblätter und der Differenzierung der Keimzellen im späteren Embryo dar (King et al., 2005).

Während des Diplotäns (Prophase I) kommt es zur Ausbildung von sogenannten Lampenbürstenchromosomen. Diese Chromosomen stellen Orte besonders aktiver RNA-Synthese dar und sind gut im Lichtmikroskop zu erkennen. Zahlreiche Gene der Oozyten werden während der Oogenese aktiv transkribiert, um den Ablauf von Stoffwechselprozessen und oozytenspezifischen Vorgängen zu ermöglichen und um einen Vorrat an mRNAs für den frühen Embryo bereitzustellen, bevor die Transkription des embryonalen Genoms zum Zeitpunkt der Midblastula-Transition beginnt (Gilbert, 2003). Während der Oogenese werden, neben mRNAs auch tRNAs und rRNAs synthetisiert. Die Transkription aller tRNAs und rRNAs, die bis zum Midblastula-Stadium des Embryos benötigt werden, sowie sämtlicher maternalen mRNAs, findet bereits in den frühen Oozytenstadien statt. Nach Erreichen des Oozytenstadiums VI werden die Chromosomen kondensiert und die Transkription kommt zum Erliegen. Nach hormoneller Stimulierung beendet eine reife Oozyte die erste meiotische Teilung und reift zu einem Ei heran, das mit einer schützenden Gallerthülle umgeben und abgelaicht wird. Das Ei ist in der Metaphase II der Meiose arretiert. Die zweite meiotische Teilung wird erst nach der Befruchtung abgeschlossen. Die synthetisierten RNAs dienen dem Embryo bis zur Midblastula als Grundlage der Entwicklung, da dessen Gene erst ab diesem Stadium aktiviert werden (Newport and Kirschner, 1982).

Während der Oogenese werden auch Proteine translatiert. Die Proteinsyntheserate erhöht sich um mehr als das 100-fache zwischen Stadium I und Stadium VI Oozyten (Taylor and Smith, 1985).

2.2 Die Polarisierung der Oozyte

Im Laufe der Oogenese wird die Oozyte entlang ihrer animal/vegetativen Achse (A/V-Achse) polarisiert, d.h. es gibt verschiedene Merkmale, die Pole bzw. Hemisphären voneinander zu unterscheiden. Der markanteste Unterschied wird durch Pigmentgranula verursacht, die ab Stadium III im animalen Kortex akkumulieren und diesen dunkel färben (King et al., 2005). Wie schon beschrieben, wird der Dotter verstärkt in der vegetativen Hemisphäre angereichert und verschiebt den Zellkern in die animale Hälfte (Danilchik und Gerhart, 1987). Der Golgi Apparat, sowie ein Vorrat an Mikrotubuli und Tubulin sind auf der vegetativen Seite des Zellkerns positioniert (Gard, 1991), ebenso wie das Keimplasma, das am vegetativen Kortex akkumuliert (Hausen und Riebesell, 1991). Zahlreiche RNAs und Proteine konnten bereits identifiziert werden, die spezifisch in einer Hemisphäre der reifen Oozyte lokalisieren. Die Komponenten des Keimplasmas, die Germinal Granules, sind am vegetativen Kortex lokalisiert und enthalten Proteine und RNAs, die über drei Signalwege an den Pol transportiert werden: Den „Early“- und den „Late-pathway“, sowie eine dritte Variante, die die Mechanismen der beiden Signalwege kombiniert (2.3.3-2.3.5).

2.3 RNA Lokalisierungs-Mechanismen

Die maternalen Genprodukte, die in *Xenopus* Oozyten während der Oogenese synthetisiert werden, dienen nicht ausschließlich für das schnelle Wachstum des Embryos, sondern vielmehr als Grundlage für regionale Unterschiede innerhalb der Zelle. So werden z.B. viele mRNAs in bestimmte Regionen der Oozyte transportiert und dort gelagert, um zu einem späteren Zeitpunkt eine hohe und effiziente Translationsrate der Proteine zu ermöglichen (Kloc et al., 2002a). Viele maternale Genprodukte, darunter kodierende und nichtkodierende RNAs, sind in der Oozyte asymmetrisch verteilt und dienen als Determinanten für bestimmte Entwicklungs- bzw. Differenzierungsvorgänge im Embryo.

Über den Transport und die Anreicherung von RNAs in der animalen Hemisphäre der *Xenopus* Oozyte ist bis dato wenig bekannt. Es wurde festgestellt, dass die RNAs diffus im gesamten Zytoplasma der animalen Hemisphäre verteilt werden und nicht, wie am vegetativen Pol, innerhalb des Zytoskeletts verankert und partiell stark angereichert sind. Im Gegensatz zu zahlreichen vegetativ lokalisierten RNAs werden die RNAs der animalen Hemisphäre nicht asymmetrisch in die Zellen des Embryo verteilt, sondern sind dort ohne regionale Begrenzungen vorzufinden (King et al., 2005). Es wurden bis dato nur wenige animal lokalisierte RNAs, wie z.B. An1-4 oder Fibronectin-mRNA identifiziert, über deren Lokalisierungs- und Transportmechanismen jedoch nichts bekannt ist (King et al., 2005).

Der Transport von RNAs in die vegetative Hemisphäre der *X. laevis* Oozyte wird durch drei Mechanismen vermittelt. Der „Early-pathway“ (auch „METRO-pathway“) ist in frühen Oozytenstadien aktiv und liefert bestimmte RNAs wie *Xcat2* und Germinal Granules zum vegetativen Pol. Der „Late-pathway“ (auch „*Vg1*-pathway“) wird in späteren Oozytenstadien aktiviert und transportiert mit Hilfe von Mikrotubuli und MT-abhängiger molekularer Motoren RNAs wie *Vg1* (Protein der TGF- β -Wachstumsfaktorfamilie) und *VegT* (T-box Transkriptionsfaktor) zum vegetativen Pol der Oozyte (Forristall et al., 1995; Kloc und Etkin, 1995). Der dritte Signalweg, der „Intermediate-pathway“, verwendet eine Kombination aus „Early- und Late-pathway“ um RNAs wie z.B. *fatvg* (Genfamilie, die Funktionen im Vesikeltransport aufweisen) zum vegetativen Pol der Oozyte zu transportieren (Chan et al., 1999, 2001). Das vegetative Zytoplasma enthält, wie bereits erwähnt, keimbahnspezifische Determinanten, darunter eine Gruppe von RNAs (Houston und King, 2000a), deren Lokalisation durch die bereits erwähnten komplexen Transport-Signalwege zeitlich und räumlich gesteuert werden. Diese Mechanismen beziehen bestimmte Signalsequenzen

innerhalb der RNAs, das Zytoskelett, einige Motorproteine und spezifische Transportorganellen ein (Kloc und Etkin, 2005). Ein wichtiges Transportorganell stellt hierbei der Bb bzw. der dort enthaltene, vegetativ lokalisierte „message-transport-organizer“ (METRO-Region) dar.

2.3.1 Der Balbiani Body (Bb) oder Mitochondrial Cloud (MC)

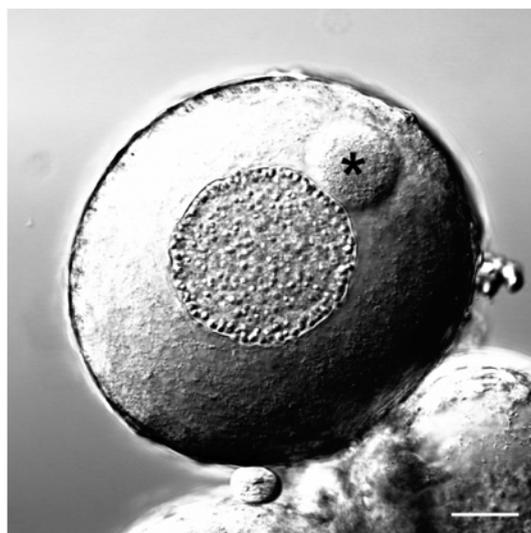


Abbildung 2-8 Nomarski-Interferenz-Aufnahme (DIC) einer prävitellogenen *Xenopus* Oozyte. Der Bb (gekennzeichnet mit *) ist im Zytoplasma im direkten Kontakt zur Kernhülle lokalisiert. Eichstrich: 50µm.

Diese Struktur, die in Oozyten zahlreicher Spezies vorkommt, wurde erstmals 1845 in Spinnenoozyten (z.B. *Tegenaria domestica*) beschrieben. Später wurde sie auch in Oozyten verschiedener Invertebraten und Vertebraten (auch *Homo sapiens*) entdeckt (de Smedt et al., 2000; Guraya, 1979; Heasman et al., 1984; Kloc et al., 2004a). Lange Zeit wurde angenommen, dass in Oozyten der Maus kein Bb existiert und dieser Organismus eine Ausnahme unter den Säugetieren darstellte (De Smedt et al., 2000; Kloc et al., 2004a). Pepling et al. beschrieb 2007 erstmals das Vorhandensein eines Bb in Oogonien neugeborener Mäuse sowie in primordialen Oozyten.

In Maus unterscheidet sich die Zusammensetzung des Bbs deutlich von der in Organismen, wie z.B. *Xenopus*. Hier wird die Struktur auch als MC bezeichnet (Billett and Adam, 1976), welche die enorme Ansammlung von Mitochondrien widerspiegelt. In Maus dagegen besteht der Bb hauptsächlich aus Golgi Membranstapeln und nur aus wenigen Mitochondrien (Kloc et al., 2008).

Über die Entstehung des Bbs ist wenig bekannt. Man weiß von Insekten, dass die Ausbildung des Bb um die Zentriolen herum, die sich in der Nähe der Zytoplasmabrücke zweier Oozyten befinden, abläuft (Kloc et al., 2008). In *Drosophila* konnte beobachtet werden, dass sich die Struktur schon während der Entstehung des primären Oogoniums aus mehreren Vorstufen bildet (Cox und Spradling, 2003; Kloc et al., 2004b). Vor kurzem wurde das erste Gen identifiziert, das eine entscheidende Rolle bei der Formation des Bb in Zebrafisch spielt, das *bucky ball* Gen. In Oozyten von Fischen, bei denen *bucky ball* ausgeknockt wurde, wird kein Bb gebildet und auch die Lokalisierung einiger vegetativer mRNAs findet nicht statt (Marlow und Mullins, 2008).

In *Xenopus* konnten Vorläuferstrukturen identifiziert werden, die als mitochondrialer Zement und granulär fibrilläres Material (GFM) bezeichnet werden (Kloc et al. 2002b). Der Bb ist eine zytoplasmatische Struktur, die sich bereits in Oogonien bildet und in prävitellogenen Oozyten

(Stadium I) in engem Kontakt zur Kernhülle steht (Abbildung 2-8). Im Laufe der Oogenese (Stadium II-IV) dissoziiert der Bb in einzelne Fragmente, die in Richtung vegetativen Pol wandern und dort wahrscheinlich durch Aktinfilamente verankert werden (Kloc et al., 1995, 2004a). Über die Wanderung der Bb-Fragmente ist ebenfalls wenig bekannt, sie verläuft allerdings ohne die Beteiligung von Mikrofilamenten (Kloc et al., 2004a). Es wird vermutet, dass dies durch passive Bewegungen, verursacht durch zytoplasmatische Strömungen, geschieht (Kloc und Etkin, 1995).

In Stadium I Oozyten von *Xenopus laevis* weist der Bb einen Durchmesser von ca. 40µm auf und besteht aus bis zu 500.000 Mitochondrien (Marinos and Billett, 1981) (Abbildung 2-9), die sich in ihrer Morphologie, der Enzymaktivität und ihren Replikationseigenschaften von anderen zytoplasmatischen Mitochondrien unterscheiden. Deshalb wird vermutet, dass der Bb keimbahn-spezifische Mitochondrien besitzt, die innerhalb des Keimplasmas des Embryos in die primordialen Keimzellen (PGC) gelangen (D'Herde et al., 1995; Marinos und Billett, 1981; Mignotte et al., 1987; Tourte et al., 1981, 1984).

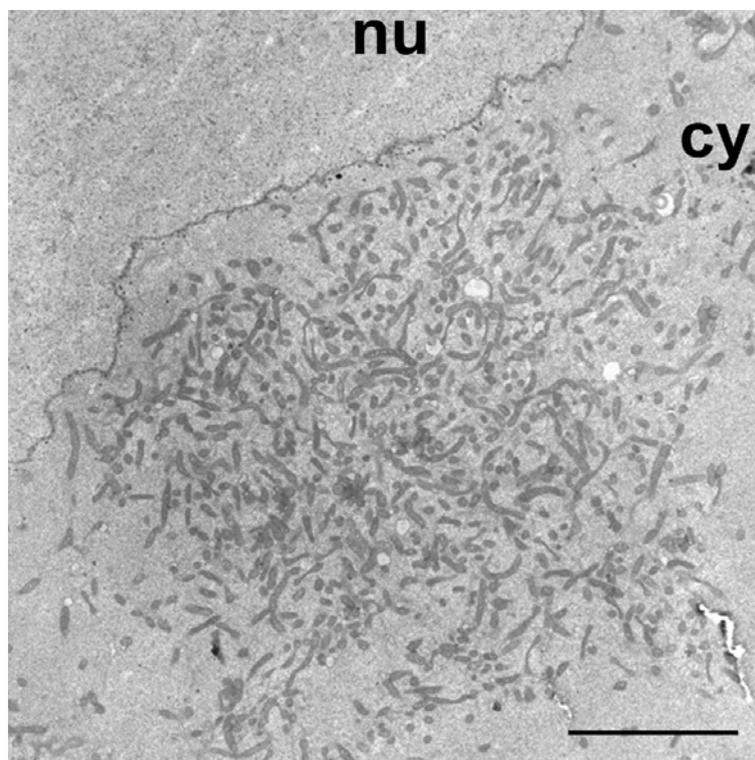


Abbildung 2-9 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Bb in prävitellogenen *Xenopus* Oozyten. nu: Nukleoplasma; cy: Zytoplasma. Eichstrich: 5µm.

Neben den Mitochondrien enthält der Bb rauhes endoplasmatisches Retikulum, mehrere Golgi Zisternen und Lipidtropfen (Kloc et al., 2001). Die vegetative Spitze des *Xenopus* Bb, die METRO-Region („messenger-transport-organizer“), enthält Germinal Granules und zahlreiche lokalisierte RNAs (Kloc und Etkin, 1995; Forristall et al., 1995; Heasman et al., 1984; Kloc et al., 2004a). Die Lokalisation von RNAs in den Bb ist ebenfalls unabhängig von Mikrofilamenten und geschieht vermutlich durch Diffusion und Retention der Moleküle (Kloc et al., 1996; Chang et al., 2004).

Nachdem lange über die Funktion des Bb spekuliert wurde, konnte schließlich 1993 gezeigt werden, dass es sich um ein Organell handelt, das lokalisierte RNAs zum vegetativen Pol der Oozyte transportiert (Kloc et al., 1993).

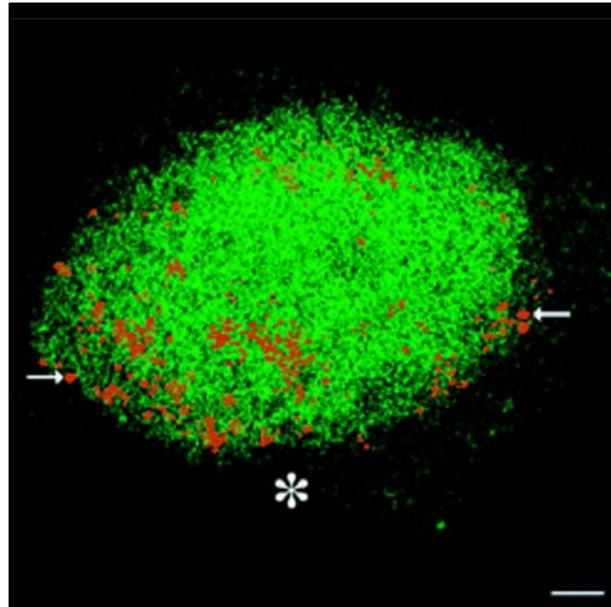


Abbildung 2-10 Bb einer Stadium I Oozyte von *Xenopus laevis* (grün). Dreidimensionale Rekonstruktion einer Oozyte, die mit einer METRO-lokalisierenden RNA-Probe hybridisiert wurde (*Xcat2*). Die Rekonstruktion wurde coloriert: rote Punkte stellen Germinal Granules dar. Die METRO-Region ist durch einen (*) gekennzeichnet (Kloc et al., 2005). Die Pfeile weisen auf Germinal Granules. Eichstrich: 6µm.

2.3.2 Keimplasma und Germinal Granules

In vielen Spezies wie *C. elegans*, *Drosophila*, Zebrafisch und *Xenopus* wird die Keimbahn durch Vererbung von speziellem Zytoplasma, dem Keimplasma determiniert. Dieses Keimplasma enthält elektronendichte Strukturen, die je nach Spezies als P granules (*C. elegans*), polar granules (*Drosophila*, Zebrafisch und Huhn) und Germinal Granules (*Xenopus laevis*) bezeichnet werden. Diese Strukturen sind nicht durch eine Membran umhüllt, enthalten aber viele RNAs und Proteine und sind mit Mitochondrien assoziiert (Houston und King, 2000a; Raz, 2000).

In *Xenopus* bildet sich das Keimplasma in prävitellogenen Oozyten innerhalb des Bb (Heasman et al., 1984). Der Bb wandert dann im Laufe der Oogenese zum vegetativen Pol und dissoziiert in zahlreiche „Islands“, die dort im Zytoskelett verankert werden. Kurz nach der Befruchtung und während der ersten Zellteilungen des Embryos aggregiert das Keimplasma in einige wenige „small Islands“ (Savage und Danilchik, 1993). In der Blastula konzentriert sich das Keimplasma auf vier bis fünf primordiale Keimzellen (PGCs), die sich in der endodermalen Masse befinden. Dort durchlaufen die PGCs bis zum Schwanzknospenstadium einige Zellteilungen und beginnen dann entlang der dorsalen Mesenterien zu ihrem Bestimmungsort zu wandern, der somatischen Gonadenanlage (King et al., 1999). Wird das Keimplasma experimentell aus Oozyten entfernt, verursacht dies eine abnormale Wanderung der Keimzellen, eine Verringerung der Anzahl der Keimzellen oder eine völlige Sterilität des Embryos (Dixon, 1994; Saffman und Lasko, 1999; Houston und King, 2000a; Kloc et al., 2001a). Das Keimplasma in frühen prävitellogenen Stadium I Oozyten enthält eine Vorläuferstruktur der Germinal Granules, das sogenannte granulofibrilläre Material (GFM), das wiederum aus sogenanntem mitochondrialem Zement entsteht. Diese Vorläuferstruktur bildet sich bereits in Oogonien im sich bildenden Bb (Heasman et al., 1984; Kloc et al., 2000).

In *Xenopus* Oozyten befindet sich das Keimplasma in der METRO-Region des Bbs. Neben den Germinal Granules enthält es zahlreiche kodierende und nichtkodierende RNAs wie z.B. *Xcat2*, *Xlirt*, *DEADSouth* (Mosquera et al., 1993; Forristall et al., 1995; Kloc und Etkin, 1995) *Xpat*, *Xdazl*, *Xwnt11* (Forristall et al., 1995; Kloc und Etkin, 1995; Houston et al., 1998; Houdson und Woodland, 1998) und *fatVg* (Chan et al., 2001), sowie mitochondriale rRNA (Iida und Kobayaschi, 1998; Kobayaschi et al., 1993, 1998; Kashikawa et al., 2001).

Das Keimplasma und die Germinal Granules entstehen bei *Xenopus* während der Oogenese (Al-Mukhtar und Webb, 1971; Billet und Adam, 1976; Coggins, 1973; Heasman et al., 1984). Es wird vermutet, dass das Keimplasma eine Arte Nischenstruktur darstellt, die bestimmte Keimzellkomponenten vor dem Einfluss durch somatische Faktoren schützt (Dixon et al., 1994). Außerdem wird angenommen, dass es sich um ein Organell handelt, das bestimmte Moleküle während der Entwicklung speichert und erst zu einem späteren Zeitpunkt aktiviert (Kloc et al., 2002b).

2.3.3 „Early-pathway“ (METRO-pathway)

Der „Early-pathway“ findet bei *Xenopus* während der frühen Oogenese in den Oozytenstadien I und II statt und transportiert Germinal Granules, zahlreiche RNAs (z.T. keimbahnspezifisch) und Mitochondrien innerhalb des Bbs zum vegetativen Pol der Oozyte (Heasman et al., 1984; Forristal et al., 1995; Kloc et Etkin, 1995). Das letztendliche Ziel des „Early-pathway“ ist es, kodierende und nichtkodierende RNAs, die essentiell für die Keimzellentwicklung des späteren Embryos sind, in einem bestimmten, subzellulären Bereich innerhalb des Bb (METRO-Region) zu sammeln. Diese Region wird dann zunächst zum vegetativen Kortex der Oozyten transportiert, um später, während der embryonalen Zellteilungen, asymmetrisch auf die primordialen Keimzellen (PGCs) aufgeteilt zu werden. Die zu lokalisierenden RNAs, die sich innerhalb der keimplasmaformenden METRO-Region des Bbs befinden, können im Keimplasma bzw. den Germinal Granules über Monate, sogar Jahre gespeichert werden (Houston and King, 2000a und 2000b; MacArthur et al., 1999). Deshalb dient das Keimplasma auch als Langzeitspeicherort für RNAs während der Oogenese (King et al., 2005).

Bis dato konnten zahlreiche, über den „Early-pathway“ transportierte RNAs identifiziert werden. Darunter befinden sich unter anderem *Xcat2* und *Xlirts* (Zinkfinger-Proteine, DEAD-box-Familie, nanosähnlich) (Mosquera et al., 1993; Forristall et al., 1995; Kloc und Etkin, 1995), *Xdazl* (DAZ-like Gen), *Xpat* (Xenopus primordial germ cell associated transcript) und *Xwnt11* (Wnt-like Gen) (Forristall et al., 1995; Kloc und Etkin, 1995; Houston et al., 1998; Houdson und Woodland, 1998). Aus anderen Organismen sind homologe, gleichlokalisierende RNAs (z.B. Nanos in *Drosophila*) (Wharton und Struhl, 1991) bekannt, auf die hier aber nicht näher eingegangen wird.

Über die Mechanismen, wie RNAs in die METRO-Region des Bb gelangen, ist wenig bekannt. Es wurden z.B. sogenannte „cis-acting“-Elemente (LEs) in der 3'UTR von *Xcat2*-mRNA und der nichtkodierenden *Xlirt* RNA in *Xenopus* Oozyten identifiziert, die die RNAs in den Bb leiten (Allen et al., 2003; Kloc et al., 1993; Zhou and King, 1996). Außerdem wurde bereits erwähnt, dass die RNA-Lokalisierung in den Bb ohne Beteiligung von Mikrofilamenten und Mikrotubuli verläuft und wahrscheinlich durch Diffusion und Einfangen zustande kommt (Kloc et al., 2004a). Neuere Experimente lassen vermuten, dass ER-Vesikel ebenfalls am Einfangen von RNAs mit Bb-Lokalisierungselementen beteiligt sein könnten (Chang et al., 2004). Im weiteren Verlauf des „Early-pathway“, in Stadium II Oozyten, wandert der Bb in Richtung vegetativem Pol und beginnt zu dissoziieren. In Stadium III-IV Oozyten löst sich der

Bb schließlich auf und die Germinal Granules sowie die lokalisierten RNAs werden am vegetativen Kortex verankert (Kloc and Etkin, 2005).

2.3.4 „Late-pathway“

Eine wichtige Funktion des „Late-pathways“ ist es, mesodermale und endodermale Keimblattdeterminanten in der vegetativen Hemisphäre zu lokalisieren (Nieuwkoop, 1969). So werden z.B. *VegT* (T-box Transkriptionsfaktor) oder *Vg1* (Protein der TGF β -Wachstumsfaktorfamilie), die beide essentiell für die Ausprägung des Endoderms und Mesoderms sind, mit Hilfe des „Late-pathways“ transportiert (King et al., 2005). Im Gegensatz zum „Early-pathway“, über den hauptsächlich RNAs transportiert werden, leitet der „Late-pathway“ auch zahlreiche Proteine sowie RNAs in die vegetative Hemisphäre der Oozyte (Claußen, Horvay und Pieler, 2004).

„Late-pathway“ lokalisierte RNAs sind in Stadium I Oozyten von *Xenopus* gleichmäßig im Zytoplasma verteilt wobei keine Anreicherung im Bb zu beobachten ist (Melton, 1987; Forristall et al., 1995; Kloc und Etkin, 1998). Wenn in späten Stadium II Oozyten von *Xenopus* die „Early-pathway“ transportierten RNAs lokalisiert sind, beginnen die „Late-pathway“ geleiteten RNAs in einer keilförmigen Subregion des ER (in Kontakt zum Bb) im vegetativen Zytoplasma zu akkumulieren (Deshler et al., 1997; Kloc and Etkin, 1998). In den nun folgenden Oozytenstadien III-IV der Oogenese werden die RNAs zum vegetativen Kortex transportiert und dort bis zum Ende der Oogenese fest mit dem kortikalen Zytoskelett (Aktinfilamente und Zytokeratin) verankert (Forristall et al., 1995; Kloc und Etkin, 1995; Alarcon und Elinson, 2001). „Late-pathway“ RNAs nehmen dort einen größeren Bereich ein als „Early-pathway“ RNAs, die in einem sehr begrenzten Areal an der Spitze des vegetativen Pols verankert sind (Betley et al., 2002; Chan et al., 1999).

Im Gegensatz zum „Early-pathway“ benötigt der „Late-pathway“ ein intaktes Mikrotubuli-Zytoskelett (Yisraeli et al., 1990). Es gibt Hinweise darauf, dass Motorproteine wie Kinesin I und II den Transport einiger „Late-pathway“ RNAs vermitteln (Yoon and Mowry, 2004; Betley et al., 2004). Auch bei den RNAs, die mit Hilfe von Mikrotubuli lokalisiert werden, wurden LEs in der 3'-UTR (häufig), in der 5'-UTR (selten) und in beiden Regionen gefunden (Kloc und Etkin, 2005). Des Weiteren werden zahlreiche RNA-bindende Proteine benötigt, die mit den LEs interagieren und so die jeweilige RNA mit den Mikrotubuli und den molekularen Motoren koppeln (Kloc und Etkin, 2005).

2.3.5 „Intermediate pathway“

Es gibt einige Hinweise darauf, dass es neben den beiden schon beschriebenen RNA-Lokalisierungsmechanismen (2.3.3 und 2.3.4), einige vegetativ lokalisierte RNAs gibt, die mit Hilfe beider Signalwege transportiert werden (Chan et al., 1999; Pannese et al., 2000; Chan et al., 2001; Zearfoss et al., 2004). Diese RNAs sind sowohl im Bb (während der frühen Oogenese) als auch in der keilförmigen Subregion des ER (in den Oozytenstadien III-IV) angereichert und weisen Funktionen in der Determinierung der Keimbahn aber auch in der Differenzierung von somatischen Zellen auf. Ein Beispiel hierfür stellt die RNA *fatvg* dar, die sowohl im Keimplasma als auch in den sich entwickelnden Fettkörpern vorhanden ist (Chan et al., 2001). Bis dato ist nicht eindeutig geklärt, ob solche RNAs durch einen sogenannten und eigenständigen „Intermediate-pathway“ lokalisiert werden, oder ob dies durch die sequentielle Aktivierung beider Signalwege („Early- und Late-pathway“) geschieht.

Mittlerweile wird angenommen, dass „Early-pathway“ lokalisierte RNAs auch durch die „Late-pathway“-Maschinerie lokalisiert werden können, was Mikroinjektionsexperimente mit

mRNAs von *Xcat2* (Zhou und King, 1996), *Xpat* (Hudson und Woodland, 1998) und *Xsirts* (Allen et al., 2003) in Stadium III Oozyten zeigten. Die genannten RNAs wurden zum vegetativen Pol transportiert, obwohl in diesem Abschnitt der Oogenese der „Early-pathway“ nicht mehr aktiv ist. Des Weiteren weisen die spezifischen LEs früh und spät lokalisierter RNAs Übereinstimmungen in ihren Sequenzen auf (Betley et al., 2002; Bubunenکو et al., 2002; Deshler et al., 1997, 1998; Kwon et al., 2002). Deshalb wird mittlerweile angenommen, dass „Early- und Late-pathway“ gemeinsame zelluläre Faktoren verwenden, die für die Lokalisierung von RNAs benötigt werden (Choo et al., 2005).

2.4 Nuage

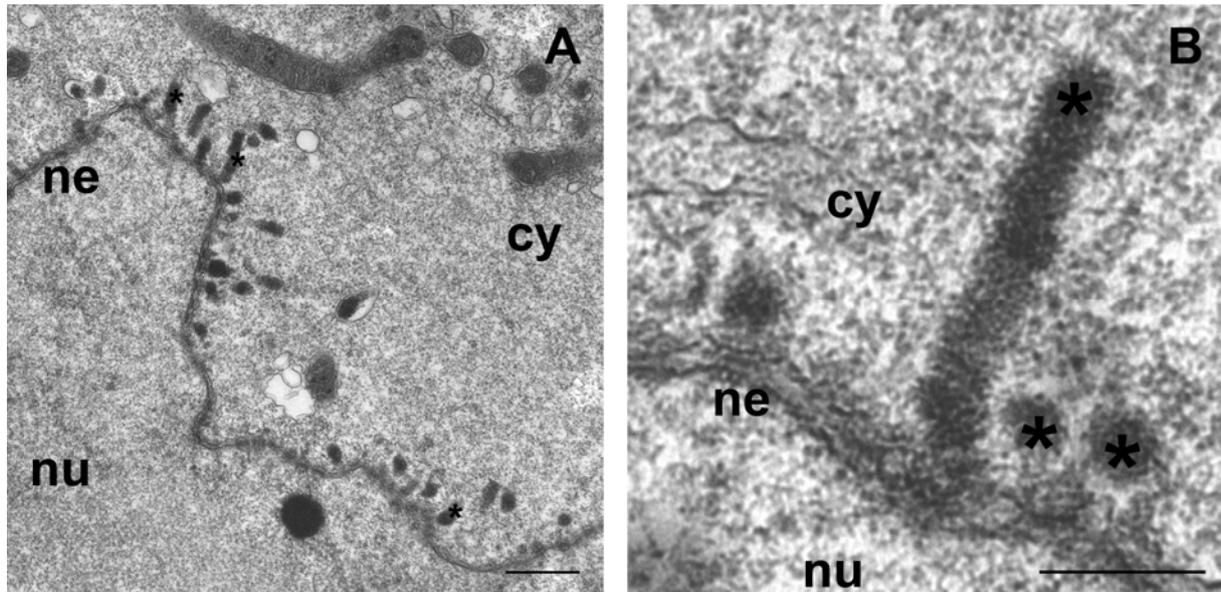


Abbildung 2-11 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Nuage in *Xenopus laevis* Oozyten. (A) Übersichtsaufnahme. (B) Detailvergrößerung: (Nuage ist durch * markiert). ne: Kernhülle; nu: Nukleoplasma; cy: Zytoplasma. Eichstriche: A: 500nm; B: 200nm.

Nuage sind zytoplasmatische, elektronendichte Aggregate, die in Keimzellen zahlreicher Spezies vorhanden sind und in unmittelbarer Nähe der Kernmembran zu finden sind. Ihren Namen, der aus dem Französischen kommt, verdanken sie ihrer wolkenartigen Gestalt (Kloc et al., 2004a). Nuage sind Strukturen, die um den gesamten Zellkern herum gleichmäßig verteilt sind, eine Anreicherung z.B. im Bereich des Bb wurde nicht beobachtet (Bilinski et al., 2004). Obwohl Nuage in Keimzellen vieler Spezies vorkommen, bleibt deren Rolle und Funktion bis heute unbekannt.

Als Nuage wird auch bei *Xenopus* das elektronendichte Material bezeichnet, das sich im perinukleären Bereich befindet, oder gerade die Kernpore passiert (Kloc et al., 2004a). Es wird spekuliert, dass es sich um eine Vorläuferstruktur der Germinal Granules handeln könnte (Eddy, 1975; Kloc et al., 2004a; Saffman und Lasko, 1999). Demnach entstehen Nuage im Zellkern und sind folglich die Entstehungsquelle der Ribonukleoproteine (RNPs), die für die Entwicklung der Germinal Granules benötigt werden (Eddy, 1975; Biggiogera et al., 1990; Kloc et al., 2001b; Mahowald, 2001; Pitt et al., 2000). Nach dieser These könnte auch *Xenopus* Nuage beim Export von RNPs aus dem Nukleo- in das Zytoplasma eine Rolle spielen, was für Keimzellen von *C. elegans* und für Spermatozyten der Maus bereits postuliert wurde (Barbee et al., 2002; Chuma et al., 2003).

Nuage wurden in zahlreichen Spezies untersucht. Auffällig dabei ist, dass sich die Zusammensetzung in unterschiedlichen Organismen ähnelt, d.h. dass viele Protein- und

RNA-Homologe organismusübergreifend in Nuage-Strukturen nachgewiesen werden konnten. So wurde z.B. das Protein Vasa (DEAD-box RNA-Helikase) (Raz, 2000) in *Drosophila*-Nuage identifiziert; in *Medaka* wurde das Olvas-Protein (Vasa-like) nachgewiesen (Shinomiya et al., 2000; Nagao et al., 2008). In *Danio rerio* (Zebrafisch) konnte *vasa* RNA, aber nicht Vasa Protein in Nuage nachgewiesen werden (Knaut et al., 2000). In *Xenopus* Nuage konnte bis dato weder homologe *vasa* RNA, noch Vasa Protein identifiziert werden. Lediglich die RNA des Vasa-ähnlichen Proteins *XVLG1* (*Xenopus vasa-like gene1*) konnte in *Xenopus* Embryonen in primordialen Keimzellen perinukleär lokalisiert werden (Ikenishi et al., 1996). In *C. elegans* und Maus wurden Sm-Proteine und kleine nukleäre Ribonukleoproteine (snRNPs) als Bestandteile der Strukturen identifiziert (Barbee et al., 2002; Chuma et al., 2003). In *Xenopus* konnten zwar Sm-Proteine, jedoch keine snRNPs in den Nuage nachgewiesen werden (Bilinski et al., 2004). Es wird angenommen, dass diese Komponenten, neben dem Spleißen von mRNA, zusätzliche Funktionen aufweisen, und dass Nuage eine Vorstufe für die Entstehung von zytoplasmatischen RNPs darstellen, die für die korrekte Lokalisierung vieler mRNAs in die Germinal Granules benötigt werden (Barbee et al., 2002; Chuma et al., 2003; Findley et al., 2003).

Über den Entwicklungsvorgang der Nuage zu Germinal Granules gibt es bis heute keine fundierten Kenntnisse, es wurden lediglich Modelle aufgestellt (z.B. in Bilinski et al., 2004). In Abbildung 2-12 ist die hypothetische Bildung der Germinal Granules als Schema dargestellt. Demnach assoziieren spezifische mRNAs wie *Xcat2* (gelbe Punkte) mit Sm-Proteinen (rote Punkte) und werden durch die Kernporen in das Zytoplasma transportiert. Dort werden sie unmittelbar in Nuage (1) eingebaut, die sich von der Kernhülle lösen und eine kugelige Gestalt (2) im Zytoplasma annehmen. Anschließend akkumulieren Nuage und Mitochondrien zu sogenannten Nuage-Mitochondrien-Komplexen (3), die auf dem Weg zum Bb in kleinere Einheiten dissoziieren, die als mitochondrialer Zement (4) bezeichnet werden. Zu diesem Zeitpunkt lösen sich die Sm-Proteine aus den Komplexen und werden zurück in den Zellkern importiert (roter Pfeil). Der mitochondriale Zement wird weiter Richtung Bb transportiert und wird dort in granulofibrilläres Material (GFM) (5) umgewandelt. Andere RNAs wie z.B. *DEADSouth* werden assoziiert und die Strukturen reifen zu Germinal Granules (6) heran (Bilinski et al., 2004).

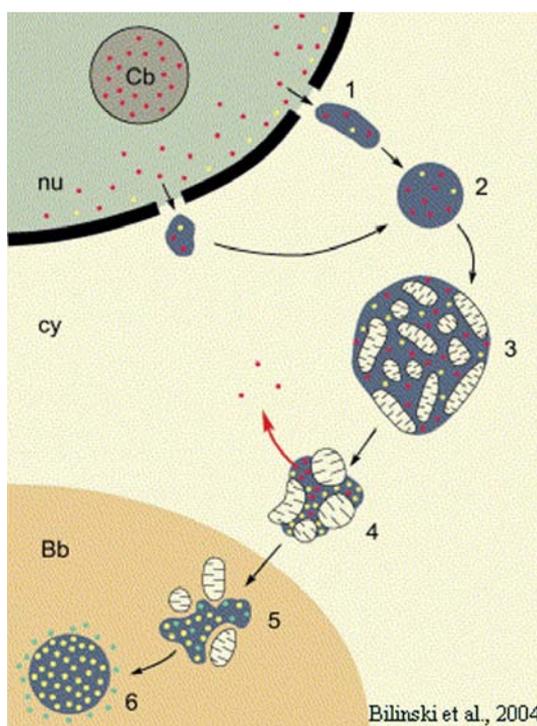


Abbildung 2-12 Modell zur Entstehung der Germinal Granules aus Nuage in *Xenopus* Oozyten (Bilinski et al., 2004). (1): Nuage; (2): kugelige Nuage im Zytoplasma; (3): Nuage-Mitochondrien-Komplex; (4): mitochondrialer Zement; (5): Granuläres fibrilläres Material (GFM); (6): Germinal Granules. nu: Nucleolus; cy: Zytoplasma; Bb: Basalmembran; Cb: Cajal body.

Durch Versuche mit der Marker-mRNA *Xcat2* konnte gezeigt werden, dass das granulofibrilläre Material tatsächlich die Vorläuferstruktur der Germinal Granules darstellt (Kloc et al., 2002b). Obwohl schon 1984 von Heasman et al. die Vermutung geäußert wurde, dass sich GFM aus perinukleärem Nuage entwickelt, fehlen bis heute adäquate Marker, um diese Annahme zu bestätigen. So wurde bis dato auch noch keine Komponente identifiziert, die sowohl in Nuage als auch in den Vorläufern (z.B. GFM) und in den Germinal Granules selbst vorkommen.

2.4.1 Chromatoid Body (CB)

Die Keimzellen des adulten Männchens zahlreicher Spezies enthalten eine charakteristische Struktur, die als CB bezeichnet wird (Kalt, 1973; Kerr und Dixon, 1974). Erstmals wurde die Struktur 1891 von Benda aufgrund lichtmikroskopischer Beobachtungen beschrieben. Wie bei Nuage handelt es sich um eine einzigartige wolkenartige Struktur, die aus dünnen Filamenten besteht, die sich zu einer kompakten Masse verdichtet haben (Fawcett et al., 1970). Während der Meiose, im Pachytän meiotischer Spermatozyten bis hin zum Stadium der postmeiotischen Spermatiden, wird im Zytoplasma von Säugern der CB gebildet und kondensiert (Fawcett et al., 1970). Früher wurde vermutet, dass sich der CB innerhalb des Zellkerns (Benda, 1891; Moore, 1893, 1894; Regaud, 1910) oder der Nukleolen (Lenhossek, 1898; von Ebner, 1899; Fischer, 1899; Duesberg, 1908) bildet, heute weiß man aber, dass er im Zytoplasma, in den Zwischenräumen mitochondrialer Cluster, entsteht (Fawcett et al., 1970).

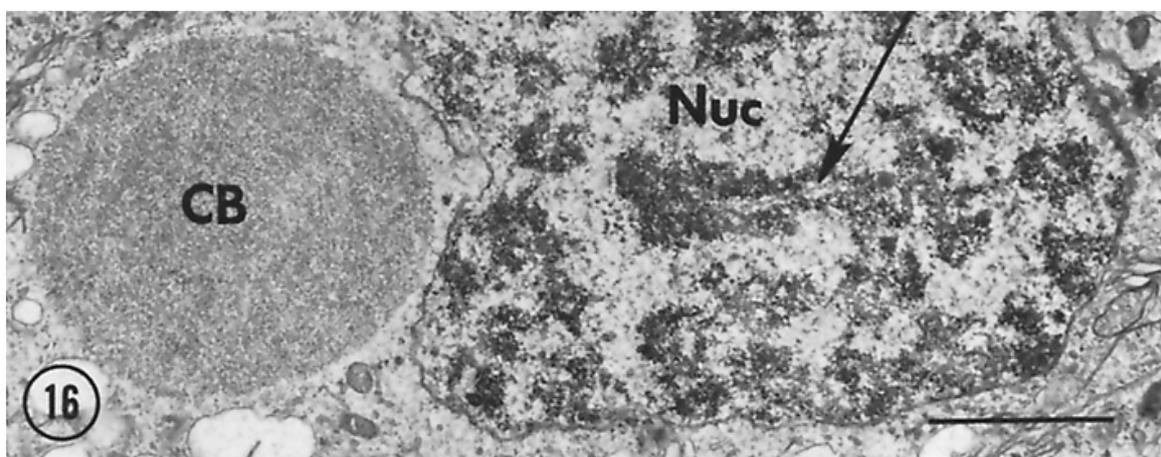


Abbildung 2-13 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer *Xenopus* Spermatozyte. Der CB befindet sich in unmittelbarer Nähe des Zellkerns. Nuc: Nukleus; CB: CB. Vergrößerung: x 19000. (Kalt, Pinney und Graves, 1975).

Das Markerprotein für Keimzellen, die DEAD-box RNA Helikase Vasa wurde, wie im Keimplasma von *Drosophila*, auch im CB der Maus gefunden (Fujiwara et al., 1994; Raz, 2000). In runden Spermatiden der Maus konnten im CB Komponenten des miRNA Signalweges nachgewiesen werden (Kotaja et al., 2006). Außerdem wurden dort Arginin- und polysaccharidreiche Proteine identifiziert (Daoust und Clermont, 1955; Krimer und Esponda, 1980). Anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen wird vermutet, dass der CB auch nukleäres Material enthalten könnte, da er häufig mit Kernporen assoziiert ist (Fawcett et al., 1970; Soderstrom und Parvinen, 1976; Parvinen und Parvinen, 1979). Auffällig ist die Dynamik der Struktur in Spermatiden. In diesen Keimzellen bewegt er sich in einem aktiven Prozess in verschiedenen Ebenen um den Zellkern herum (Parvinen und

Parvinen, 1979, Ventela et al., 2003). Der CB kann über zytoplasmatische Brücken in benachbarte Zellen gelangen, man nimmt an, dass dadurch ein Materialaustausch stattfinden kann. Außerdem sind Mikrotubuli an der Bewegung des CB beteiligt, da eine Behandlung der Zellen mit Mikrotubuli-depolymerisierenden Substanzen einen abrupten Abbruch der Dynamik zur Folge hat (Ventela et al., 2003). Die Funktion des CB konnte bis heute nicht geklärt werden, angenommen wird aber, dass es sich um ein Organell handelt, welches in post-transkriptionelle Prozesse involviert ist und spezifische mRNAs speichert. Die mRNAs werden in einem späten Keimzellstadium, wenn das Genom inaktiviert wurde, translatiert. Anhand all dieser Erkenntnisse wird vermutet, dass der CB in männlichen Keimzellen das Pendant von Nuage in Oozyten darstellt (Parvinen, 2005).

Zu erwähnen ist noch die Existenz von mehreren Nuage-Typen, die in männlichen Keimzellen identifiziert wurden und z.B. in der Ratte als Chromatoid satellites, sponge bodies und spherical particles bezeichnet werden (Fawcett et al., 1970; Russell and Frank, 1978). Ob es sich hierbei um Homologe zu Nuage in Oozyten handelt, konnte unter anderem aufgrund von fehlenden zytologischen Markern bis dato nicht geklärt werden (Pan et al., 2005).

2.5 Sm- und LSm-Proteine

Die Gruppe der Sm-Proteine wurde nach Stephanie Smith, einer Patientin mit einem systemischen Lupus erythematosus benannt. Bei ihr wurden erstmals anti-Sm Autoimmunantikörper gefunden. Die vom Auto Serum erkannten Antigene wurden als Sm-Proteine bezeichnet (Tan und Kunkel, 1966).

Sm-Proteine und Sm-ähnliche Proteine (LSm) gehören zur gleichen konservierten Familie von RNA-assoziierten Proteinen in Eukaryoten und sind essentielle Komponenten des Spleißosoms. Sieben Sm-Proteine B/B', D1, D2, D3, E, F und G sind in die Bindung von U snRNA, und dadurch an der Bildung von U snRNPs (Will und Lührmann, 2001) und am Prozess des Spleißens beteiligt (Zhang et al., 2001). Sm- und LSm-Proteine besitzen hohe Sequenzhomologien und auch die dreidimensionale Faltung der Proteine weist eine hohe Ähnlichkeit auf (Kambah et al., 1999; Achsel et al., 2001, Mura et al., 2001). Das Spleißen der prä-mRNA wird durch das Spleißosom katalysiert. Dieser makromolekulare Komplex besteht aus jeweils vier U snRNPs: U1, U2, U4/U6 und U5. Ein snRNP setzt sich aus entweder einer U1, U2 und U5, oder zwei U4/U6 snRNA und einer Gruppe von Proteinen (Sm oder LSm) zusammen. Diese Gruppe von Proteinen besteht entweder aus den Sm-Proteinen B/B', D1, D2, D3, E, F und G, (für U1, U2 und U5 snRNPs) oder aus den LSm-Proteinen (für U4/U6 snRNPs) (Achsel et al., 1999; Seraphin, 1995). Die Sm- und die LSm-Proteine dienen im Spleißosom hauptsächlich als Strukturkomponenten (Achsel et al., 1999; Zhang et al., 2001). Zunächst werden U snRNAs im Zellkern synthetisiert und im Anschluss über Kernporen in das Zytoplasma exportiert. Dort sind bereits die Sm-Proteine gespeichert, die dann an bestimmten Sequenzmotiven der U snRNAs (Sm-site) binden und die heteroheptamerische Sm-Coredomäne bilden. Diese Domäne muss ausgebildet sein, damit im Anschluss eine Hypermethylierung der m⁷G-Kappe zu einer Trimethylguanosinkappe (m₃G-Kappe) der jeweiligen U snRNA stattfinden kann. Danach wird das modifizierte Partikel in den Zellkern importiert, wo weitere Proteine bei der Bildung eines funktionsfähigen snRNPs behilflich sind (Fischer und Lührmann, 1990; Chari et al., 2008). Die Bildung der Coredomäne ist ATP-unabhängig, jedoch sind noch andere Proteine, wie SMN Proteine (survival of motor neuron) und Gemin2 daran beteiligt (Fischer et al., 1997; Buhler et al., 1999; Liu et al., 1997). Sm-Proteine binden hierfür an die Tudor-Domäne der SMN Proteine (Buhler et al., 1999; Selenko et al., 2001). Es wird außerdem vermutet, dass symmetrische Dimethylargininmotive einiger Sm- und LSm-Proteine zunächst hypermethyliert werden,

bevor die Bindung an SMN Proteine stattfinden kann, und dadurch wiederum die Bindung an U snRNAs katalysiert wird (Friesen et al., 2001b).

Neben dem Spleißen von mRNA konnten Sm- und LSm-Proteinen weitere Funktionen zugeordnet werden. So sind Sm-Proteine funktionelle Bestandteile der Telomerase in Hefe (Seto et al., 1999). Im selben Organismus beschleunigt ein Komplex von LSm-Proteinen den Abbau von mRNAs und wird zur Prozessierung von rRNAs und tRNAs benötigt (Bouveret et al., 2000; Tharun und Parker, 2001; Tharun et al., 2000; Beggs, 2005). In *C. elegans* wird den Sm-Proteinen eine Rolle bei der Lokalisierung des Keimplasmas in der frühen Embryogenese zugeordnet, da sie mit Germinal Granules kolokalisieren und eine Verringerung der Proteinkonzentration in einer Misslokalisierung und Missverteilung der Germinal Granules resultiert (Barbee et al., 2002). Mittlerweile konnten auch in Nuage von *Xenopus* und im CB der Maus Sm-Proteine nachgewiesen werden, so dass vermutet wird, dass eine Rolle bei der Keimzeldeterminierung speziesübergreifend konserviert sein könnte (Moussa et al., 1994; Chuma et al., 2003; Bilinski et al., 2004). Bei *Xenopus* wird postuliert, dass zahlreiche Sm-Proteine die mRNAs, die als Komponenten der Germinal Granules identifiziert wurden, binden und beim Export der RNA-Moleküle aus dem Zellkern in Nuage-Strukturen behilflich sind (Bilinski et al., 2004).

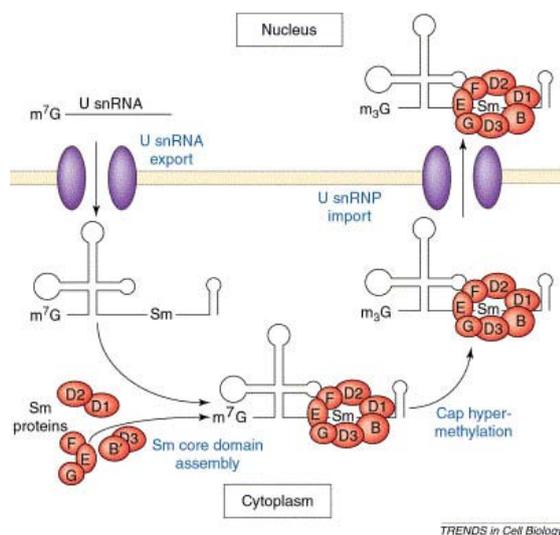


Abbildung 2-14 Biogenese der spleißosomalen U snRNPs. Ein Molekül U snRNA mit einer m⁷G-Kappe wird vorübergehend aus dem Zellkern in das Zytoplasma exportiert. Dort findet, zusammen mit Sm-Proteinen, der Aufbau zur Sm-Coredomäne statt. Die m⁷G-Kappe der U snRNA wird daraufhin zu einer m₃G-Kappe hypermethyliert und anschließend wird das Partikel aktiv in den Zellkern importiert und zu Cajal bodies geleitet. Dort werden die Partikel erneut modifiziert und im Anschluss zu sogenannten speckles transportiert, wo sie als Bestandteil des Spleißosoms ihre Funktion aufnehmen können (Meister, Eggert und Fischer, 2002).

2.6 Proteine mit Dimethylargininmotiven

Argininreste von glycin- und argininreichen Proteinen werden häufig durch Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) postranskriptionell methyliert. Anhand zweier unterschiedlicher Methylierungsmuster der Zielproteine werden PRMTs in zwei Klassen unterteilt: Der Typ I (PRMT1; PRMT3; PRMT4 und PRMT6) kreierte asymmetrische Dimethylreste (aDMA), wohingegen der Typ II (PRMT5 und PRMT7) eine symmetrische Dimethylierung der RG-Reste durchführt (sDMA) (Boisvert et al., 2005; Gary und Clarke, 1998; McBride, 2001; Lee et al., 2005). Die aDMA stellt dabei die weitaus häufigere Proteinmodifizierung dar und spielt bei mehreren zellulären Prozessen wie dem Transport, der Signaltransduktion und der Transkription eine wichtige Rolle (Najbauer und Aswad, 1990; McBride und Silver, 2001; Kouzarides, 2002; Boisvert et al., 2005;). Sehr viel seltener kommt es zu einer sDMA, wie z.B. bei myelin basic protein (MBP), SmD1 und D3, oder LSm4 (Brahms et al., 2001) und bei coilin (Brahms et al., 2000; Herbert et al., 2002). Über die Funktion der symmetrischen Dimethylarginin-Modifikationen ist nach wie vor wenig bekannt.

PRMT5 ist Bestandteil des sogenannten Methylosoms, welches beim Aufbau der snRNPs aus Sm-Proteinen und U snRNAs beteiligt ist (Paushkin et al., 2002; Fischer et al., 1997; Meister et al., 2001; Meister und Fischer, 2002; Massenet et al., 2002; Pellizzoni et al., 2002). Interessanterweise binden Sm-Proteine leichter an die Tudor-Domänen der SMN-Proteine, die auch eine Rolle bei der Entstehung von snRNPs spielen, wenn sie sDMA-Motive aufweisen (Friesen et al., 2001a; Friesen et al., 2001b; Meister und Fischer, 2002; Brahms et al., 2000; Brahms et al., 2001).

Anhand von Versuchen mit dem *Drosophila*-Ortholog von PRMT5, Dart5, wurde herausgefunden, dass die Dimethylierung der Sm-Proteine keine Auswirkungen auf die Biogenese der snRNPs hat, aber die Reifung der Oozyten und der Spermien gestört ist. Deshalb wird vermutet, dass Sm-Proteine mit sDMA-Motiven eine wichtige Rolle in der Determinierung der Keimzellen spielen (Gonsalvez et al., 2006). Sm-Proteine mit sDMA-Motiven binden während der Bildung der snRNPs besser an die Tudor-Domäne der SMN-Proteine. In Nuage von *Drosophila* und der Maus konnte das Protein Tudor (*Drosophila*) bzw. MTR-1 (Maus-Tudor-Repeat-gene1) als Komponente identifiziert werden (Anne und Mechler, 2005; Snee und MacDonald, 2004; Chuma et al., 2003). In Maus konnte sogar eine Bindung von MTR-1 an Sm-Proteine nachgewiesen werden (Chuma et al., 2003), wohingegen Sm-Proteine noch nicht in Nuage von *Drosophila* lokalisiert werden konnten. Anders als bei *Drosophila*, konnten Tudor-Orthologe, im Gegensatz zu Sm-Proteinen, bis dato noch nicht in *Xenopus* Nuage nachgewiesen werden. Es aber wird angenommen, dass Proteine mit Tudor-Domänen (wie z.B. Tudor bei *Drosophila*) mit sDMA-Resten der Sm-Proteine interagieren, und dass dies für die Keimzellentwicklung einer Embryos essentiell ist (Gonsalvez et al., 2006).

Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch die Methylierung der Sm-Proteine durch PRMT5, eine Bindung an Tudor ermöglicht bzw. erleichtert und das Protein, das bei der Keimplasmaentstehung *downstream* von Oskar und Vasa wirkt, dadurch funktionsfähig wird (Bardsley et al., 1993; Ephrussi und Lehmann., 1992; Arkov et al., 2006).

2.7 Der Elongationsfaktor 1A

Der eukaryotische Elongationsfaktor 1 alpha (eEF1A, im Folgenden als EF1A bezeichnet) stellt eine von vier Untereinheiten des eukaryotischen Elongationsfaktors 1 dar und ist in einer normal wachsenden Zelle das zweithäufigste Protein nach Aktin (Browne und Proud., 2002; Ejiri, 2002). Während der Proteinsynthese katalysiert er in einem GTP-abhängigen Vorgang die Bindung von Aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) an die A-Stelle des Ribosoms (Ejiri, 2002; Moldave, 1985). Allerdings besitzt EF1A weitere Aufgaben, die nicht mit dem Translationsprozess in Verbindung gebracht werden können. Das Protein wird als „moonlighting protein“ (Ejiri, 2002) bezeichnet, d.h. dass es zahlreiche Funktionen innerhalb der Zelle besitzt, die abhängig von seiner zellulären Lokalisation, von der Konzentration seiner Liganden, Substrate und Kofaktoren sind (Jeffery, 1999). So wurde EF1A bereits als aktinbindendes Protein identifiziert, das in der Lage ist, F-Aktin zu bündeln (Yang et al., 1990; Yang und Boss, 1994); außerdem besitzt es mikrotubulistabilisierende und destabilisierende Eigenschaften (Durso und Cyr, 1994; Shiina et al., 1994); ihm wird eine Vermittlerrolle bei der Signaltransduktion zugesprochen (Kim et al., 1999); es fiel eine erhöhte Expression von EF1A in zahlreichen Tumoren auf (Adams et al., 1992; Anand et al., 2002; Edmonds et al., 1996; Grant et al., 1992; Tomlinson et al., 2005); und EF1A scheint außerdem eine Rolle bei der Apoptose zu spielen, da seine Expression durch p53 (Kato, 1999; Kato et al., 1997), oder oxidativen Stress (Chen et al., 2000; Duttaroy et al., 1998) hochreguliert werden kann.

EF1A gehört zur Familie der G-Proteine, die eine große Superfamilie regulatorischer Proteine darstellen und hohe Übereinstimmung in ihrer Primärstruktur und der Organisation des funktionellen Zentrums aufweisen (Bourne et al., 1991; Dever et al., 1987; Kubarenko et al., 2005). Sie werden in drei Klassen unterteilt: 1. Ras-ähnliche GTPasen; 2. G_{α} -Untereinheiten heteromerer G-Proteine und 3. Translationselongationsfaktoren (Infante et al., 2008). G-Proteine erfüllen zahlreiche Aufgaben zellulärer Prozesse, wie z.B. bei der Signaltransduktion, bei der Reorganisation des Zytoskeletts, dem Vesikeltransport und der Proteinsynthese. Der GTPase-Zyklus der G-Protein-Superfamilie beginnt mit der Bindung von GTP und endet mit der Hydrolyse von GTP zu GDP. Andere regulatorische Proteine, wie z.B. Guaninaustauschfaktoren werden benötigt, um Konformationsveränderungen der Elongationsfaktoren während des GTPase-Zyklus zu ermöglichen (Bourne et al., 1990).

EF1A wird fortlaufend aus dem Kern somatischer Zellen und Keimzellen ausgeschlossen (Calado et al., 2002). Da EF1A-Proteine Translationsfaktoren darstellen, muss deren geringer Einstrom in das Nukleoplasma sofort wieder rückgängig gemacht werden. Es muss unbedingt verhindert werden, dass es zu Translationsereignissen innerhalb des Zellkerns kommt, wo sich unreife mRNAs befinden, deren Expression zu nicht funktionellen oder fehlerhaften Proteinen führen würde. Es wurde herausgefunden, dass EF1A als Substrat des Exportkomplexes RanBP21/Exp5 unmittelbar nach Eintritt in das Nukleoplasma über aa-tRNAs an Exp5 gebunden und dadurch sofort aus dem Zellkern exportiert werden kann (Bohnsack et al., 2002). Dieser Exportweg erhöht damit auch zusätzlich die Menge an exportierten aa-tRNA-Molekülen. Somit könnte ein gewisser Einstrom von EF1A zugunsten des Exp5-Exportmechanismus von der Zelle toleriert werden, um damit effizienter aa-tRNAs aus dem Nukleoplasma in das Zytoplasma zu transportieren (Bohnsack et al., 2002; Großhans et al., 2000).

EF1A interagiert des Weiteren mit dem Zytoskelett, indem es an Mikrotubuli und Aktinfilamente und Monomere bindet (Murray et al., 1996). Die Bindung an sowohl F- als auch an G-Aktin ist ungewöhnlich und über ihre Funktion konnte bis heute nur spekuliert werden. Es wird davon ausgegangen, dass EF1A die Struktur und die Synthese des Aktin-Zytoskeletts beeinflussen kann und dadurch Transportprozesse und die Translation von mRNA auf Aktinfilamenten beeinflusst, unter Umständen sogar steuert (Murray et al., 1996).

2.8 Die Isoformen des Elongationsfaktors 1A

Eukaryoten besitzen eine unterschiedliche Anzahl an EF1A-Genen. In Mais wurden zwischen 10-15 (Carneiro et al., 1999) und in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zwei EF1A-Gene identifiziert. In tierischen Organismen wurden bei *Drosophila* zwei EF1A-Gene entdeckt, von denen eines nur in bestimmten Entwicklungsstadien exprimiert wird (Hovemann et al., 1988). In Säugetieren existieren zahlreiche Genloci, bei denen es sich bei den meisten um Pseudogene handelt (Lund et al., 1996; Madsen et al., 1990; Uetsuki et al., 1989). Tatsächlich wurden bei Mensch (Brands et al., 1986; Knudsen et al., 1993), Maus (Lee et al., 1994; Lu und Werner., 1989), Ratte (Ann et al., 1992; Ann et al., 1991; Lee et al., 1993; Shirasawa et al., 1992) und Kaninchen (Cavallius und Merrick, 1992; Kahns et al., 1998) nur zwei EF1A-Gene identifiziert, die aktiv transkribiert werden (EF1A1 und EF1A2). EF1A1 wird ubiquitär in zahlreichen Geweben exprimiert, wohingegen EF1A2 Protein hauptsächlich in der Skelettmuskulatur, im Gehirn und im Herzen vorkommt (Knudsen et al., 1993; Lee et al., 1993; Kahns et al., 1998; Lee et al., 1992; Khalyfa et al., 2001).

Bei den Knochenfischen, wie z.B. *Danio rerio* (Zebrafisch) oder *Oryzias latipes* (Japan. Reisfisch) existiert nur jeweils ein transkribiertes EF1A-Gen (Gao et al., 1997; Kinoshita et al., 1999). Der Plattfisch *Senegalese sole* weist erstaunlicherweise fünf EF1A-Gene auf, bezeichnet als SseEF1A1 bis -4 und Sse42Sp50, die alle funktionelle EF1A Proteine

codieren. SseEF1A1 wurde als das Pendant von EF1A1 und SseEF1A2 als das Pendant von EF1A2 der Säugetiere identifiziert. SseEF1A3 und -4 sind vermutlich das Ergebnis von Genduplikationen in der jüngeren Evolution des Plattfisches, da in anderen Knochenfischen und auch in Säugetieren keine ähnlichen Genloci gefunden werden konnten. Orthologe des Sse42Sp50-Gens konnten zwar in anderen Knochenfischen und Amphibien wie *Xenopus laevis* identifiziert werden; dennoch konnte in Säugetieren kein Pendant identifiziert werden, so dass davon ausgegangen wird, dass es sich hierbei um ein Gen handelt, das in der frühen Entwicklung der Landwirbeltiere verloren ging (Infante et al., 2008).

Das Genom von *Xenopus laevis* enthält drei funktionsfähige Genkopien von EF1A und EF1A-ähnlichen Genen und zusätzlich eine Vielzahl von untranskribierten Pseudogenen. Es konnten drei funktionell aktive EF1A-Gene identifiziert werden: 1. die Oozytenvariante (EF1A-O); 2. die somatische Form (EF1A-S) und 3. die 42Sp50-Form. Aus der Literatur geht hervor, dass jedes EF1A-Gen in unterschiedlichen Geweben und Entwicklungsstadien des Tieres exprimiert wird. EF1A-O-mRNA soll demnach hauptsächlich in männlichen und weiblichen Keimzellen transkribiert werden und ist im Embryo noch bis zum Stadium der Neurulation nachweisbar. EF1A-S-mRNA ist in embryonalen und adulten Zellen vorhanden und kaum existent in Oozyten. Die 42Sp50-mRNA konnte dagegen nur in Oogonien und frühen Oozytenstadien nachgewiesen werden (Abdallah et al., 1991; Dje et al., 1990; Krieg et al., 1989). Die Proteinexpression der drei Varianten wurde ebenfalls untersucht und es stellte sich heraus, dass sich die drei Isoformen hinsichtlich ihrer Lokalisation und Expression in zahlreichen Zell- und Gewebetypen unterscheiden. EF1A-O-Protein wird anhand der bisherigen Erkenntnisse vor allem in Oozyten, aber auch im frühen Embryo gefunden. EF1A-S-Protein findet man dagegen nur in geringen Konzentrationen in Oozyten, und in hohen Konzentrationen in somatischen Zellen vor. Das Protein 42Sp50 liegt demnach ausschließlich in prävitellogenen Oozyten vor und konnte in somatischem Gewebe (z.B. Leber) nicht identifiziert werden (Dje et al., 1990). Über die Lokalisation der drei Proteine wurden auch Erkenntnisse gewonnen: EF1A-O ist im Bb in Stadium I Oozyten lokalisiert und ist in Stadium II Oozyten uniform im Zytoplasma verteilt (Viel et al., 1990). EF1A-S, das hauptsächlich in somatischen Zellen vorkommt, bildet dort ein diffuses Proteinnetzwerk im Zytoplasma (Calado et al., 2002). 42Sp50 ist anhand bisheriger Erkenntnisse in Stadium I Oozyten homogen im Zytoplasma verteilt. Es konnte außerdem beobachtet werden, dass die Proteinkonzentration während der Oogenese dramatisch abfällt (Viel et al., 1990). Aufgrund der ähnlichen Antigeneigenschaften ist es allerdings schwierig, die einzelnen Isoformen biochemisch voneinander zu unterscheiden, obwohl veröffentlicht wurde, dass 42Sp50, im Gegensatz zu EF1A-O und EF1A-S, eine etwas höhere elektrophoretische Mobilität aufweist. Im Proteingel liegt demnach das apparente Molekulargewicht von 42Sp50 bei ca. 50kDa, das von EF1A (O- und S-Form) dagegen bei ca. 53kDa (Viel et al., 1991).

EF1A-O und EF1A-S weisen eine hohe Sequenzhomologie auf und entsprechen den EF1A-Proteinen anderer Spezies. EF1A-S weist zudem die größten Homologien zu den Elongationsfaktoren EF1A1 und EF1A2 der Säuger auf. Nach bisherigen Erkenntnissen transferieren alle drei EF1A-Varianten in *Xenopus laevis* aa-tRNA zu den Ribosomen, wobei vermutlich jede Proteinvariante spezifisch in bestimmten Zelltypen agiert (Dje et al., 1990). Zusätzlich dazu kann 42Sp50 mit anderen Komponenten des 42S Ribonukleoproteinpartikels interagieren, dessen Funktion die Speicherung von tRNA und 5S rRNA darstellt (Mairy und Denis, 1972).

2.9 Das 42S Ribonukleoproteinpartikel (42S RNP)

Das 42S RNP ist ein Ribonukleoproteinpartikel, das in prävitellogenen Oozyten von *Xenopus laevis* vorkommt und vor allem zur Speicherung von 5S rRNA und tRNAs dient. Das Partikel

wurde, neben der Entdeckung in Anuren, außerdem noch in Oozyten von Urodelen (*Triturus cristatus*) (Malcolm und Sommerville, 1977) und von Knochenfischen (*Tinca tinca*) (Denis et al., 1980) identifiziert. Das 42S RNP setzt sich aus vier identischen Untereinheiten zusammen. Jede Untereinheit besteht wiederum aus drei Molekülen tRNA, einem Molekül 5S rRNA, zwei Molekülen des 50 kDa Proteins 42Sp50 (Thesaurin a) und einem Molekül des 40kDa Proteins 42Sp43 (Thesaurin b) (Picard et al., 1980). Neben der Speicherfunktion spielt das 42S RNP auch eine Rolle bei der Translation, da es aa-tRNA zum Ribosom transferieren kann (Le Maire und Denis, 1987). Diese Aufgabe erfüllt in somatischen Zellen normalerweise der EF1-Proteinkomplex (Mattaj et al., 1987). Zumindest in einem zellfreien Ansatz ist das 42S RNP in der Lage, tRNAs zu acetylieren und in einem GTP- und mRNA-abhängigen Prozess aa-tRNAs auf ein Ribosom zu transferieren (Le Maire und Denis, 1987; Wegnez und Denis, 1979).

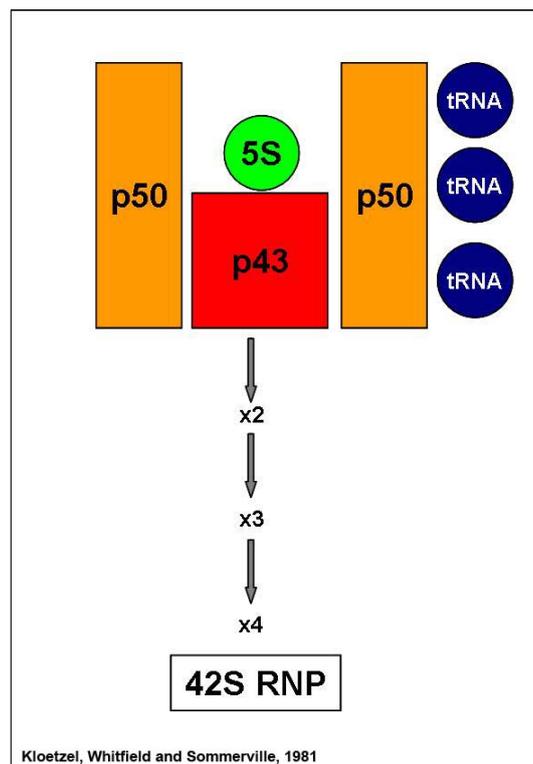


Abbildung 2-15 Das 42S Ribonukleoproteinpartikel, das tRNA und 5S rRNA speichert, ist in *Xenopus* ausschließlich in jungen Oozyten vorhanden und dissoziiert zu Beginn der Vitellogenese.

Bei 42Sp43 und 42Sp50 handelt es sich um divergierte Formen eines Transkriptions- bzw. Translationsfaktors. 42Sp43 ist ein Zinkfingerprotein und weist große Ähnlichkeiten zum Transkriptionsfaktor IIIA auf, bindet jedoch nur an 5S rRNA und spielt keine Rolle bei der Transkription. Im Gegensatz dazu bindet TFIIIA sowohl an 5S rRNA als auch an 5S rRNA Gene (Joho et al., 1990). In prävitellogenen Oozyten ist der größte Teil der 5S rRNA-Moleküle aufgrund der Bindung an die TFIIIA und 42Sp43 in 7S und 42S RNPs komplexiert und liegt nicht frei in der Zelle vor. *Xenopus* Oozyten weisen im Gegensatz zu somatischen Zellen eine große Anzahl an 5S rRNA Genen auf. Diese oozytenspezifischen Gene werden zu Beginn der Oogenese aktiv transkribiert, noch bevor die anderen ribosomalen rRNAs exprimiert werden. Die enormen Mengen an 5S rRNA Molekülen müssen in der Oozyte solange gespeichert werden, bis die ribosomale Synthese beginnt (Allison et al., 1995). Deshalb wird die 5S rRNA in frühen Oozyten zur Speicherung in das Zytoplasma transportiert und dort in RNPs an Proteine gebunden. In späteren Stadien der Oogenese

wird es zurück in den Zellkern bzw. den Nukleolus importiert, um dort als RNA-Bestandteil in die große Ribosomenuntereinheit eingebaut zu werden (Johnson et al., 1984).

Wie bereits unter 2.8 beschrieben, handelt es sich bei 42Sp50 um eine Isoform des Proteins EF1A, das an tRNA bindet und durch weitere Interaktionen zur Stabilisation des 42S RNPs beiträgt. Dies wurde durch Sequenzanalysen und auch durch biochemische Untersuchungen bestätigt.

42Sp43 und 42Sp50 stellen den weitaus größten Teil des Proteingehalts prävitellogener Oozyten dar, außerdem können deren mRNAs in prämeiotischen Keimzellen wie Oogonien und Spermatogonien, sowie in Spermatozyten, nachgewiesen werden (Abdallah et al., 1991). Experimente mit *Xenopus* Oozyten ergaben, dass 42Sp50 an tRNA und 42Sp43 an 5S rRNA bindet (Picard et al., 1980; Kloetzel und Whitfield und Sommerville., 1981; Joho et al., 1990). Anhand von Versuchen mit dem Kammolch *Triturus cristatus* wurde gezeigt, dass es auch zu Interaktionen zwischen den beiden Proteinen 42Sp50 und 42Sp43 kommt (Kloetzel und Whitfield und Sommerville, 1981).

Stadium I Oozyten von *Xenopus laevis* enthalten zusätzlich noch ein weiteres 7S Partikel, das aus einem Molekül 5S rRNA und einem Molekül des Transkriptionsfaktors IIIA besteht (Honda und Roeder, 1980; Pelham und Brown, 1980). TFIIIA bindet bereits während der Transkription an 5S rRNA wodurch der Kernexport der 5S rRNA und die Speicherung im Zytoplasma ermöglicht wird. Wenn die Ribosomensynthese beginnt, wird TFIIIA durch das Protein L5 ersetzt und der 5S rRNA/L5-Komplex im Nukleolus in Ribosomen eingebaut (Tafari und Wolffe, 1993).

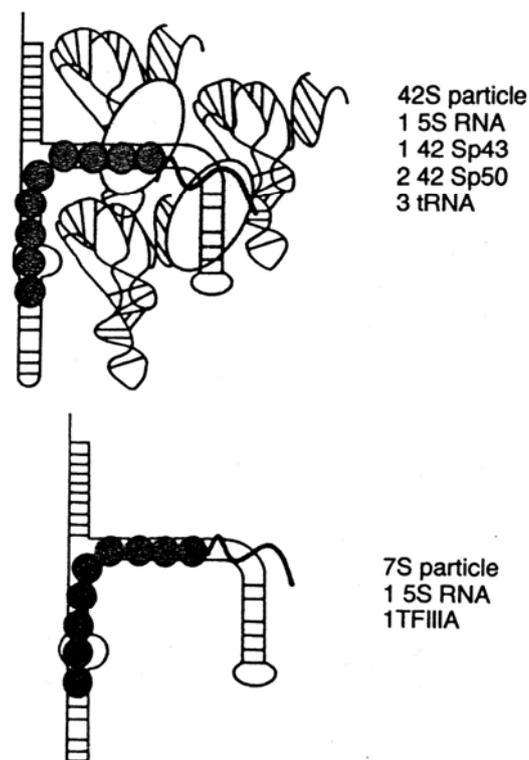


Abbildung 2-16 Schematische Darstellung des 42S und des 7S RNPs in *Xenopus* Oozyten. Stöchiometrische Angaben sind neben den Darstellungen abgebildet. RNA-Moleküle sind durch Linien, Proteine durch Formen gezeichnet.

2.10 Zielsetzung der Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit stand ein institutseigener monoklonaler Antikörper (IV'D4) zur Verfügung, der perinukleäre Strukturen im Zytoplasma prävitellogener *Xenopus* Oozyten markierte. Zunächst sollte geklärt werden, ob es sich bei den markierten Strukturen um keimzellspezifisches Nuage handelte und im Anschluss der Antikörper weiter charakterisiert werden. Dafür mussten zunächst immunzytochemische Experimente auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene durchgeführt werden. Für Vergleichszwecke stand unter anderem auch der Antikörper Y12 zur Verfügung, der Nuage in *Xenopus* markiert (Bilinski et al., 2004). Proteinbiochemische Ansätze erschienen zur Identifizierung des Antigens von IV'D4 und dessen Expression in verschiedenen Geweben und Kulturzellen von *Xenopus* als sehr geeignet. Des Weiteren sollte die Wirkung von Zellgiften (Actinomycin D, Cycloheximid, Leptomycin B und Methyltransferasehemmern) auf die Morphologie der Nuage-Strukturen analysiert werden, um so Näheres über deren Funktion und Dynamik innerhalb der Zelle zu erfahren.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der molekularen Charakterisierung des IV'D4-Antigens, dem Elongationsfaktor 1A. In *Xenopus* existieren hiervon drei Isoformen: EF1A-S; EF1A-O und 42Sp50. Eine bioinformatische Analyse sollte Aufschluss über Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten der Nukleotid-/Proteinsequenzen, Proteindomänen, Molekulargewichte, isoelektrischen Punkte und Phosphorylierungsmuster der EF1A-Varianten geben. Außerdem musste eine RNA-Expressionsanalyse durchgeführt werden, um zu klären welche Isoform in welchem Gewebe und Oozytenstadium exprimiert wird. Anlass dazu gaben widersprüchliche Literaturangaben. Die Expression der Isoformen als Fusionsproteine mit GFP und RFP in Kulturzellen und Oozyten sollte eventuelle Unterschiede in der intrazellulären Verteilung der Proteine aufzeigen. Schließlich waren die *in vivo* Interaktionen zwischen den EF1A-Isoformen und 42Sp43 durch Koexpression der entsprechenden GFP- oder RFP-Fusionsproteine zu untersuchen, mit dem Ziel, Einblicke in die funktionelle Rolle der EF1A-Isoformen bei der Bildung der 42S RNP Speicherpartikel in jungen Oozyten zu erhalten.

3. Material

3.1 Biologisches Material

3.1.1.1 Bakterienstämme

- E.coli M15 (Qiagen)
- E.coli XL 1-Blue (Stratagene)

3.1.2 Zelllinien

COS-7: (*Cercopithecus aethiops*). Fibroblasten-ähnliche Nierenzelllinie von CV-1 Zellen der grünen Meerkatze abgeleitet. Diese Zellen wurden in 90% DMEM mit 10% FCS bei 37° C und 5% CO₂ in Kultur gehalten.

XIKE-A6: (*Xenopus laevis* kidney epithelium, line A6, American Type Culture Collection). Zelllinie aus Nierenepithelgewebe von *Xenopus laevis*. Die Zellen wurden in DMEM mit Earle`s Salzen und 10% FCS bei 27°C kultiviert.

XTC: Die Zelllinie aus embryonalem Gewebe von *Xenopus laevis*. Die Zellen wurden in RPMI mit 20% FCS, 2% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

3.1.3 Tiere

Die südafrikanischen Krallenfrösche *Xenopus laevis* wurden von einer französischen Tierfarm bezogen (*Xenopus Express France*, F-43270 Vernassal, www.xenopus.com) oder stammten aus der institutseigenen Nachzucht.

3.1.4 Antikörper

3.1.4.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Herkunft	Firma
IV'D4	unverdünnt	Maus, monoklonal	Prof. Dabauvalle, Würzburg
anti-EF1A	1:1000 in TBST	Maus, monoklonal	Upstate (Nr: 05-235)
Y12	1:500 in PBS 1:1000 in TBST	Maus, monoklonal	Lerner et al., 1981; Zur Verfügung gestellt von Prof. Fischer, Würzburg
anti-His	1:50 in TBST	Maus, monoklonal	Prof. Zentgraf, Heidelberg
Nup62	1:1000 in TBST	Meerschwein, polyklonal	Ewald et al., 1997
72B9	1:100 in TBST	Maus, monoklonal	Ewald et al., 1997
γ-Tubulin	1:100 in PBS	Maus, monoklonal	Sigma (Nr: T5326)

3.1.4.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Firma
anti-Maus-Peroxidase	1:5000 in 10%iger Milch/TBST	Promega
anti-Maus-Texas Red	1:50 in PBS	Dianova
anti-Maus-Cy2	1:50 in PBS	Dianova
anti-Maus-12nm Gold	1:20 in PBS	Dianova
anti-Maus-1,4nm Gold	1:20 in PBS	Dianova

3.2 Molekularbiologisches Material

3.2.1 Kits und Einzelbestandteile

- ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)
- Amersham ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham)
- E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit I (peqlab)
- Wizard® SV Gel and PCR Cleanup System (Promega)
- Effectene™ Transfection Reagent (Qiagen)
- Lipofectamine™ Reagent (Invitrogen)
- Ni-NTA-Agarose (Qiagen)
- Dynabeads® M-450 Sheep anti-Mouse IgG (Dyna)
- QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)
- TOPO® - Cloning Kit (Invitrogen)
- mMMESSAGE mMACHINE® T7 Kit (Ambion)
- Poly(A) Tailing Kit (Ambion)
- RNeasy Mini Kit (Qiagen)

3.2.2 DNA-Größenstandards

Lambda DNA/EcoRI+HindIII
FastRuler™ DNA Ladder

Marker 3 Fermentas GmbH
Middle Range Fermentas GmbH

3.2.3 Protein-Größenstandards

High-Range-Marker
Low-Range-Marker

Bio-Rad Laboratories GmbH
Bio-Rad Laboratories GmbH

3.2.4 Expressionsvektoren

Die Vektordatenblätter der verwendeten Vektoren sind unter den folgenden Internetadressen zugänglich. Hier werden nur Vektorkarten aufgeführt, die für die Klonierung verändert wurden oder nicht im Internet aufgelistet sind.

3.2.4.1 pBluescript II SK (+),

Dieser Vektor wurde von der Firma Stratagene bezogen. Die MCS wird von einer T7 bzw. T3-Promotor-Region flankiert. Der Vektor wurde zur mRNA-Herstellung für die Mikroinjektion in somatische Zellen und Oozyten verwendet. Positive Bakterienklone können durch Ampicillin-Zugabe identifiziert werden.

Vektordatenblatt: <http://www.stratagene.com/manuals/212205.pdf>, (Stratagene)

3.2.4.2 pCMV-Myc

Auch dieser Vektor enthält ein Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion positiver Bakterienklone. Das sehr kleine c-Myc Epitop-Tag besteht aus 13 Aminosäuren (1,5 kDa) und ist stark immunreaktiv. Hohe Expressionslevel werden in tierischen Zellen durch den menschlichen Cytomegalovirus(CMV)-Promotor erreicht. Durch die SV40-Region des Vektors wird ein Polyadenylierungs-Signal an das entstehende Transkript angefügt. Dieser Vektor wurde zum Anhängen des c-Myc Epitop-Tags an p43 und p50 verwendet, um diese durch Immunfluoreszenz in somatischen Zellen nach der Transfektion nachzuweisen.

Vektordatenblatt: <http://www.clontech.com/images/pt/PT3282-5.pdf>, (Clontech)

3.2.4.3 pCMV-Sport6

Die EST-Klone von p43, EF1A-1 und EF1A-2, die als Basis für alle weiteren Klonierungen dieser Sequenzen dienten, befanden sich in pCMV-Sport6 Vektoren. Sie wurden über das „Deutsche Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH“ bezogen. Der pCMV-Sport6 Vektor besitzt ebenfalls eine Ampicillinresistenz zur Selektion positiver Klone.

Vektordatenblatt: http://www.imagenes-bio.de/info/vectors/pCMV-Sport6_pic.shtml

3.2.4.4 pCR®2.1-TOPO®

Dieser Vektor ist Bestandteil des „TOPO TA Cloning® Kits“ (Invitrogen). Er wurde für eine Klonierung von PCR-Produkten durch Adenosin-Überhänge (AT-Cloning) konzipiert. Der Vektor enthält neben dem Lac-Operon, das eine Blau-Weiß-Selektion transformierter Bakterienklone ermöglicht, eine Ampicillin- und eine Kanamycin-Kassette.

Vektordatenblatt: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr2_1topo_map.pdf, (Invitrogen)

3.2.4.5 pEGFP-N1 bzw. –N2 bzw. –N3

Alle drei Vektoren wurden von der Firma Clontech bezogen. Die drei Vektoren unterscheiden sich lediglich in ihrem Leseraster in Bezug auf die EGFP-Sequenz. Sie ermöglichen die Expression eines Fusionsproteins aus EGFP (enhanced green fluorescent protein) und dem gewünschten Protein in eukaryontischen Zellen. Dabei wird das EGFP an den C-Terminus des gewünschten Proteins fusioniert.

Vektordatenblatt N1: http://www.clontech.com/images/pt/dis_vectors/PT3027-5.pdf

Vektordatenblatt N2: http://www.clontech.com/images/pt/dis_vectors/PT3053-5.pdf

Vektordatenblatt N3: http://www.clontech.com/images/pt/dis_vectors/PT3054-5.pdf, (Clontech)

3.2.4.6 pEGFP-C1 bzw. –C2 bzw. –C3

Der Unterschied zu den N-Vektoren besteht darin, dass das EGFP an den N-Terminus des gewünschten Proteins fusioniert wird. Die drei Vektoren unterscheiden sich ebenfalls lediglich in ihrem Leseraster in Bezug auf die GFP-Sequenz.

Vektordatenblatt C1: http://www.clontech.com/images/pt/dis_vectors/PT3028-5.pdf

Vektordatenblatt C2: http://www.clontech.com/images/pt/dis_vectors/PT3051-5.pdf

Vektordatenblatt C3: http://www.clontech.com/images/pt/dis_vectors/PT3052-5.pdf, (Clontech)

3.2.4.7 pmRFP-N3

Der pmRFP Expressionsvektor wurde durch einen Austausch von EGFP-N gegen mRFP hergestellt. Das Rückgrat des Vektors ist somit identisch mit den pEGFP-N-Vektoren (Clontech). Auch hiervon existieren jeweils drei Varianten, die sich nur in ihrem Leseraster bezüglich der mRFP-Sequenz unterscheiden. Hier wurde nur mit der Variante –N3 gearbeitet.

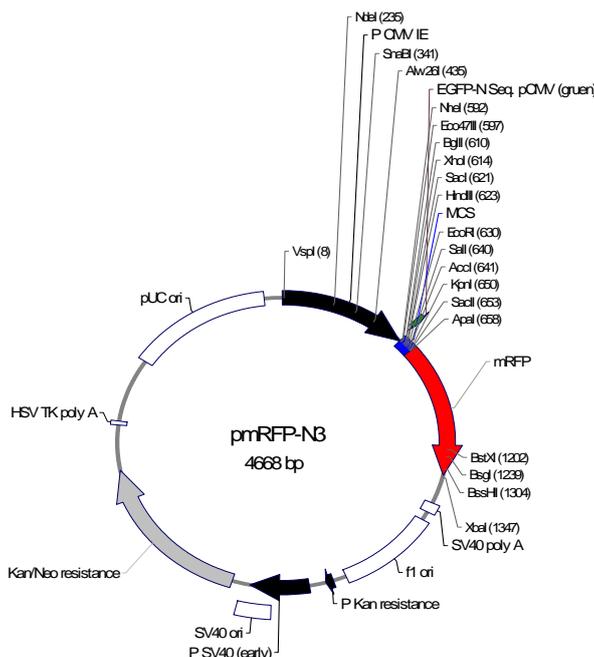


Abbildung 3-1 Vektorinformation des Plasmidvektors pmRFP-N3

3.2.4.8 pDsRed-Monomer-N1

pMDsRed1-N2 kodiert für ein rot-fluoreszierendes Protein (RFP), das für die Expression in Säugerzellen optimiert wurde (Extinktions-Maximum = 558 nm; Emissions-Maximum = 583 nm). Hohe Expressionslevel werden in tierischen Zellen durch den menschlichen Cytomegalovirus (CMV)-Promotor erreicht. Durch die SV40-Region des Vektors wird ein Polyadenylierungs-Signal an das entstehende Transkript angefügt. Gene, die in die MCS kloniert werden, erhalten am Aminoterminus den rot-fluoreszierenden Anhang.

Vektordatenblatt: <http://www.clontech.com/images/pt/PT3795-5.pdf>, (Clontech)

3.2.4.9 pQC6xHis

Dieser Vektor wurde freundlicherweise von Prof. Zentgraf, Heidelberg zur Verfügung gestellt. Dieser Expressionsvektor ist ein Derivat des kommerziell erhältlichen Vektors pQE-8 von Qiagen. Der Vektor wurde im Labor von Prof. Hanswalter Zentgraf verändert, so dass nun am Carboxyterminus des zu exprimierenden Gens sechs Histidinreste angefügt werden. Der Vektor ist für die Expression in Bakterienzellen optimiert und verfügt über eine Ampicillin-Kassette. Durch Zugabe des Induktors Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) wird das Lactose-Operon aktiviert, und das Protein mit dem 6-fachen Histidin-Epitop von den Bakterienzellen exprimiert. Dieser His-Tag ist stark immunreaktiv und sehr gut für eine Proteinaufreinigung über eine Ni-NTA-Säule geeignet.

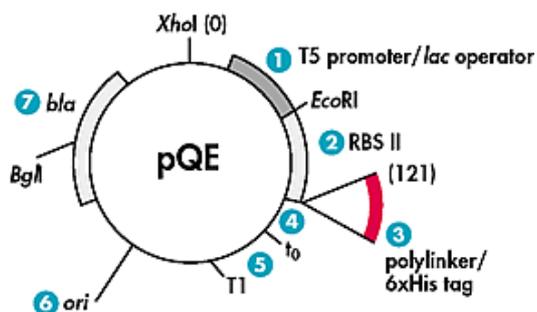


Abbildung 3-2 Vektorinformation des pQC-His Vektors von Prof. Zentgraf

3.2.5 Oligonukleotide

Die für die DNA-Amplifikationen verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden über Thermo Electron, biomers und bionity.com bestellt. Oligo(dT)-Primer für die RT-PCR wurden von der Firma Fermentas GmbH bezogen. Eine Liste der verwendeten Primer ist im Anhang abgebildet (siehe 8.1).

3.2.6 Enzyme

Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Fermentas GmbH
Collagenase Type IA	Sigma-Aldrich
Klenow Fragment	Fermentas GmbH
Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase	Finnzymes
Pfu-DNA-Polymerase	Institutseigene Herstellung
Proteinase K	Serva
Reverse Transkriptase MMULV	Promega
Restriktionsenzyme	div. Fermentas GmbH; New England Biolabs
Ribonuklease Inhibitor	Fermentas GmbH
RNase A	Serva
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Fermentas GmbH
T4-DNA-Ligase	Fermentas GmbH
Taq-DNA-Polymerase	Institutseigene Herstellung
Trypsin	Gibco Life Technologies

3.3 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien und Lösungen in Analysenqualität von folgenden Firmen bezogen: Applichem, Calbiochem, Roth, Merck, Serva, Fluka oder Sigma-Aldrich.

3.4 Geräte

Biophotometer, Eppendorf
 Brutschrank, CO₂-Auto-Zero; Heraeus-Holding
 Drehtisch, regelbar; Heidolph, über Hartenstein
 Elektronenmikroskop Zeiss EM10; Zeiss
 Elektrophorese System für Minigele;cti, über Hartenstein
 Eisbereiter; Scotsman; über Hartenstein
 Feinwaage AC 100; Mettler
 Femtojet; Eppendorf
 Flachbettscanner; Epson Perfection V700 Photo
 Fluoreszenzmikroskop Axiophot Stereo HB050 mit Quecksilberlampe; Zeiss
 Gefriermikrotom 2800 Figocut E; Reichert-Jung
 Gewebekulturschalen; Greiner Labortechnik
 Graphit-Blottingkammer Cti; über Hartenstein
 Heizblock; Liebisch, über Hartenstein
 Hybridisierungsöfen MINI 10; Thermo Hybaid
 Kippschüttler WS5; Edmund Bühler
 Konfokales Laserscanning Mikroskop SP2 (CLSM); Leica Lasertechnik GmbH
 Kühlschrank; Liebherr
 Kühlzentrifuge; Eppendorf
 Kühlzentrifuge RC5B; Sorvall, Du Pont
 Kühlzentrifuge Minifuge RF und GL; Heraeus-Christ
 Laborwaage PB3002 DeltaRange®; Mettler
 Lichtmikroskop (Zellkultur); Leitz
 Magnetrührer M35; GLW
 Netzgerät, stabilisiert; Fischer, über Hartenstein
 pH-Meter pH 525; WTW, über Hartenstein

Pipetten; Eppendorf
Proteingelkammer Mini V8; Gibco BRL
Powersupply ECPS 3000/150; Pharmacia, über Hartenstein
Sequenzierer ABI PRISM™ 310; Genetic Analyser Applied Biosystems GmbH
Schüttler Certomat R und S B.; Braun Biotech International, über Hartenstein
Schwenktisch 3013; GLF, über Hartenstein
Sonifier B12; Branson Sonic Power Company, über Gerhard Heinemann
Stereomikroskop Wild M8; Leica
Sterilbank Steril GARD Hood Class III; Müller Labortechnik
Thermocycler; Peqlab Biotechnologie GmbH
Thermocycler Gradient; Peqlab Biotechnologie GmbH
Thermocycler; TECHNE PROGENE, Über Thermo-Dux
Tiefkühlschrank (-20°C); Privileg, Quelle
Tiefkühltruhe (-70°C) C585; New Brunswick Scientific,
Tischzentrifuge; Sigma Heraeus-Christ
Tischzentrifuge 5414 R, kühlbar; Eppendorf
Ultramikrotom Microm HM500 OM; Zeiss
Ultramikrotom RMC; Tuson, USA
Umkehrmikroskop IM35; Zeiss
UV-Transilluminator Typ IL-350.M; Bachhofer Laboratoriumsgeräte
Vortex L46 GLW; über Hartenstein
Wasserbad WNB22; Memmert

4. Methoden

4.1 Mikrobiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung von Bakterien

- 1l LB-Medium (Luria Bertami):
 - 10 g Bacto™ Trypton (BD)
 - 5 g Hefeextrakt (Roth)
 - 10 g NaCl
 - pH 7.5 (NaOH)
 - autoklavieren
- Antibiotika-Stammlösungen:
 - 100 mg/ml Ampicillin in H₂O bidest.
 - 50 mg/ml Kanamycin in H₂O bidest.
 - 15 mg/ml Tetracyclin in Ethanol (70% p.a.)
 - 34 mg/ml Chloramphenicol in Ethanol (100% p.a.)

4.1.1.1 Plattenkulturen

Zur Herstellung von Agarplatten wurden 1,5% Agar-Agar (Roth) in LB-Medium eingewogen und das Gemisch autoklaviert. Der LB-Agar musste sich nach dem Autoklavieren auf ca. 50°C abkühlen, bevor ein Antibiotikum zugegeben werden konnte. Danach wurde der flüssige Agar so auf Petrischalen verteilt, dass der Boden einer Schale gerade bedeckt war. Nach Erstarren des Agars wurden die Platten umgedreht und über Nacht bei RT getrocknet. So wurde verhindert, dass Kondenswasser auf den Nährboden auftropfte. Die Platten konnten für 3-4 Wochen bei 4°C gelagert werden.

Aus einer Flüssigkultur (4.1.1.2) konnte eine Plattenkultur hergestellt werden, indem 10-100 µl der Kultur mit einem sterilen Drygalski-Spatel auf einer Platte ausgestrichen wurden.

4.1.1.2 Flüssigkulturen

Für eine Übernachtskultur (ÜNK) wurden 5-10 ml LB-Medium in einem Greiner-Röhrchen vorgelegt und je nach verwendetem Bakterienstamm zur Selektion ein Antibiotikum zugesetzt (Konzentration siehe 4.1.1). Angeimpft wurde die ÜNK mit Bakterienmaterial aus einer Glycerinkultur (4.1.1.3) oder einer Bakterienkolonie auf einer Agarplatte. Das Bakterienmaterial wurde mit einer sterilen Pipettenspitze in das Medium überführt. Die Kultur wurde bei 37°C über Nacht geschüttelt.

Flüssigkulturen wurden zur in-vivo-Expression verwendet. Dazu wurde zunächst, wie oben beschrieben, eine ÜNK angesetzt. Mit einer ÜNK wurden am nächsten Tag bis zu 200 ml Flüssigkultur zur Proteinexpression angeimpft und die Expression des rekombinanten Proteins mit IPTG induziert. 200 ml der Kultur lieferten nach der Aufreinigung eine ausreichende Menge an Protein.

4.1.1.3 Glycerinkulturen

Glycerinkulturen wurden angesetzt, um Bakterien für längere Zeit aufzubewahren. Dazu wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß 200 µl steriles Glycerin mit 900 µl einer ÜNK vermischt und anschließend bei -70°C gelagert. Aus einer Glycerinkultur konnte eine Flüssigkultur hergestellt werden, indem mit einer sterilen Pipettenspitze über die Glycerinkultur gestrichen wurde und diese zusammen mit den anhaftenden Bakterien in ein mit LB-Medium gefülltes Greiner-Röhrchen überführt wurde.

4.1.2 Photometrische Bestimmung der Bakteriendichte in einer Flüssigkultur

Zur Bestimmung der Zelldichte wurde der Extinktionskoeffizient einer Bakterienlösung bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht bei einer Messküvette mit 1cm Dicke ungefähr 8×10^8 Zellen pro Milliliter. Als Referenzwert wird steriles Kulturmedium eingesetzt.

4.1.3 Herstellung kompetenter Bakterien

Um Bakterien mit Plasmiden transformieren zu können, benötigt man kompetente Bakterien, d.h. Bakterien, die DNA aus ihrer Umgebung in sich aufnehmen können. Es gibt zahlreiche Bakterienarten, die eine natürliche Kompetenz besitzen, aber man kann auch andere Arten durch eine Modifikation der Lipiddoppelschicht, die sie umgibt, chemisch kompetent machen (Chung et al., 1989).

- LB-Medium (4.1.1)
- Tetracyclin: 15 mg/ml in Ethanol (70%, p.a.)
- TSS (Transformation and Storage Solution):
 - LB-Medium (4.1.1)
 - 10 % (w/v) PEG 3350
 - 5 % (v/v) DMSO
 - 50 mM Mg²⁺
 - pH 6.5
 - sterilfiltrieren und aliquotieren
 - Lagerung bei -20°C

Zunächst wurde ein Bakterienstamm (z. B. XL1-blue) mit einer Impföse aus einer Glyzerinkultur auf einer entsprechenden Selektionsplatte ausgestrichen. Am folgenden Tag wurde mit einer Einzelkolonie eine ÜNK angeimpft und bei 37°C unter Schütteln (ca. 200 rpm) inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 250 ml Selektionsmedium mit einem 1/10 des Eigenvolumens aus der ÜNK angeimpft. Die Bakterien wurden nun bei 37°C und unter Schütteln für etwa 2 Stunden bis zu einer OD₆₀₀ von 0.3 bis 0.4 vermehrt. Die Bakterienzellen wurden in 50 ml Falconröhrchen bei 900 xg und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurde jedes Bakterienpellet in 0,5 ml eiskaltem TSS aufgenommen und resuspendiert. Das Bakteriengemisch wurde in 100 µl Portionen in vorgekühlte 1,5 ml Eppendorf-Gefäße aliquotiert, und umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Bakterien konnten nun mehrere Wochen bei -70°C aufbewahrt werden.

4.1.3.1 Kompetenztest

Die Qualität der Kompetenz der Bakterienzellen lässt in der Anzahl der nach der Transformation Kolonien bildenden Bakterieneinheiten („colony forming units“ = cfu) pro eingesetzter Menge an Plasmid-DNA in Mikrogramm ausdrücken. Erwartet wird ein Wert von 10^7 - 10^9 cfu/µg Plasmid-DNA, in Bezug auf den pUC18-Vektor. Um die Kompetenz der Bakterienzellen möglichst genau zu berechnen, wurden 10, 100 und 1.000 pg der pUC18-Vektor-DNA in die Bakterien transformiert (4.1.4). Anschließend wurden die sich auf den Selektionsplatten bildenden Kolonien ausgezählt und daraus die Transformationsrate für 1 µg DNA des pUC18-Vektors berechnet.

4.1.4 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Für eine Transformation wurden 50-150 ng Plasmid-DNA zu 100 µl chemisch kompetenter Bakterienzellen, die auf Eis aufgetaut wurden, gegeben. Das Gemisch wurde 45 min auf Eis inkubiert. Die Transformation wurde durch einen Hitzeschock von 90 Sekunden bei 42°C gestoppt und der Ansatz anschließend sofort für 2 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurden 900 µl LB-Medium (4.1.1) zugegeben und das Gemisch 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Die Bakterienzellen wurden dann 5 Minuten bei 5000 xg abzentrifugiert. 900 µl des Überstandes wurden verworfen und das Pellet wurde in den restlichen 100 µl LB-Medium resuspendiert auf der jeweiligen Selektionsplatte (je nach Antibiotikaresistenz, die das transformierte Plasmid trägt) mit einem Drygalski-Spatel ausplattiert.

4.2 Zellkultur

4.2.1 Kultivierung von Zellen

Die Zellvermehrung wurde unter sterilen Bedingungen und unter Berücksichtigung der allgemeinen Sicherheitsvorschriften durchgeführt. Der Zustand und das Wachstum der Zellen wurden durch ein Inversmikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung kontrolliert. Im Allgemeinen dienen die in der untenstehenden Tabelle aufgeführten Richtwerte für die verwendeten Kulturgefäße. Angaben zu Medien und Kultivierungsbedingung sind im Kapitel 3 aufgeführt.

Gefäß	Fläche (mm ²)	Zelldichte beim Aussäen	Zelldichte bei Konfluenz	Kulturmedium (ml)	PBS (ml)	Trypsin (ml)
Schalen						
35 mm	960	0,3 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁶	2,5	2	0,5
60 mm	2830	0,7 x 10 ⁶	3,2 x 10 ⁶	5	5	1
Flasche						
TC25	2500	0,7 x 10 ⁶	2,8 x 10 ⁶	5	2	1

Die Anzahl der Zellen bei Konfluenz ist abhängig von den jeweiligen Zelllinien; die angegebenen Richtwerte beziehen sich auf COS7-Zellen.

4.2.2 Passagieren adhärenter Zelllinien

- 1-fach PBS pH 7,4:
 - 140 mM NaCl
 - 6,4 mM Na₂HPO₄
 - 2,6 mM KCl
 - 1,4 mM KH₂PO₄
- Autoklaviert, vorgewärmt auf 37°C
- Kulturmedium (Kapitel 3): Steril, vorgewärmt auf 37°C
- Trypsin-EDTA-Lösung:
 - PBS
 - 0,06 % Trypsin
 - 0,53 mM EDTA
- sterilfiltrieren

Nach zwei bis drei Tagen waren die Zellen konfluent, d.h. sie mussten gesplittet, verdünnt und neu ausgesät werden. Dazu wurde das verbrauchte Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit vorgewärmten und sterilen PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsinlösung überschichtet. Nach einer Inkubationszeit von ca. fünf Minuten bei Raumtemperatur, lösten sich die Zellen vom Gefäßboden.

Das Ablösen der Zellen wurde am Inversmikroskop kontrolliert und gegebenenfalls durch leichtes Stoßen der Flasche erleichtert. In der Zwischenzeit wurden in ein frisches Kulturgefäß 4 – 4,3 ml Zellmedium vorgelegt. Durch Zugabe von 5 ml warmen Zellkulturmedium wurde der Trypsinverdau abgestoppt und die Zellen vom Gefäßboden abgespült. Die neue Kulturflasche wurde mit 0,7 – 1 ml dieser Zellsuspension angeimpft (COS7).

4.2.3 Transfektion von Kulturzellen mit Effectene™ (Qiagen)

Bei der Transfektion wird DNA in eukaryotische Zellen eingebracht. Wie bei einer Transformation von Bakterienzellen muss die DNA die Zellmembran passieren und in einem unabhängigen Prozess in den Zellkern wandern, wo die Information der DNA in mRNA übersetzt und ins Zytoplasma exportiert wird. Schließlich kommt es dann dort zur Expression des vom Vektor integrierten Gens.

Effectene™ ist ein nicht-liposomales Lipid, welches unter spontaner Mizellenbildung die DNA in Lipidmoleküle hüllt. Nach Herstellerangaben soll dabei keine Größen- und Ladungsvarianz auftreten, wie dies bei liposomalen Transfektionen der Fall ist. Die Transfektionsraten bei COS-7-Zellen lagen mit Effectene™ bei 40-90 %.

- Qiagen Effectene™ Transfection Reagent Kit (enthält Effectene™, Enhancer und Puffer EC)
- 1-fach PBS (siehe 4.2.2, autoklaviert)
- Zellkulturmedium (Kapitel 3)

Für eine Transfektion in Minischälchen mit vier Deckgläschen (\varnothing 35 mm) wurden am Vortag die zu transfizierenden Zellen in einer Konzentration von 4×10^5 Zellen ausgesät. Pro Konstrukt wurden 400 ng DNA verwendet. Die DNA wurde mit Puffer EC auf ein Volumen von 100 μ l aufgefüllt, gemischt und mit 3,2 μ l Enhancer versetzt. Die Mischung wurde für 2-5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend 10 μ l Effectene™ zugegeben, vermischt und erneut für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurden die zu transfizierenden Zellen mit 2 ml vorgewärmten PBS gewaschen und mit 1,6 ml Kulturmedium überschichtet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Effectene™-Mischung 0,6 ml Kulturmedium zugegeben und tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Die Einwirkdauer der Transfektionslösung betrug wenigstens 24 Stunden. Transfizierte Zellen wurden am darauf folgenden Tag für weitere Experimente verwendet, ohne dass ein Wechsel des Kulturmediums notwendig war. Es wurden keine zytotoxischen Effekte während der Einwirkzeit beobachtet.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

4.3.1.1 Reverse Transkription

Die RT-PCR gliedert sich in zwei Abschnitte. Im Ersten wird die mRNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben. Da eukaryontische mRNA ausschließlich aus Exons besteht, unterscheidet sich die so hergestellte DNA von genomischer DNA, die zusätzlich nicht-kodierende, intronische DNA-Abschnitte enthält. Die durch die Reverse Transkription synthetisierte DNA wird aus diesem Grund auch als cDNA bezeichnet, wobei das „c“ für „complementary“ steht. Diese Technik kann Auskunft über zu einem bestimmten Zeitpunkt aktive Gene geben, denn mRNA (das unmittelbare Produkt eines angeschalteten Gens) kann mit Hilfe von spezifischen Primern nachgewiesen werden.

- Pipettierschema für eine RT-Reaktion (20 µl):
 - 1 µg Gesamt-RNA
 - 1 µl Oligo(dT)Primer
 - Nukleasefreies H₂O (auf 8 µl)
 - 5 Minuten bei 70°C
 - 1 µl RNase Inhibitor (40 U/µL, Fermentas)
 - 4 µl 5-facher RT-Puffer (Promega)
 - 1 µl dNTPs (10 mM je Nukleotid, Fermentas)
 - 1 µl Reverse Transkriptase MMULV (200 U/µL, Promega)
 - 5 µl Nukleasefreies H₂O

Der Ansatz wurde gut durchmischt und 1 h bei 37°C in einem Thermocycler inkubiert. Es folgte eine 5-minütige Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 95°C und eine Kühlung bei 4°C. Die cDNA wurde entweder direkt anschließend in einer PCR eingesetzt oder kurzfristig bei -20°C aufbewahrt. Standardmäßig wurden 2 µl einer RT-Reaktion für eine darauffolgende PCR eingesetzt.

4.3.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Bestimmte DNA-Abschnitte können mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) in vitro millionenfach vervielfältigt werden. Dabei wird Einzelstrang-DNA in einem sich zyklisch wiederholenden Prozess durch thermostabile DNA-Polymerasen synthetisiert. Neben den Primern, die die Zielsequenz umrahmen, benötigt die Polymerase Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), die Grundbausteine eines DNA-Moleküls.

Primer und Primerdesign

Die Effizienz einer PCR hängt im Wesentlichen von der Auswahl geeigneter Primer ab, deswegen ist das so genannte Primerdesign vor einer PCR von entscheidender Bedeutung. Auf folgende Kriterien sollte dabei geachtet werden:

- Primer sollten nicht in der Lage sein, mit sich selbst zu hybridisieren oder an einen anderen zu binden
- sie sollten keine Schleifen binden und ihre komplementäre Sequenz sollte auf der eingesetzten DNA nur einmal vorkommen
- der G/C-Gehalt sollte pro Primersequenz ungefähr 40-60% betragen
- die Schmelztemperatur eines Primerpärchens sollte in etwa gleich hoch sein und wird mit Hilfe folgender Formel berechnet: $T_m = 4 \sum (G,C) + 2 \sum (A,T) - 5$
- bei PCR-Produkten, die zur Insertion in einen Klonierungsvektor weiter verwendet werden, wurde an die Primersequenz 5' und 3' die Sequenzen von geeigneten Restriktionsenzymen gehängt

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden mit der Software von Thermo Fisher Scientific entworfen ebenfalls von dieser Firma oder der Firma biomers.net GmbH bezogen.

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden die Taq-Polymerase (am Institut hergestellt, ursprünglich isoliert aus *Thermophilus aquaticus*), die Pfu-Polymerase (Promega; isoliert aus *Pyrococcus furiosus*) und die Phusion™ Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs® Inc.), eine optimierte Form der Pfu-Polymerase, verwendet. Die Taq-Polymerase besitzt die Fähigkeit, am 3'-Ende des PCR-Produkts Adenosin-Überhänge anzufügen. Sie arbeitet mit einer Syntheseleistung von ca. 1000 Basen pro Minute und besitzt keine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (Fehlerkorrektur). Die Pfu- und die Phusion-Polymerase verfügen beide über eine Exonuclease-Aktivität, d.h. dass Fehler während der DNA-Synthese sofort korrigiert werden. Die Syntheseleistung der Pfu-Polymerase beträgt nur 500 bp pro Minute und wurde in dieser Arbeit nur für eine Mutagenese-PCR verwendet. Die Phusion-Polymerase besitzt eine Syntheseleistung von 4000 bp pro Minute und wurde für alle Klonierungen in Expressionsvektoren verwendet. Die jeweiligen

Syntheseleistungen der verschiedenen DNA-Polymerasen mussten bei der Bestimmung der Elongationszeiten einer PCR berücksichtigt werden.

- Pipettierschema für Taq-Polymerase (50 µl-Ansatz):
 - Template-DNA (5 ng Plasmid-DNA, 100 ng cDNA)
 - 4 µl MgCl₂ (25 mM)
 - 5 µl Taq-DNA-Polymerase 10-fach Puffer (eigene Herstellung)
 - 1 µl dNTP-Mix (10 mM SL je Nukleotid, MBI)
 - 1 µl 5'-Primer (10 pmol/µl SL, biomers/Thermo)
 - 1 µl 3'-Primer (10 pmol/µl SL, biomers/Thermo)
 - 0,2 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl, eigene Herstellung)
 - auf 50 µl mit H₂O_{bidest.} auffüllen

- Pipettierschema für Pfu-Polymerase (50 µl-Ansatz):
 - 5-100 ng Template-DNA
 - 5 µl Pfu-DNA-Polymerase 10-fach Puffer mit MgSO₄ (eigene Herstellung)
 - 1 µl dNTP-Mix (10 mM SL je Nukleotid, MBI)
 - 1 µl 5'-Primer (10 pmol/µl SL, biomers/Thermo)
 - 1 µl 3'-Primer (10 pmol/µl SL, biomers/Thermo)
 - 1 µl Taq-DNA-Polymerase (3 U/µl, eigene Herstellung)
 - auf 50 µl mit H₂O_{bidest.} auffüllen

Der Ansatz wurde auf Eis in einem 0,5 ml-PCR-Reaktionsgefäß pipettiert, wobei die DNA-Polymerase als letzte Komponente zugegeben wurde. Der Ansatz wurde gründlich vermischt, abzentrifugiert und in eine PCR-Maschine mit folgendem Programm gegeben:

Initiale Denaturierung		2 min	96°C
25-35 Zyklen	Denaturierung	30 sec	96°C
	Primer-Annealing	30 sec	Temp. je nach Primer
	Elongation	1 min pro 1000 Basen (Taq)	72°C
Finale Elongation		5 min	72°C
Kühlung		∞	4°C

Die Auswertung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1%igen Agarose-Gel (4.3.8).

4.3.2 Kolonie-PCR

Mit Hilfe einer Kolonie-PCR konnten selektierte Bakterienkolonien auf eine erfolgreiche Ligation, nach einer Klonierung, überprüft werden. Zusätzlich konnte damit die Orientierung des inklonierten DNA-Fragments im Plasmidvektor bestimmt werden. Anstelle von isolierter DNA wurden hierbei „gepickte“ Bakterienzellen als Matrize eingesetzt und mit geeigneten Primern überprüft, ob das DNA-Fragment in den Vektor inseriert war bzw. welche Orientierung das DNA-Insert hatte.

- Pipettierschema für eine Kolonie-PCR (25 µl-Ansatz):
 - 2 µl Bakterien-Suspension
 - 2 µl MgCl₂ (25 mM)
 - 2,5 µl Taq-DNA-Polymerase 10-fach Puffer (eigene Herstellung)
 - 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM SL je Nukleotid, Fermentas)
 - 0,5 µl 5'-Primer (10 pmol/µl SL, biomers/Thermo)
 - 0,5 µl 3'-Primer (10 pmol/µl SL, biomers/Thermo)
 - 0,2 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl , eigene Herstellung)
- auf 25 µl mit H₂O_{bidest.} auffüllen

Zunächst wurde je nach Anzahl der zu überprüfenden Bakterienklone ein „Master-Mix“ des 25 µl-Ansatzes angesetzt, der auf PCR-Reaktionsgefäße verteilt wurde. Die zu testende Bakterienkolonie wurde von einer Selektionsplatte mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und eine back-up-Platte damit angeimpft. Der restliche Teil der gepickten Bakterienkolonie wurde im Anschluss in das PCR-Reaktionsgefäß überführt, resuspendiert und als Matrize im PCR-Ansatz eingesetzt. Das Programm für die PCR-Maschine wurde unter 4.3.1.2 bereits beschrieben. Die back-up Platte wurde über Tag bei 37°C inkubiert. Nach der Auswertung der PCR-Produkte konnte anhand der back-up Platte direkt eine Übernachtkultur angeimpft werden.

4.3.3 Mutagenese-PCR

4.3.3.1 Endständige Mutationen

Mit dieser Methode konnten Mutationen am 5'- bzw. 3'-Ende einer cDNA-Sequenz liegen mit Hilfe von geeigneten Primern erzielt werden. Hierbei wurde z.B. das Stopp-Codon einer Sequenz entfernt, um ein C-terminales Fusionsprotein exprimieren zu können. Allerdings konnten mit dieser Methode nur ungefähr Basen bis zur Position 15-20 in der DNA-Sequenz mutiert oder deletiert werden, da die Primer sonst zu lang wurden und die PCR dadurch nicht mehr erfolgreich durchgeführt werden konnte. Außerdem war darauf zu achten, dass der Basenaustausch nicht die letzte Base des Primers am 3'-Ende betraf, da diese Falschpaarung sonst von der Pfu-Polymerase durch ihre Proof-Reading-Fähigkeit erkannt, und die damit verbundene 3'-5'-Exonukleaseaktivität die Mutation korrigiert hätte. Deshalb war beim Primerdesign darauf zu achten, dass mindestens 2-3 korrekt paarende Nukleotide als Puffer hinter der Mutation angehängt wurden, um diese Korrektur durch die Polymerase zu verhindern. Endständige Deletionen wurden ebenso über geeignete Primer, die an der gewünschten Position innerhalb der DNA-Sequenz banden, eingeführt. Des Weiteren konnten auch mit Hilfe von Primern geeignete Restriktions-Schnittstellen (Überhänge) in eine DNA-Sequenz eingeführt werden. Solche Überhänge in der Primer-Sequenz sollten nicht mehr als 60 % der Gesamtlänge des Primers ausmachen. Die Annealing-Temperatur eines Primers wurde lediglich über den komplementären Bereich ohne Überhang berechnet.

4.3.3.2 Interne Punktmutationen

In dieser Arbeit wurden auch Punktmutation innerhalb einer DNA-Sequenz (Insertion bzw. Deletion einer Base) erzeugt, die sich in einem Klonierungsvektor befand. Dazu wurde das QuickChange® Site-Directed Mutagenese Kit (Stratagene) verwendet und nach Herstellerprotokoll gearbeitet. Die Primer mussten so gewählt werden, dass die Mutation am 3'- und 5'-Ende von ca. 15 Basen flankiert wurde. Dadurch konnten die Primer an die komplementären DNA-Bereiche (mit Ausnahme der punktmultierten Stelle) binden. In einer PCR-Reaktion verlängerte eine Pfu-DNA-Polymerase die Primer und synthetisierte die DNA-Stränge des gesamten Vektors. Durch den Einbau der Primer entstand ein mutiertes Plasmid mit versetzten Lücken. Zum entfernen der parentalen DNA-Matrize wurde anschließend der PCR-Ansatz (50 µl) mit der DNA-Endonuklease Dpn I (0,5 µl = 2.5 U/µl) für eine Stunde bei 37°C verdaut. Dpn I schneidet spezifisch methylierte und hemi-methylierte DNA. Plasmid-DNA, die aus E.coli-Bakterien isoliert wurde, ist immer methyliert und kann deswegen von Dpn I beseitigt werden. Deshalb wurden nur die DNA oder Hybride aus einem mutierten und einem

Template-Strang verdaut, nicht aber die mutierten Plasmide. Nach einer 15-minütigen Hitzeinaktivierung (85°C) der Endonuklease Dpn I wurde der zurückbleibende Vektor, der die gewünschte Punktmutation enthielt, in kompetente XL1-Blue Bakterienzellen transformiert und vermehrt. Am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA isoliert und mit geeigneten Primern sequenziert.

4.3.3.2.1 Primer und Primerdesign

Die Primer einer punktgerichteten Mutagenese wurden anhand nachfolgender Kriterien entworfen:

- 5'- und 3'-Primer müssen die gewünschte Mutation enthalten und jeweils an dieselbe Sequenz der komplementären DNA-Stränge binden.
- Die Primer müssen eine Länge von 25 – 45 Basen aufweisen und ihre Schmelztemperatur (T_m) sollte mindestens 78°C betragen.
- Die Schmelztemperatur eines Primers zur Herstellung von Punktmutanten wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch}$$

N = Länge des Primers in Basen
% GC = GC-Gehalt in ganzen Zahlen
% mismatch = Anteil an Nichtpaarungen in ganzen Zahlen

- Pipettierschema:
 - 100 ng Template-DNA
 - 5 µl 10-fach Pfu-Puffer (eigene Herstellung)
 - 2 µl MgCl₂ (25 mM)
 - 1 µl dNTP-Mix (10 mM SL je Nukleotid, Fermentas)
 - 2 µl 5'-Primer (10 pmol/µl SL, biomers/Thermo)
 - 2 µl 3'-Primer (10 pmol/µl SL, biomers/Thermo)
 - 0,5 µl Pfu-DNA-Polymerase (2,5 U/µl, eigene Herstellung)
 - auf 50 µl mit H₂O_{bidest.} auffüllen

	Initiale Denaturierung	2 min	96°C
16 Zyklen	Denaturierung	30 sec	96°C
	Primer-Annealing	30 sec	Temp. je nach Primer
	Elongation	500 nt/min	68°C
	Kühlung	∞	4°C

4.3.4 Gewinnung von bakterieller Plasmid-DNA

4.3.4.1 GTE-System (alkalische Lyse)

Diese Methode nach Li (Li et al., 1997) wurde angewandt, wenn ein Testen der Klone nach einer Ligation und Transformation mit der Kolonie-PCR nicht möglich war und ein Restriktionsverdau (4.3.5) Aufschluss geben musste.

- Lösung 1 (GTE-Puffer):
 - 50 mM Glucose
 - 25 mM Tris/HCl, pH 8.0
 - 10 mM EDTA
 - 1 Spatelspitze RNase A
- Aufbewahrung bei 4°C
- Lösung 2 (Lysispuffer):
 - 0,2 N NaOH
 - 1 % (w/v) SDS
- Lösung 3 (Kaliumacetatlösung):
 - 60 ml Kaliumacetatlösung (SL 5 M)
 - 11,5 ml Eisessig
 - 28,5 ml H₂O_{bidest.}
 - 100 % Ethanol (p.a., eisgekühlt)

Zunächst wurde anhand einer Übernachtskultur (4.1.1.2) das zu isolierende Plasmid vermehrt. Von dieser Kultur wurden 1,5 ml in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und 30 Sekunden bei 10.000 xg abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl GTE-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden nacheinander 200 µl Lösung 2 bzw. Lösung 3 zugegeben und durch 6-maliges Invertieren gemischt. Nach einer 30-sekündigen Zentrifugation bei 10.000 xg wurden 400 µl des Überstandes in ein frisches Gefäß überführt und 400 µl eiskaltes Ethanol (100 %, p.a.) zugegeben. Beim Überführen des Überstandes durfte kein ausgefallenes SDS, das nachfolgende Reaktionen stören könnte, verschleppt werden. Der Ansatz wurde vermischt für 5 Minuten bei 10.000 xg zentrifugiert. Das Pellet wurde luftgetrocknet und abschließend in 30 µl H₂O_{bidest.} aufgenommen. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt (4.1.2), wobei die Ausbeute im Durchschnitt bei etwa 30 µg aus 1,5 ml Übernachtskultur lag.

4.3.4.2 Plasmid Miniprep (peQlab)

Hierbei werden die alkalische Lyse und die Absorption von DNA an einer Silikagel-Matrix unter Hochsalz-Bedingung kombiniert. Die DNA wird dabei nicht gefällt, sondern an die Matrix gebunden und anschließend mit einem Niedrigsalz-Puffer (oder H₂O_{bidest.}) bei pH 7.0 – 8.5 eluiert. Die Plasmid-DNA besitzt dadurch einen sehr hohen Reinheitsgrad und ist auch in sensitiveren Reaktionen, wie z.B. Sequenzierungen oder Transfektionen verwendbar. Die Präparation wurde mit dem E.Z.N.A.[®] Plasmid MiniPrep Kit I (peQlab) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Ausgegangen wurde von einer 10 ml Übernachtskultur, was Ausbeuten von 200 bis 500 ng/µl Plasmid-DNA, bei Elution mit 50 µl H₂O_{bidest.,} erbrachte.

4.3.5 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme wurden zur Klonierung von DNA-Fragmenten und zur Linearisierung von Vektoren. Restriktionsenzyme (oder Endonukleasen) schneiden DNA an definierten Stellen und werden in drei Klassen eingeteilt. In der Molekularbiologie finden vor allem die Vertreter des Typs II, so genannte Nukleasen, Verwendung. Diese Enzyme erkennen jeweils eine spezifische Nukleotidsequenz und schneiden den DNA-Strang innerhalb dieses Bereichs. Dabei können je nach verwendetem Restriktionsenzym glatte (blunt) oder kohäsive (sticky) Enden entstehen. Schnittstellen mit kohäsiven, so genannten überhängenden Enden können effizient mit komplementären Enden ligiert werden, die mit demselben Enzym geschnitten wurden. Durch Verwendung zweier verschiedener Restriktionsendonukleasen kann darüber hinaus die Insertionsrichtung des zu klonierenden DNABereichs in einen Vektor beeinflusst werden.

- Standardansatz für einen Restriktionsverdau (20 µl):
 - 2 µg Plasmid-DNA
 - 2 µl 10-fach Restriktions-Puffer (Fermentas)
 - 1 µl Restriktionsenzym (5 U/µl, Fermentas)
- mit H₂O_{bidest.} auf ein Endvolumen von 20 µl auffüllen.

Der Ansatz wurde gründlich gemischt, abzentrifugiert und für eine Stunde, in der Regel bei 37°C (kann je nach Enzym variieren), inkubiert. Es folgte ein Hitzeinaktivierungsschritt bei mindestens 70°C (je nach Enzym unterschiedlich) für 10 Minuten. Anschließend wurden 4 µl 6-facher DNA-Beladungspuffer zugegeben und der Verdau in einem 1%igen SB-Gel analysiert (4.3.8). Die DNA konnte durch eine Gelextraktion (4.3.9.1) erneut isoliert werden, falls sie für Folgeversuche benötigt wurde.

4.3.6 Herstellung glatter (blunt) Enden bei Plasmid-DNA-Sequenzen

Das große Fragment der E.coli-DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) ermöglicht es durch seine 5'-3'-Polymerase-Aktivität den zum 5'-Überhang komplementären Strang aufzufüllen, oder einen 3'-Überhang durch seine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität zu entfernen. Dadurch erhält man „glatte“ Enden für eine blunt-Ligation.

- Standardansatz (20 µl):
 - 100 ng bis 4 µg DNA
 - 2 µl 10x Klenow-Puffer (Fermentas)
 - 0,5 µl dNTPs (Mix, SL je Nukleotid 10 mM, MBI)
 - 0,5 µl Klenow-Enzym (10 U/µl, Fermentas)
- mit H₂O_{bidest.} auf 20 µl auffüllen

Der Ansatz wurde 5 Minuten bei 37°C inkubiert und danach 10 Minuten bei 70°C hitzeinaktiviert. Um die DNA wieder möglichst rein zu bekommen, wurde sie mit Hilfe eines Agarosegels (4.3.8) aufgetrennt und anschließend durch Gelextraktion wieder eluiert (4.3.9.1).

Eine andere Möglichkeit, die Enden einer DNA-Sequenz zu glätten, besteht in der Verwendung der Pfu-Polymerase, die ebenfalls 5'-3'-Polymerase- und 3'-5'-Exonuklease-Aktivität besitzt (4.3.1.2., Inkubation bei 72°C).

4.3.7 Beladungspuffer für die DNA-Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurde entweder ein DNA-Beladungspuffer mit Bromphenolblau und Xylencyanol verwendet. Daneben kam aber auch ein Puffer mit Orange G zum Einsatz, da es gut zur Markierung der Lauffront verwendet werden kann. In 1%igen Agarose-Gelen läuft Bromphenolblau auf der Höhe von ~300 bp, Xylencyanol bei ~4.000 bp und Orange G bei ~50 bp.

- 6-facher DNA-Beladungspuffer:
 - 60 % Glyzerin
 - 30 % 0,2 M EDTA
 - 10 % H₂O_{bidest.}
- 1 % Bromphenolblau in 6x DNA-Beladungspuffer
- 2 % Xylencyanol in 6x DNA-Beladungspuffer
- 4 % Orange G in 6x DNA-Beladungspuffer

4.3.8 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

Im elektrischen Feld wandern DNA-Moleküle stets zur positiv geladenen Anode. Das liegt an der negativen Nettoladung von Nukleinsäuren, die durch das Ribosephosphat-Rückgrat zustande kommt. Die Auftrennung findet in einer Trägermatrix, Agarose, statt. Sie wird aus den Rotalgen-Gattungen *Gelidium* und *Gracillaria* gewonnen. Im Gel werden die Nukleinsäuren bei ihrer Wanderung der Größe nach aufgetrennt. Durch die maschenartige Vernetzung der Agarose-Moleküle können kleinere DNA-Fragmente schneller wandern als größere. In dieser Arbeit wurde DNA ausschließlich mit Hilfe von 1%-igen Agarosegelen aufgetrennt.

- 20-fach SB-Puffer (1 l) (Brody and Kern, 2004):
 - 200 mM NaOH
 - 650 mM Borsäure (ca. 40g)
 - pH einstellen auf 8.5
- 6-fach DNA-Ladepuffer (4.3.7)
- Laufpuffer (1-fach SB)
- Ethidiumbromid-Stammlösung 10 mg/ml in H₂O_{bidest.}

Für die Herstellung eines 1 %igen Gels wurden 0,5 g Agarose (peqGOLD™ Universal-Agarose, PeqLab) in 50 ml SB-Puffer aufgekocht. Nachdem die Lösung auf etwa 50°C abgekühlt war, wurden 1 µl der Ethidiumbromid-Stammlösung zugegeben und vermischt. Die Lösung wurde in einen Gelschlitten mit eingestecktem Kamm gegossen, der mit einem Klebeband abgedichtet wurde. Das Gel konnte nach ca. 30 Minuten, nach vollständigem Aushärten der Agarose, zum Gebrauch hergenommen werden. Ethidiumbromid wurde zugegeben, weil es sich an die DNA lagert und im ultravioletten Licht rötlich leuchtet und sie so sichtbar macht. Das Gel wird im Gelschlitten in eine Elektrophoresekammer gesetzt und mit 1-fachem Elektrophorese-Puffer überschichtet. Anschließend wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen und die zu analysierenden Proben, die mit 6-fachem DNA-Ladepuffer versetzt waren, in die Geltaschen pipettiert. Um die Längen der aufgetrennten DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde in einer Spur ein Gemisch aus DNA-Molekülen definierter Größe als Marker aufgetragen. Hierbei wurde entweder die gebrauchsfertige FastRuler™ DNA Ladder, Middle Range, oder der Marker III (beide Fermentas) (vgl. Abbildung 4-1) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 40 V/cm durchgeführt. Die durch das Ethidiumbromid gefärbten DNA-Moleküle wurden mit einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

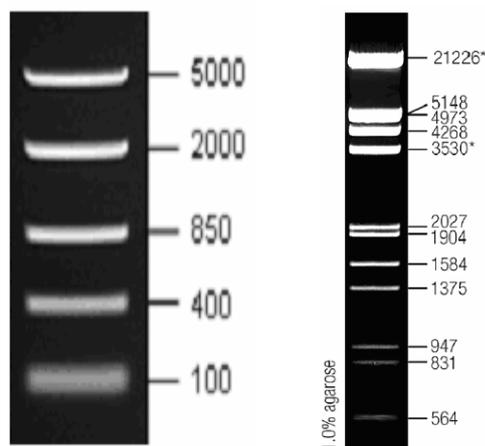


Abbildung 4-1 Verwendete DNA-Größenmarker. Links: FastRuler™ DNA Ladder, Middle Range (Fermentas); Rechts: Marker III (Fermentas).

4.3.9 Reinigung von Nukleinsäuren

4.3.9.1 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen

Nukleinsäuren, die mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, konnten durch Extraktion mit dem Wizard® SV Gel and PCR Cleanup System (Promega) erneut isoliert werden, wobei die verwendete Universal Agarose keinen negativen Einfluss auf die Elution oder die Höhe der Ausbeute der DNA hatte. Zunächst mussten die gewünschten Banden dazu mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel herausgetrennt werden. Danach wurde nach der Arbeitsanleitung des Herstellers verfahren und die finale Elution der DNA erfolgte je nach Verwendung in 20-50 µl H₂O_{bidest.} Nach der Elution konnte die DNA unmittelbar ohne weitere Bearbeitungsschritte für nachfolgende Versuche verwendet werden.

Mit Hilfe des Kits war, neben der Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Gelen, auch eine Aufreinigung von PCR-Produkten und eines Restriktionsverdaus möglich.

4.3.9.2 Fällung von DNA

In dieser Arbeit wurde DNA mit Natriumacetat und Ethanol gefällt. Zunächst musste die Nukleinsäure in Lösung gebracht werden. Im Allgemeinen wurde DNA in 100 µl-Ansätzen gefällt, kleinere Mengen von Verdaus oder Sequenzierungen wurden auf 100 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5.2 und 2,5 Volumina 100 %iges Ethanol (p.a.) zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und 30 min bei 16.000 xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 70 %igem Ethanol gewaschen und für 5 min bei 16.000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut entfernt, das Pellet für 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen H₂O_{bidest.} aufgenommen.

4.3.9.3 Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben

- peqGOLD TriFast™ (Phenol-Reagenz Isolation von RNA, DNA und Proteinen)
- Chloroform (frei von Zusätzen wie Isoamylalkohol)
- Isopropanol p.a.
- 75% Ethanol p.a.:
- PBS (4.2.2):
- Nukleasefreies, steriles H₂O

peqGOLD TriFast™ wird zur Extraktion von RNA, DNA und Proteinen aus Zellen und Geweben verwendet. Die einphasige Lösung besteht aus Guanidinisothiocyanat und Phenol und ermöglicht eine aufeinanderfolgende Isolierung von RNA, DNA und Proteinen aus demselben Ausgangsmaterial. Im Rahmen dieser Arbeit wurde RNA aus Oocyten, Embryonen und verschiedenen Geweben von *Xenopus laevis* isoliert. Dazu wurden jeweils 3 Oocyten bzw. Embryonen und kleine Stückchen in 1 ml TriFast™ mit einem Eppendorf-Teflon-Homogenisator homogenisiert. Nach der Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennt sich das in der Lösung homogenisierte organische Material in drei Phasen: die RNA und die DNA befinden sich im oberen, wässrigen Teil, wohingegen die Proteine in der unteren organischen Phase enthalten sind. Die weitere Durchführung erfolgte anhand des Herstellerprotokolls. Zur sofortigen Weiterverwendung wurde die RNA in nukleasefreiem H₂O aufgenommen, die Konzentration photometrisch bestimmt (4.1.2) und die benötigte Menge abgenommen. Der restliche Teil konnte einige Wochen bei -20°C gelagert werden. Wurde die isolierte RNA nicht sofort verwendet, so wurde sie bei -70°C in 70% Ethanol p.a. gelagert.

4.3.9.4 Extraktion von RNA mit RNeasy (Qiagen)

RNA konnte auch mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) aufgereinigt werden. Dieses Kit eignet sich zur Aufreinigung von RNA aus geringen Mengen von Ausgangsmaterial wie z.B. mRNA, die durch eine vorangegangene enzymatische Reaktion (4.3.13) hergestellt wurde. Die Methode kombiniert die Absorption von RNA an einer Silikagel-Matrix mit der Microspin Technologie. Es wurde anhand des Herstellerprotokolls verfahren, wobei die RNA in 30 µl nukleasefreiem H₂O aufgenommen, aliquotiert und bei -70°C gelagert wurde. Die so gewonnene RNA konnte im Anschluss für die Mikroinjektion in Oozyten verwendet werden (4.5.9).

4.3.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren durch photometrische Messung

Mit einer photometrischen Absorptionsmessung konnte die Konzentration von DNA und RNA in einer wässrigen Lösung ermittelt werden.

Die RNA wurde zur Messung in einem Verhältnis von 1/60 verdünnt und die Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht dabei einer Menge von etwa 40 µg/ml RNA. Die Reinheit der isolierten Ribonukleinsäure kann einerseits über den Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ ermittelt werden, da Proteine bei 280 nm absorbieren. Bei hoher Reinheit wurde ein Wert von 1,8-2,0 erwartet. Andererseits konnten Verunreinigungen von aromatischen Verbindungen, Phenol, Peptiden oder Kohlenhydraten durch den Quotienten OD₂₃₀/OD₂₈₀ bestimmt werden. Bei reinen Proben sollte der Wert ungefähr 2,2 betragen.

Die Konzentration von dsDNA (z.B. Plasmid-DNA) wurde wie oben beschrieben ermittelt. Eine OD von 1 entspricht bei dsDNA ca. 50 µg/ml. Gereinigte DNA sollte ein Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ von etwa 1,8 aufweisen.

	OD ₂₆₀ =1 ≡	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ ≥	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀ ≥
dsDNA	50 µg/ml	1,8	2,2
ssDNA	37 µg/ml	1,8	2,2
RNA	40 µg/ml	2,0	2,2
Oligonukleotide	30 µg/ml	1,8	2,2

4.3.11 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Die Sequenzierung von DNA wurde nach dem Prinzip von Frederick Sanger (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Das Prinzip beruht auf einer enzymatischen Kettenabbruch-Synthese, wofür Dideoxy-Nukleosid-Triphosphate (ddNTPs) benötigt werden. Ihnen fehlt die 3'-Hydroxylgruppe an der Desoxyribose. Bei dieser Methode wird wie bei einer Polymerase-Ketten-Reaktion (4.3.1.2) ein bestimmter DNA-Einzelstrang mit Hilfe einer Polymerase verlängert. In den PCR-Ansatz werden allerdings zusätzlich ddNTPs in niedriger Konzentration zugegeben. Werden diese in den neusynthetisierten Strang eingebaut, stoppt die Verlängerung durch die DNA-Polymerase. Durch das Fehlen des 3'-Hydroxylendes kann keine weitere Phosphodiesterbindung geknüpft und somit keine weiteren Desoxyribonukleotide (dNTPs) eingebaut werden. Der Einbau erfolgt zufällig, so dass mit statistischer Wahrscheinlichkeit DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen, die an ihrem 3'-Ende mit einem ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP) enden. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Arbeitssystem (ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems) sind die ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, wodurch die synthetisierten DNA-Fragmente unterschiedlichster Länge mit einer spezifischen Farbe markiert sind. Dabei tragen Fragmente gleicher Länge den gleichen Farbstoff. Die Mischung dieser

DNA-Moleküle wird in einem Kapillar-Gelsystem elektrophoretisch aufgetrennt. Ein Laser bringt an einem Messfenster die Fluoreszenz-Farbstoffe zum Leuchten wobei ein angeschlossenes Fotoelement die Wellenlänge des emittierten Lichts aufnimmt. Die registrierten Messdaten werden an einen Computer weitergeleitet, der die einzelnen Fluoreszenz-Signale über eine geeignete Software schließlich zu einer Sequenz zusammensetzt.

- Standardansatz einer Sequenzierungs-Reaktion (20 µl):
 - 300 ng Plasmid-DNA
 - 5 µl Premix (BigDye™, Applied Biosystems)
 - 10 pmol Sequenzierungsprimer (Forward oder Reverse)
- mit H₂O_{bidest.} auf ein Endvolumen von 20 µl auffüllen

Initiale Denaturierung		2 min	95°C
25 Zyklen	Denaturierung	30 sec	95°C
	Primer-Annealing	30 sec	Temp. je nach Primer
	Elongation	4 min	60°C
Kühlung		∞	4°C

Nach Beendigung des Cycle-Programms wurde die sequenzierte DNA mit Na-Acetat und Ethanol gefällt (4.3.9.2), danach 30 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet und schließlich 25 µl HiDi Formamid (Applied Biosystems) resuspendiert. Die in Lösung gebrachte DNA wurde anschließend in einem Sequenzierungs-Gefäß mit aufgesetztem Septum überführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Software BioEdit geöffnet und durch Sequenzvergleich mit einem frei zugänglichem Internetprogramm (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>) ausgewertet.

4.3.12 Klonierungen

4.3.12.1 Klonierung von PCR-Fragmenten

Taq- und Tfl-Polymerasen verfügen eine terminale Transferase-Aktivität, d.h. dass sie stets einen 3'-Überhang aus Desoxyadenosinen an PCRProdukte anfügen. Diese Eigenschaft macht sich das TOPO TA Cloning® Kits (Invitrogen) zunutze. Der Klonierungsvektor pCR2.1TOPO besitzt in der Klonierungs-Site einen 3'-Überhang aus Thyminen und liegt linearisiert vor. Darüber hinaus ist das Enzym Topoisomerase I kovalent an den 3'-Enden gebunden. PCR-Produkte mit 3'-Adenosin-Überhängen werden durch die Ligationseigenschaften der Topoisomerase schnell und effizient in den Vektor integriert, wobei das Enzym dissoziiert. Der Vektor ist so modifiziert, dass eine Blau/Weiss-Selektion der Bakterienkolonien nach der Transformation in kompetente E.coli (XL 1-Blue) möglich ist. Bakterienklone, die einen Vektor ohne integriertes PCRInsert aufgenommen haben, nehmen eine blaue Färbung an, wohingegen Klone mit integriertem Insert weiß bleiben. Ohne Insert wird das lacZ-Gen exprimiert und X-Gal als Substrat der β-Galaktosidase gespalten, wodurch der blaue Farbstoff entsteht. Das PCR-Produkt wird zwischen Promotor und lacZGen in den Vektor inseriert, wodurch die Expression dieses Gens nicht mehr möglich ist. Nach der Ligation wurden die transformierten Bakterienzellen auf LB-Ampicillin (100 µg/ml) + Kanamycin (50 µg/ml)-Platten ausplattiert, die eine Stunde zuvor mit X-Gal und IPTG bestrichen wurden.

- Ligation (5 µl):
 - 0,5 – 3,5 µl PCR-Produkt
 - 1 µl Salt Solution (Invitrogen)
 - 0,5 µl pCR2.1TOPO®-Vektor
- mit H₂O_{bidest.} auf 5 µl auffüllen

Der Ansatz wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, zu einem Aliquot chemisch kompetenter E.coli (XL-1 Blue) gegeben und für 30 Minuten auf Eis stehen gelassen. Danach wurde ein 30-sekündiger Hitzeschock bei 42°C durchgeführt und die Bakterienzellen danach sofort für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wurde mit 250 µl SOC-Medium (Invitrogen) aufgefüllt und eine Stunde bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Die Bakterienzellen wurden danach auf LB-Ampicillin (100 mg/ml) + Kanamycin (50 mg/ml)-Platten ausplattiert, die eine Stunde zuvor mit 40 µl X-Gal (40 mg/ml) und 40 µl IPTG (100 mM) bestrichen wurden. Schließlich wurden sie über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.3.12.2 Klonierung von DNA-Fragmenten

4.3.12.2.1 Gewinnung des Inserts

Bevor eine bestimmte cDNA-Sequenz in einen Plasmidvektor kloniert werden kann, muss das Fragment durch PCR amplifiziert werden. In dieser Arbeit wurde hierfür in den meisten Fällen die Phusion™ High Fidelity Polymerase und selten die Pfu-Polymerase, beide mit „Proof-reading“-Funktion, verwendet. Es wurden dazu Primer mit 5'-überhängenden Schnittstellen verwendet, um die Ligation des PCR-Fragments in den Vektor zu ermöglichen. Im Anschluss an die PCR wurde das DNA-Fragment gelelektrophoretisch aufgetrennt, ausgeschnitten und extrahiert (4.3.8 und 4.3.9.1). Befand sich der zu klonierende Gen-Abschnitt bereits in einem Vektor, wurde das Fragment über einen Restriktionsverdau (4.3.5) ausgeschnitten. Um genügend Insert zu erhalten wurden immer mindestens 2 Ansätze mit jeweils 3 µg DNA verdaut, anschließend über ebenfalls gelelektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschte DNA aus dem Gel eluiert.

4.3.12.2.2 Dephosphorylierung des Vektors

Wurden Insert und Klonierungsvektor mit demselben Restriktionsenzym geschnitten, so musste im Anschluss eine Dephosphorylierung des Vektors durchgeführt werden, um die Autoligationsrate des Vektors zu minimieren. Eine DNA-Ligase benötigt phosphorylierte Enden, um zwei DNA-Moleküle miteinander verbinden zu können. Durch das Entfernen der Phosphatgruppe am 5'-Ende der geschnittenen DNA-Stränge kann der linearisierte Vektor nicht mehr von der Ligase geschlossen werden, wodurch die Anzahl der falschpositiven Bakterienklone nach der Transformation signifikant verringert werden kann. Autoligation kann bei der Verwendung von zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen prinzipiell ausgeschlossen werden, da nichtkomplementäre Enden nicht verbunden werden können.

Der Vektor wurde zunächst durch einen Restriktionsverdau (4.3.5) linearisiert und die Reaktion durch eine 10-minütige Hitzeinaktivierung bei 85°C beendet. Anschließend wurde die DNA gefällt (4.3.9.2) und das Pellet, in einer Konzentration von 100 ng/µl in H₂O_{bidest.}, resuspendiert.

- Pipettierschema eines Dephosphorylierungs-Ansatzes (5 µl):
 - 1,5 µl Linearisierter Vektor (150 ng)
 - 0,5 µl 10-facher SAP-Puffer (Fermentas)
 - 1 µl Shrimp Alkaline Phosphatase (1 U/µl, Fermentas)
- auf 20 µl mit H₂O_{bidest.} auffüllen

Der Ansatz wurde 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die SAP 20 Minuten bei 70°C hitzeinaktiviert. Der Ansatz konnte entweder direkt weiter verwendet oder für etwa 4 Wochen bei -20°C aufbewahrt werden.

4.3.12.3 Ligation

Bei der Ligation sollte das molekulare Verhältnis zwischen Insert und linearisierten Vektor wenigstens 3:1 betragen.

- Pipettierschema eines Ligations-Ansatzes (20 μ l):
 - 100 ng Linearisierter und aufgereinigter Vektor
 - 300 ng Geschnittenes und aufgereinigtes Insert
 - 2 μ l 10-facher T4-DNA Ligase Puffer (Fermentas)
 - 1 μ l T4-DNA Ligase (5 U/ μ l, Fermentas)
 - mit H₂O_{bidest.} auffüllen auf 20 μ l

Der Ansatz wurde 1 Stunde bei 20°C oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde der Gesamtansatz für eine chemische Transformation in E.coli-Bakterien eingesetzt (4.1.4).

4.3.12.4 Transformation

Der Ligationsansatz wurde mit einem Aliquot (100 μ l) chemisch kompetenter Bakterien gemischt und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein 90-sekündiger Hitzeschock bei 42°C. Danach wurden die Bakterien sofort für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wurde mit 900 μ l LB-Medium (4.1.1) aufgefüllt und 1 Stunde bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Die Bakterienzellen wurden danach auf Selektionsplatten ausplattiert und bei 37°C für über Nacht inkubiert.

4.3.12.5 Test der erhaltenen Klone

Wie bereits unter 4.3.2 beschrieben, wurden die erhaltenen Klone anhand einer Kolonie-PCR auf die erfolgreiche Ligation des Inserts in den Vektor überprüft. Waren Tests über PCR nicht möglich, so wurde ein Restriktionsverdau (4.3.5) oder eine Sequenzierung (4.3.11) als Test durchgeführt. Alle über PCR gewonnenen Inserts wurden in jedem Fall vollständig sequenziert, um Fehler durch die Polymerase auszuschließen.

4.3.13 In vitro Herstellung von mRNA zur Mikroinjektion in *X.l.* Oozyten

In dieser Arbeit wurden mRNAs in das Zytoplasma von Oozyten von *Xenopus laevis* injiziert. Die mRNAs wurden anschließend in der Eizelle translatiert. In diesem Fall war an die DNA-Sequenz des zu Wirtsproteins, die Sequenz eines fluoreszierenden Proteins wie z.B. „green fluorescent protein“ (GFP) fusioniert. Der Vektor musste außerdem eine T7-RNA-Polymerase-Promotorsequenz, wie bei Vektor Bluescript II SK+ (Stratagene, Kapitel 3), aufweisen. Wurde die injizierte mRNA translatiert, so konnte nach einer Inkubationszeit von 16-20 Stunden das Fusionsprotein innerhalb der Zelle anhand der Fluoreszenz von GFP lokalisiert werden. Diese Methode wurde angewendet, da eine Transfektion von DNA, wie sie bei somatischen Zellen üblich ist, in Oozyten nicht durchführbar ist. Die in vitro hergestellte mRNA ist sehr instabil und es musste während des gesamten Prozesses darauf geachtet werden, schnell und steril zu arbeiten. Die mRNA konnte in nukleasefreiem H₂O für einige Wochen bei -70°C gelagert werden.

4.3.13.1 Linearisierung der Plasmid-DNA

Die DNA-Matrize zur in vitro mRNA Synthese musste zunächst linearisiert werden. Dazu wurden 1 μ g DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym für eine Stunde bei geeigneter Temperatur verdaut (4.3.5), gefällt (4.3.9.2) und in 6 μ l nukleasefreiem H₂O resuspendiert.

- Pipettierschema eines Linearisierungs-Ansatzes (20 µl):
- 1 µg Plasmid-DNA
- 2 µl 10-facher Restriktions-Puffer (Fermentas)
- 1 µl Restriktionsenzym (5 U/µl, Fermentas)
- mit H₂O_{bidest.} auffüllen auf 20 µl

4.3.13.2 Synthese von “capped” mRNA

mRNA mit 5'-Cap wurde mit Hilfe des mMESSAGING mMACHINE® Kits (Ambion) anhand des Herstellerprotokolls synthetisiert. Dieses eignet sich für die in vitro Synthese großer Mengen von capped-mRNA mit Hilfe der T7 RNA-Polymerase. Alle vier Ribonukleotide und das Cap-Analog [m⁷G(5')ppp(5')G] sind in optimalem Verhältnis in einer Lösung gemischt und können direkt zur linearisierten Plasmid-DNA pipettiert werden. Die Degradation der neu synthetisierten mRNA wird durch den RNase-Inhibitor SUPERase•In™, der sich ebenfalls im Reaktionsansatz befindet, verhindert. Die Ausbeute einer Reaktion, bei einer Ausgangskonzentration von 1 µg Plasmid-DNA beträgt ca. 20-30 µg mRNA. Nach der Synthese wird die linearisierte DNA durch Zugabe von TURBO DNase entfernt und die mRNA kann zur Polyadenylierungsreaktion eingesetzt werden.

- Pipettierschema eines mRNA-Syntheseansatzes(20 µl) (mMESSAGING mMACHINE, Ambion):
- 1 µg linearisierte Plasmid-DNA
- 10 µl 2x NTP/CAP
- 2 µl 10x Reaktionspuffer
- 2 µl Enzym-Mix (T7-Polymerase und SUPERase•In)
- mit nukleasefreiem H₂O auffüllen auf 20 µl

Der Ansatz wurde 60-120 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend wurde 1 µl TURBO DNase zum Ansatz gegeben und das Gemisch für weitere 15 Minuten bei 37°C inkubiert.

4.3.13.3 Polyadenylierung der mRNA

Mit Hilfe des Poly(A) Tailing Kits (Ambion) können mRNAs, die mit mMESSAGING mMACHINE® (Ambion) in vitro synthetisiert wurden, ≥ 150 bp lange poly(A) Schwänze angefügt werden. Dadurch wird die Stabilität der mRNA und die Effizienz der Translation erhöht. Als Enzym wird hierbei die *E. coli* Poly(A) Polymerase (*E*-PAP) verwendet.

- Pipettierschema einer Poly(A) Tailing Reaktion (100 µl) (Ambion):
- 20 µl mMESSAGING mMACHINE Reaktion (siehe 4.3.13.2)
- 36 µl nukleasefreies H₂O
- 20 µl 5x *E*-PAP Puffer
- 10 µl MnCl₂ (25 mM)
- 10µl ATP (10 mM)
- 4 µl *E*-PAP

Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert und danach entweder bei -20°C gelagert oder gleich, zur Aufreinigung der mRNA, weiterverwendet.

4.3.13.4 Aufreinigung der mRNA

Die in vitro synthetisierte mRNA, die über eine 5'-Kappe sowie über einen Poly(A)-Schwanz verfügt, wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte laut Herstellerprotokoll und ist außerdem unter 4.3.9.4 beschrieben.

4.3.13.5 RNA-Gelelektrophorese

RNA-Moleküle können nach dem gleichen Prinzip wie DNA-Fragmente ihrer Größe nach durch eine Gelelektrophorese getrennt werden. Allerdings wird für ein RNA-Agarose-Gel ein anderes Puffersystem verwendet, das Formaldehyd enthält. Diese Chemikalie stabilisiert denaturierte RNA und verhindert die Degradation.

- 10x RNA-Laufpuffer:
 - 200 mM MOPS
 - 50 mM Na-Acetat
 - 10 mM EDTA
- pH 6,6 einstellen und in dunkle Flasche steril filtrieren
- RNA-Probenpuffer (660 µl):
 - 325 µl Formamid
 - 75 µl 10x MOPS-Puffer
 - 240 µl 37% Formaldehyd
 - 50% (w/v) Glycerin
 - 80 µl nukleasefreies H₂O
 - 1 Spatelspitze Bromphenolblau
- 1:200 Ethidiumbromid (10 mg/ml)

Für ein 1 %iges RNA-Gel wurden 0,75 g Agarose (PeqLab) in 75 ml 1x MOPS-Puffer aufgekocht. Nachdem die Lösung auf etwa 50°C abgekühlt war, wurden 2,25 ml 37 %ige Formaldehydlösung zugegeben, gründlich vermischt und in einen Gelschlitten mit eingestecktem Kamm gegossen. Nach etwa 30 Minuten war das Gel auspolymerisiert und konnte verwendet werden. Das Gel wurde pro Spur mit ca. 1 µg Poly(A)-mRNA beladen. Die mRNA-Probe wurde dafür in 1 µl RNA-Probenpuffer und 1 µl Ethidiumbromid (1:200) gelöst und auf 10 µl mit nukleasefreiem H₂O aufgefüllt. Im Anschluss wurde sie zur Denaturierung für 5 Minuten bei 68°C erhitzt und danach auf Eis gekühlt. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben vorsichtig in die Taschen eines mit Laufpuffer überschichteten Gels gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanten 80 V und wurde beendet, sobald die Bromphenolblau-Front etwa 2/3 in das Gel gelaufen war. Die RNA-Banden konnten mit einem UV-Transilluminator durch das im Beladungspuffer enthaltene Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Die Daten konnten auf einem Computer, mit Hilfe des Programms IrfanView, gespeichert und ausgedruckt werden.

4.3.14 In-vitro-Transkription von 5S rRNA

Durch die Verwendung bestimmter Klonierungsvektoren ist es möglich, einzelsträngige RNA-Moleküle durch RNA- Polymerasen in vitro herzustellen. Solche Vektoren sind so konstruiert, dass die multiple Klonierungsstelle (MCS) von unterschiedlichen Promotoren flankiert wird. An diese spezifischen DNA-Abschnitte binden die jeweiligen RNA-Polymerasen. Der Promotor, der in dieser Arbeit verwendeten T7-RNA Polymerase liegt im Klonierungsvektor pBluescript II SK+ (Kapitel 3) im 3'-Bereich der MCS. Um daher von einer cDNA einen Sense-RNA-Strang herstellen zu können, muss dieser DNA-Abschnitt zunächst durch Klonierung in 5'-3'-Orientierung in den Vektor inseriert werden. Durch den Einsatz einer geeigneten Restriktionsendonuklease wurde das Plasmid anschließend im 5'-Bereich des Inserts linearisiert und durch die T7-RNA-Polymerase in eine Sense-RNA-Sonde transkribiert. Obwohl ein Digoxigenin-markiertes UTP als Substrat zur Markierung der RNA nicht nötig gewesen wäre, wurde zur Herstellung der 5srRNA das DIG RNA Labeling Mix (Roche Applied Science) verwendet, da es alle Komponenten für die in vitro Transkription von RNA beinhaltet.

- Pipettierschema eines Transkriptions-Ansatzes (20 µl):
 - 13 µl Linearisierter und aufgereinigter Vektor (1,5 µg)
 - 2 µl 10-facher Transkriptionspuffer (Roche Diagnostics GmbH)
 - 1 µl RNase Inhibitor (40 U/µl, Fermentas)
 - 2 µl DIG RNA Labeling Mix (Roche Applied Science)
 - 2 µl T7 RNA-Polymerase (20 U/µl, Roche Applied Science)

Der Ansatz wurde bei 37°C für zwei Stunden inkubiert. Die 5SrRNA wurde im Anschluss mit 2,5 µl 4M LiCl und 75 µl 100%igem Ethanol (p.a.) für eine Stunde bei -70°C gefällt. Anschließend wurde die RNA zentrifugiert (13.000 xg, 4°C, 30 min), das Sediment zwei Mal in 500 µl 70%igem Ethanol (p.a., in nukleasefreiem H₂O verdünnt) gewaschen (13.000 xg, 4°C, 10 min). Danach wurde das Sediment bei Raumtemperatur getrocknet und in 30 µl nukleasefreiem H₂O (+ 1 µl RNase Inhibitor) resuspendiert. Die rRNA wurde bis zum Gebrauch bei -70°C für mehrere Monate aufbewahrt.

4.4 Proteinbiochemische Methoden

4.4.1 Fällung von Proteinen

4.4.1.1 Methanol/Chloroform-Fällung

Zur Proteinlösung wurden das vierfache Volumen eisgekühltes Methanol (100%, p.a.), das einfache Volumen Chloroform (100%, p.a.) und das dreifache Volumen H₂O_{bideest.} gegeben. Der Ansatz wurde gemischt, zehn Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 5 Minuten bei 13.000 xg zentrifugiert. Es bildeten sich zwei Phasen, an deren Grenze (Interphase) sich die Proteine befinden. Die obere Phase wurde abgenommen, der verbleibende Rest mit vierfachem Volumen Methanol (100%, p.a.) vermischt und für eine Minute bei 13.000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinsediment für 15 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet und dann in 1-fach SDS-Probenpuffer (4.4.4) gelöst. Die gefällten Proteinproben wurden so lange bei 95°C erhitzt, bis sie vollständig in Lösung gegangen waren. Anschließend konnten die Proteine für längere Zeit bei -20°C aufbewahrt werden.

4.4.1.2 Acetonfällung

Proteine, die sich in wässriger Lösung befinden, können durch Zugabe von 6,5 Volumina Aceton (100%, p.a., -20°C) gefällt werden. Der Präzipitationsvorgang kann durch eine 2-stündige Inkubation bei -70°C (oder über Nacht bei -20°C) gefördert werden. Nach der Inkubationszeit wurden die gefällten Proteine für 10 Minuten bei 5.000 xg (4°C) zentrifugiert. Das Sediment wurde nach Abnahme des Überstands für 15 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet und schließlich in 1-fachem SDS-Probenpuffer gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

4.4.2 Dephosphorylierung von Proteinen

Das Anhängen und Abspalten von Phosphatgruppen an Serin, Tyrosin und Threonin ist ein Vorgang der sehr häufig stattfindet, um die Proteinaktivität zu regulieren. Dabei katalysieren Proteinkinasen die Phosphorylierung und Phosphatasen die Dephosphorylierung. Die Phosphorylierung verändert die Ladung eines Proteins, dessen IEP dadurch in den sauren pH-Bereich verschoben wird. In dieser Arbeit wurden Proteine aus prävitellogenen Oozyten einer Dephosphorylierung unterzogen, um anschließend die Verschiebung der IEPs in einem 2D-Gel (IEF) (4.4.5) nachzuweisen.

- Dephosphorylierungspuffer:
 - 10 mM MgCl₂
 - 150 mM NaCl
 - 100 mM Tris/HCl pH 8,8

- Dephosphorylierungsansatz (30 µl):
 - 35 mg prävitellogenes Ovar in 100 µl Dephosphorylierungspuffer
 - 20 µl Calf Intestine Alkaline Phosphatase(CIAP) (1U/µl, Fermentas)

Zunächst wurde das prävitellogene Ovar mit einem Homogenisator in Dephosphorylierungspuffer zerkleinert. Nach Zugabe der CIAP wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37°C unter Rotation inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz einer RNase-Behandlung unterzogen (4.4.3), bevor er für die 2D-Gelelektrophorese vorbereitet wurde.

4.4.3 RNase-Verdau von Oozytenextrakt

Ribonukleinpartikel (RNPs) bestehen aus RNA und Proteinen. Um die Proteine mit Hilfe einer 2D-Gelelektrophorese auftrennen zu können, müssen die Verbindungen innerhalb eines RNPs gelöst werden. Dies kann z.B. durch einen RNase Verdau ermöglicht werden. Hierzu wurde Oozytenextrakt (4.5.3) bzw. dephosphoryliertes prävitellogenes Ovar (4.4.2) durch Zugabe von RNase verdaut und anschließend in Aceton gefällt (4.4.1.2).

- RNase Verdau-Ansatz (1ml):
 - 30 µl Dephosphorylierungsansatz (siehe 4.4.2) bzw. Oozytenextrakt (4.5.3)
 - 3 µl RNase (10 mg/ml, Sigma)
 - auffüllen auf 1 ml mit PBS (4.2.2)

Der Ansatz wurde vermischt, für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Drehtisch inkubiert und im Anschluss mit Aceton gefällt (4.4.1.2).

4.4.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteingemische können durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit von Molekülen in einem elektrischen Feld hängt dabei von drei Faktoren ab: von Größe, Form und elektrischer Ladung. Bei der SDS-PAGE ist jedoch alleine die Masse für die Wanderungsgeschwindigkeit ausschlaggebend. Durch die Zugabe von Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS), einem stark anionischen Detergenz, werden oligomere Proteine in ihre Untereinheiten unterteilt und dadurch denaturiert. An die entfalteten Peptid-Ketten binden SDS-Moleküle und verleihen ihnen eine stark negative Ladung. Zur vollständigen Denaturierung gibt man außerdem Thiole (β -Mercaptoethanol) zu, um die Disulfidbrücken der Proteine zu spalten.

Bei der Probenvorbereitung wurde SDS im Überschuss hinzugegeben und die Proteine auf 95°C erhitzt, wodurch Sekundär- und Tertiärstrukturen zerstört wurden. Die denaturierten Proteingemische wurden in einem diskontinuierlichen Gelsystem aufgetrennt, wobei sich das SDS-Polyacrylamidgel aus dem Sammel- und dem Trenngel zusammensetzte. Die beiden Gele unterschieden sich in ihrer Acrylamidkonzentration, sowie ihrem pH-Wert. Das Durchwandern des Sammelgels durch das angelegte elektrische Feld bewirkte eine lokale und starke Fokussierung der Proteine, wohingegen die Proteine im sich anschließenden Trenngel aufgrund ihrer molekularen Masse aufgetrennt wurden. Zur Auftrennung der Proteinproben wurde das Gel- und Puffersystem nach Thomas und Kornberg (Thomas and Kornberg, 1975) mit Acrylamidkonzentrationen von 12%-18% verwendet.

- Lösung A:
 - 30% Acrylamid-Bis-Lösung für das Trenngel:
 - 30 g Acrylamid + 0,15 g Bis (N,N'-Methylendiacylamid) auf 100 ml H₂O_{bidest.}
- Lösung A':
 - 30% Acrylamid-Bis-Lösung für das Sammelgel (nach Laemmli, 1970):
 - 30 g Acrylamid + 0,8 g Bis (N,N'-Methylendiacylamid) auf 100 ml H₂O_{bidest.}
- Lösung B: Trenngelpuffer (pH 8.8):
 - 3 M Tris-HCl; pH 8.8
 - 0,4% SDS

- Lösung C: Sammelgelpuffer (pH 6.8):
 - 0,75 M Tris-HCl; pH 6.8
 - 0,4% SDS
 - 10% (w/v) APS (Ammoniumpersulfat) in H₂O_{bidest.}
- TEMED
- 0,5%ige Agarose-Lösung
- Elektrophoresepuffer (pH 8.8):
 - 50 mM Tris-HCl; pH 8.8
 - 380 mM Glycin
 - 0,1% (w/v) SDS
- 1-facher SDS-Probenpuffer nach Laemmli (1970), pH 6.8:
 - 100 mM Tris-HCl; pH 6.8
 - 10%(v/v) Glycerin
 - 1% (w/v) SDS
 - 5% (v/v) β -Mercaptoethanol

Proteine wurden durch Groß- oder Minigelapparaturen der Firma Gibco Life Technologies (München) bzw. durch eine Maxigelapparatur (Herstellung Uniwerkstatt) aufgetrennt. Dafür wurden zwei Glasplatten, zwei Abstandshalter (Spacer) sowie ein Kamm benötigt, die zunächst mit 70%igem Ethanol gereinigt wurden. Anschließend wurden die Glasplatten mit seitlich eingesetzten Spacern mit vier Klammern zusammengesetzt und unten und seitlich mit Tesafilm abgeklebt. Der Kamm wurde eingesetzt, um die Gießhöhe für das Trenngel zu markieren. Das Trenngel wurde so weit gegossen, dass zwischen Trenngel und unterem Ende des Kamms 1,0 cm Abstand eingehalten wurde. Der Kamm wurde entfernt und die Unterseite und die Flanken mit 0,5%iger Agarose abgedichtet, indem die flüssige Agaroselösung an den Seiten in den Aufbau pipettiert und der Boden etwa 5 mm hoch ausgegossen wurde. Während die Agarose auspolymerisierte, wurde die Trenngel-Lösung anhand des Pipettierschemas (siehe Tabelle) angesetzt. APS und TEMED wurden zuletzt zugegeben und lösten die Polymerisation der Gelmatrix aus. Die Lösung wurde gründlich vermischt und bis knapp über die Markierung in den Gelplatten-Aufbau gegossen. Das frisch gegossene Trenngel wurde vorsichtig mit destilliertem Wasser überschichtet, um zum einen die Polymerisation unter Luftausschluss zu beschleunigen und um zum andern eine gleichmäßige Polymerisationsgrenze zu erreichen. Nach etwa einer halben Stunde war die Gellösung vollständig auspolymerisiert und das Sammelgel konnte gegossen werden. Zunächst wurde das überschichtete Wasser abgegossen und anschließend die Sammelgel-Lösung zusammenpipettiert und auf das Trenngel gegossen. Nach dem Gießen wurde sofort der Kamm eingesetzt, wobei darauf geachtet wurde, dass sich keine Luftblasen bildeten.

Nachdem das Sammelgel ausgehärtet war, konnten der untere Spacer oder der Tesafilm entfernt werden. In die untere Kammer der Elektrophorese-Apparatur wurde Elektrophoresepuffer eingefüllt und das Gel in die Kammer eingespannt, so dass die Unterseite des Gels im Laufpuffer eingetaucht war. Eventuell vorhandene Luftblasen wurden anschließend mit Hilfe einer Spritze mit gebogener Kanüle entfernt. Dann wurde der Kamm vorsichtig aus dem Sammelgel gezogen und dabei eventuell verschobene Taschenstege mit einem sauberen Spatel wieder aufgerichtet. Danach wurde der obere Tank befüllt. Die aufzutrennenden Proteinproben wurden in Probenpuffer aufgenommen und kurz vor dem Beladen bei 95°C für 5 Minuten aufgekocht und anschließend für 1 Minute bei 10.000 g abzentrifugiert. In eine Geltasche eines Minigels konnte ein maximales Probevolumen von 25 μ l, 60 μ l in eine Geltasche eines Großgels und 100 μ l in die eines Maxigels pipettiert werden. Zur Molekulargewichtsbestimmung der aufgetrennten Proteinproben wurden jeweils 1 μ l (Minigel) bzw. 3 μ l (Groß-/Maxigel) Referenzproteine („High- und Low-Range“) (Bio-Rad, München) verwendet (Abbildung 4.3). Zur Markierung der Lauffront wurde in die leeren Geltaschen 5 μ l Bromphenolblau in Probenpuffer aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einem Minigel bei 40 mA für etwa 90 Minuten; Großgele wurden über Nacht bei 17 mA, Maxigele bei 52 mA, gefahren.

Die Elektrophorese wurde gestoppt, als die Bromphenolblaufront etwa 0,5 cm von der unteren Gelkante entfernt war. Das Gel wurde aus den Platten genommen und an einer Ecke markiert, um das Beladungsschema nachvollziehbar zu machen. Das Trenngel wurde mit einem Skalpell vom Sammelgel getrennt und mit Coomassie® Brillant Blue (SERVA, Heidelberg) (4.4.6.1) gefärbt.

TRENNGEL					
Lösung	Minigel			Großgel	Maxigel
	12%	15%	18%	15%	18%
A	2,0ml	2,5 ml	3,0 ml	5 ml	48 ml
B	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml	2,5 ml	20 ml
H ₂ O	1,7 ml	1,2 ml	0,7 ml	2,4 ml	11,4 ml
APS	50 µl	50 µl	50 µl	400 µl	800 µl
TEMED	1,66 µl	1,66 µl	1,66 µl	13,3 µl	26,66 µl

SAMMELGEL					
Lösung	Minigel			Großgel	Maxigel
A	325 µl			650 µl	3,9 ml
C	625 µl			1,25 ml	7,5 ml
H ₂ O	1,55 ml			3,1 ml	18,6 ml
APS	75 µl			150 µl	900 µl
TEMED	2,5 µl			5 µl	30 µl

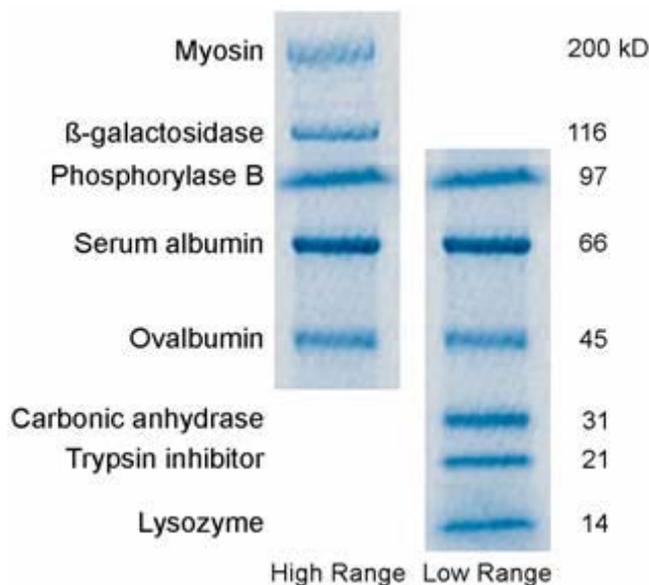


Abbildung 4-2 Protein-Größenmarker für die SDS-PAGE: High- und Low-Range-Marker (BioRad)

4.4.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese wurde anhand der Methode von O'Farrell und Ivarie (O'Farrell and Ivarie, 1979) durchgeführt. Die Proteine werden dabei ohne vorherige Denaturierung in der ersten Dimension durch einen pH-Gradienten nach ihrer Nettoeigenladung aufgetrennt. Im Anschluss erfolgt in der zweiten Dimension die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen.

4.4.5.1 Erste Dimension der isoelektrischen Fokussierung (IEF)

Bei der isoelektrischen Fokussierung baut sich ein ganz genau definierter pH-Gradient auf, in dem sich die Proteine, entsprechend ihres isoelektrischen Punktes, anordnen können.

- Lysispuffer:
 - 9,5 M Harnstoff
 - 2% Nonidet P40
 - 5% β -Mercaptoethanol
 - 0,8% Ampholine pH 4-6
 - 0,8% Ampholine pH 5-7
 - 0,4% Ampholine pH 2-11
- Überschichtungspuffer:
 - 6M Harnstoff
 - 0,4% Ampholine pH 4-6
 - 0,4% Ampholine pH 5-7
 - 0,2% Ampholine pH 2-11
- 30% Acrylamid-Bis-Lösung:
 - 28,38 g Acrylamid
 - 1,62 g Bis (N,N'-Methylendiacylamid) auf 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
- 10% Nonidet P40:
 - 10 g Nonidet P40 auf 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
- Kathoden-Puffer:
 - 10 mM H_3PO_4
- Anoden-Puffer:
 - 20 mM NaOH
- SDS-Probenpuffer (für 2. Dimension):
 - 60 mM Tris-HCl, pH 6.8
 - 10% Glycerin
 - 5% β -Mercaptoethanol
 - 2% SDS

4.4.5.1.1 Silikonisierung der Glasröhrchen

Die Glasröhrchen (Innendurchmesser: 2 mm) wurden in einen Messzylinder mit Silikonisierungslösung (Serva) überschichtet. Die Lösung konnte sofort wieder entfernt und die Röhrchen in einem Heizschrank für eine Stunde bei 80°C getrocknet werden. Nach dem Abkühlen der silikonisierten Glasröhrchen wurden die Rundgele der ersten Dimension gegossen. Vor dem Einfüllen der Gelmischung wurden die Röhrchen am unteren Ende mit mehreren Lagen Parafilm abgedichtet.

4.4.5.1.2 Rundgele

Bevor Ampholine, APS und TEMED zugegeben werden konnten, musste der Harnstoff vollständig gelöst sein. Die Gellösung wurde mit einer langen Pasteur-Pipette luftblasenfrei bis zu einer Höhe von etwa 12 Zentimetern in die silikonisierten Glasröhrchen eingefüllt. Anschließend wurde die Gellösung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ vorsichtig überschichtet, um eine gleichmäßige Polymerisation der Geloberfläche zu ermöglichen. Die Gele wurden entweder am Vortag gegossen und über Nacht bei 4°C auspolymerisiert, am gleichen Tag vorbereitet und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auspolymerisiert. Danach wurde die Geloberfläche gründlich mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gespült, der Parafilm entfernt und das untere Ende der Röhrchen mit Gaze-Stoff überzogen, um ein Herausgleiten der Gele während der Elektrophorese zu verhindern.

- Menge für ca. 10 Gele:
- 5,5 g Harnstoff
- 1,33 ml 30%ige Acrylamid-Bis - Lösung
- 2 ml 10%ige Nonidet NP 40 - Lösung
- 2 ml H₂O_{bidest.}
- 0,2 ml Ampholine pH 4-6
- 0,2 ml Ampholine pH 5-7
- 0,2 ml Ampholine pH 2-11
- 25 µl 10% APS
- 15 µl TEMED

Die Röhrchen wurden nach der Polymerisation in eine Elektrophoresekammer eingesetzt. Die untere Kammer wurde mit 10mM H₃PO₄-Lösung, die obere mit 20 mM NaOH-Lösung gefüllt.

4.4.5.1.3 Vorelektrophorese

Zur Einstellung des pH-Gradienten im Gel wurde eine Vorelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden die Rundgele mit 20µl Lysispuffer beladen und mit 20µl Überschichtungspuffer überschichtet. Danach wurden die Röhrchen, ebenso wie die obere Elektrophoresekammer, bis zum oberen Rand mit 20 mM NaOH-Lösung aufgefüllt. Die Vorelektrophorese wurde anhand des folgenden Protokolls durchgeführt:

- Elektrophoresebedingungen:
- obere Kammer: Kathode (-)
- untere Kammer: Anode (+)
- 30 min bei 200 V
- 30 min bei 300 V
- 60 min bei 400 V

Im Anschluss wurde der Kathodenpuffer abgesaugt, die Pufferlösungen von den Rundgelen abgezogen, und die Oberfläche der Rundgele mit H₂O_{bidest.} gespült.

4.4.5.1.4 Vorbereitung der Proben

Die aufzutrennenden Proteine wurden durch Zugabe von 9 Volumenanteilen Aceton bei -20°C für mindestens 3 Stunden oder über Nacht ausgefällt. Die präzipitierten Proteine wurden für 10 Minuten bei 5.000 xg zentrifugiert. Das getrocknete Sediment wurde in 30-60 µl Lysispuffer gelöst und die Probe auf das Rundgel aufgetragen. Die Probe wurde dann mit 20µl Überschichtungspuffer überschichtet und die Röhrchen wurden mit 20 mM NaOH-Lösung bis zum oberen Rand gefüllt. Parallel wurde, für die spätere pH-Messung, ein Rundgel ohne Proben, nur mit Lysispuffer bzw. Überschichtungspuffer, beladen.

- Elektrophoresebedingungen:
- obere Kammer: Kathode (-)
- untere Kammer: Anode (+)
- 16-18 Stunden bei 400 V

Die Rundgele wurden mit einer Wasser-gefüllten Spritze mit einem aufgesteckten Silikonschlauch vorsichtig aus dem Glasröhrchen herausgepresst. Anschließend wurden die Gele für 20 Minuten in SDS-Probenpuffer (für die zweite Dimension) äquilibriert. Danach wurde der SDS-Probenpuffer abgesaugt und die Rundgele entweder sofort auf die Flachgele der zweiten Dimension aufgetragen, oder bei -20°C für mehrere Wochen aufbewahrt.

4.4.5.1.5 Bestimmung des pH-Gradienten im Rundgel

Zur Bestimmung des pH-Gradienten in einem Rundgel wurde ein separat aufgetrenntes Gel der ersten Dimension in 5 mm lange Stücke unterteilt. Diese wurden einzeln in mit 3 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gefüllte 15 ml-Röhrchen überführt und über Nacht bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen gründlich geschüttelt, auf Raumtemperatur erwärmt und der pH-Wert jeder Probe bestimmt.

4.4.5.2 Zweite Dimension: SDS-PAGE

Die Flachgele wurden, wie unter 4.4.4 beschrieben, gegossen, ohne jedoch einen Kamm in das Sammelgel einzusetzen. Die äquilibrierten Rundgele der ersten Dimension wurden gleichmäßig gestreckt auf die Oberfläche der Sammelgele gelegt und mit flüssiger 1% Agarose-Lösung in SDS-Probenpuffer für die zweite Dimension eingegossen, so dass eine durchgehende Verbindung zwischen Rund- und Sammelgel hergestellt wurde. In einen flüssigen Agarosetrophen (1% Agarose in SDS-Probenpuffer) wurden jeweils 5 μl der Protein-Größenstandards (Abbildung 4-2) pipettiert und nach dem Festwerden an eine Seite des Gels angefügt. Ein Gel wurde über Nacht 16-18 Stunden bei 11-17 mA laufen gelassen. Nach der Elektrophorese wurden die Flachgele geblottet oder angefärbt (4.4.8 oder 4.4.6).

4.4.5.3 Erste Dimension: NEPHGE

Die Nichtgleichgewichts-pH Gradienten-Gelelektrophorese (NEPHGE) wird hauptsächlich zur Auftrennung basischer Proteine eingesetzt. Die Proteine migrieren bei dieser Technik nicht bis zu ihrem isoelektrischen Punkt (IEP), da der pH-Gradient bei längeren Laufzeiten im alkalischen Bereich instabil wird und die Elektrophorese deswegen vor dem Erreichen des Gleichgewichtszustands beendet werden muss. Die Proteine wandern von der Anode (+) zur Kathode (-), wobei der Kathodenpuffer alkalisch ist. Die Dauer der Elektrophorese richtet sich nach der Ladung der aufzutrennenden Proteine. Bei stark basischen Proteinen muss daher die Laufzeit entsprechend verkürzt werden.

- Lysispuffer 1:
 - 9,5 M Harnstoff
 - 0,5% SDS
 - 5% β -Mercaptoethanol
 - 2% Ampholine; pH 2 – 11
- Lysispuffer 2:
 - 9,5 M Harnstoff
 - 5%(w/w) Nonidet P40
 - 5% β -Mercaptoethanol
 - 2% Ampholine; pH 2 – 11
- Überschichtungslösung: 6 M
 - 6M Harnstoff
 - 5%(w/w) Nonidet P40
 - 1% Ampholine; pH 2 – 11
- 30% Acrylamid-Bis-Lösung:
 - 28,38 g Acrylamid
 - 1,62 g Bis (N,N'-Methylendiacylamid) auf 100 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
- 10% Nonidet P40:
 - 10 g Nonidet P40 auf 100 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
- Anoden-Puffer:
 - 10 mM H_3PO_4
- Kathoden-Puffer:
 - 20 mM NaOH

- SDS-Probenpuffer (für 2. Dimension):
 - 60 mM Tris-HCl, pH 6.8
 - 10% Glycerin
 - 5% β -Mercaptoethanol
 - 2% SDS

Die Lysispuffer 1 und 2 sowie die Übersichtungslösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Alle übrigen Lösungen wurden vor Gebrauch frisch angesetzt.

4.4.5.3.1 Silikonisierung der Glasröhrchen

Die Röhrchen wurden wie unter 4.4.5.1.1 beschrieben silikonisiert.

4.4.5.3.2 Vorbereitung der Proben

Die aufzutrennende Proteinprobe wurde in Probenpuffer nach Laemmli (4.4.4) aufgenommen und durch 5-minütiges Erhitzen auf 95°C gelöst. Nachdem die Lösung abgekühlt war, wurden die Proteine durch Zugabe von 9 Volumenanteilen Aceton bei -20°C für mindestens 3 Stunden oder über Nacht ausgefällt. Die präzipitierten Proteine wurden für 10 Minuten bei 1.000 xg abzentrifugiert und zweimal mit 90%igem Aceton gewaschen. Das getrocknete Sediment wurde in 30 μl Lysispuffer 1 gelöst. Nach Zugabe von 30 μl Lysispuffer 2 wurden unlösliche Bestandteile abzentrifugiert und die Probe auf das Rundgel aufgetragen. Die aufgetragene Probe wurde mit 20 μl Übersichtungslösung überschichtet und das Röhrchen bis zum oberen Rand mit Anodenpuffer (10 mM H_3PO_4) aufgefüllt. Als Farbmarker für stark basische Proteine wurde Cytochrom C (IEP > 11) auf ein separates Rundgel geladen.

- Elektrophorese-Bedingungen:
 - Obere Kammer: Anode (+)
 - Untere Kammer: Kathode (-)
- Bei konstanter Spannung:
 - 15 min 200 V
 - 30 min 300V
 - 90 min 400V

Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn das Cytochrom C noch etwa 2 Zentimeter vom Gel-Ende entfernt war. Die Rundgele wurden mit einer Wasser-gefüllten Spritze mit einem aufgesteckten Silikonschlauch vorsichtig aus dem Glasröhrchen herausgepresst. Anschließend wurden die Gele für 20 Minuten in SDS-Probenpuffer (für die zweite Dimension) äquilibriert. Danach wurde der SDS-Probenpuffer abgesaugt und die Rundgele entweder sofort auf die Flachgele der 2. Dimension aufgetragen. Alternativ dazu konnten die Rundgele bei -20°C für mehrere Wochen aufbewahrt werden.

Im Anschluss wurde die 2. Dimension der 2D-Gelelektrophorese durchgeführt (4.4.5.2) und der pH-Gradient im Rundgel bestimmt (4.4.5.1.5).

4.4.6 Färbung von SDS-Gelen

4.4.6.1 Coomassie-Färbung

- Coomassie-Färbelösung:
 - 0,25% (w/v) Brillant Blue R250 (Roth)
 - 40% (v/v) Methanol
 - 8% (v/v) Essigsäure
- nach dem Ansetzen der Lösung filtrieren!

- Entfärbelösung:
 - 25% (v/v) Methanol
 - 10% (v/v) Essigsäure

Coomassie färbt unspezifisch alle Proteine, indem es sich an aromatische und basische Seitenketten anlagert. Für die Coomassie-Färbung wurde das Gel 60 Minuten in der Färbelösung sanft geschüttelt und anschließend über Nacht in Entfärber gelegt. Durch Zugabe eines gefalteten weißen Papiertuches konnte die Entfärbung beschleunigt werden und ein Austausch der Entfärbelösung wurde überflüssig. Das gefärbte Gel wurde auf einem Leuchtschirm betrachtet oder eingescannt.

4.4.6.2 Silberfärbung

Zunächst wurden die Gele wie unter 4.4.6.1 beschrieben mit Coomassie gefärbt und entfärbt, wodurch sie fixiert wurden. Außerdem wurde die Hintergrundfärbung im Folgenden deutlich reduziert.

- Fixierlösung (ausreichend für 2 Minigele bzw. 1 Großgel):
 - 3,8 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$
 - 8 ml 25%iges Glutaraldehyd
 - 192 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
- Färbelösung (frisch ansetzen):
 - 184 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
 - 3,7 ml 1M NaOH
 - 3,9 ml NH_4OH
 - 20% AgNO_3 (1,55 g in 8 ml H_2O)
 - langsam unter Rühren zugeben;
- Reduktionslösung:
 - 20 ml EtOH p.a.
 - 1,2 ml 1%ige Zitronensäure (frisch ansetzen!)
 - 40 μl 37% Formaldehyd
 - auf 200 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auffüllen
- 5%ige Essigsäure

Zunächst wurden die Gele gründlich mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gewaschen worauf eine 15-minütige Inkubation in Fixierungslösung erfolgte. Anschließend wurde das fixierte Gel erneut für 20 Minuten mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gewaschen. Durch die darauf folgende 20-minütige Inkubation mit der Färbelösung wurde das Gel mit den Silberionen getränkt. Überschüssige Silberionen wurden durch anschließendes Waschen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ entfernt. Nach dem Waschen erfolgte der eigentliche Färbeschritt. Nach Zugabe von 200 ml Reduktionslösung und kurzem Schwenken entstand ein rotbrauner Niederschlag aus Silbercarbonat, der aus reduziertem Silber besteht. Nach etwa 30 Sekunden färbte sich der Hintergrund des Gels gelblich und die Proteinbanden erschienen hellbraun. Nach etwa 3 – 5 Minuten wurde die Reaktion durch 5%ige Essigsäure gestoppt und danach durch $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ ersetzt. Dieser Waschvorgang wurde mehrmals wiederholt. Nach Abschluss der Färbereaktion konnten die Gele im Durchlicht betrachtet oder direkt eingescannt werden.

4.4.7 Trocknen von SDS-Gelelen

Die gefärbten SDS-Gele wurden getrocknet, um sie für einen längeren Zeitraum aufbewahren zu können. Das entfärbte Gel wurde zwischen zwei nasse Zellophan-Folien gepackt und in einen Plexiglasrahmen gespannt und 48 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Nach dem Trocknungsprozess wurde das Gel entnommen und bei Bedarf zwischen zwei Glasplatten geglättet.

4.4.8 Westernblot

Nach der Auftrennung der Proteingemische durch die SDS-PAGE (4.4.4) konnten die Polypeptide elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran (Towbin et al., 1979) transferiert und dadurch immobilisiert werden.

- Westerblot-Puffer 1:
 - 25 mM Tris-HCl
 - 20% (v/v) Methanol
 - pH einstellen auf 10,4
- Westerblot-Puffer 2:
 - 300 mM Essigsäure
 - 20% (v/v) Methanol
 - pH einstellen auf 10,4
- Westerblot-Puffer 3:
 - 25 mM Tris-HCl
 - 40 mM DL-Norleucin
 - 20% (v/v) Methanol
 - pH einstellen auf 9,4
- TBST (pH 8.0):
 - 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
 - 150 mM NaCl
 - 0,05 % (w/v) Tween® 20
- Absättigungslösung:
 - 10 % (w/v) Magermilchpulver in TBST
 - pH einstellen auf 7,4
- Ponceau S Gebrauchsfertige 0,2%ige Lösung (Serva)
- ECL-Lösungen 1 und 2 (Amersham Pharmacia Biotech)

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel aus der Kammer genommen und das Sammelgel mit einem Skalpell vom Trenngel entfernt. Zur Markierung wurde eine Ecke des Trenngels entfernt. Anschließend wurde das Gel für 15 Minuten im Westernblot-Puffer 3 äquilibriert. Während dieser Zeit wurden die Nitrozellulose-Membran und die Whatman-Filter auf die Gelgröße zugeschnitten. Danach wurde der Westernblot (Abbildung 4-3) aufgebaut. Der Transfer erfolgte mit einer Glaskohlenstoff-Elektroden-Blottingkammer (Fa. Cti GmbH). Jeweils drei Whatman-Filter wurden kurz in den jeweiligen Westernblot-Puffern eingeweicht, bevor sie in der Blottingkammer übereinander geschichtet wurden. Um Luftblasen-Bildungen zu vermeiden, wurden die Whatman-Filter mit einem Zentrifugenröhrchen mit sanftem Druck gewalzt. Luftblasen unter dem Gel wurden vorsichtig mit befeuchteten Fingern heraus gestrichen, die Nitrozellulose-Membran wurde nur aufgelegt. Im Anschluss wurde die Kathodenplatte aufgesetzt und die Kammer an eine Stromquelle angeschlossen. Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm für 1,5 Stunden. Danach wurde der Blot abgebaut und die transferierten Proteine mit Ponceau S auf der Nitrozellulose-Membran nachgewiesen. Dazu wurde der Blot in einer Glasschale mit etwa einem Zentimeter Ponceau S überschichtet und für 5 Minuten unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ entfärbt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran entweder über Nacht bei 4°C oder für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 10% (w/v) Magermilch in TBST, pH 7.4 inkubiert. Danach konnten die immobilisierten Proteine durch spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen und mit Hilfe von enzymgekoppelten Sekundärantikörpern nachgewiesen werden.

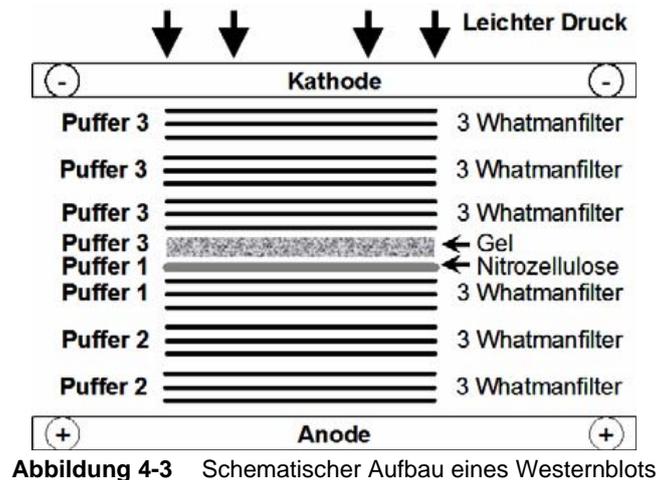


Abbildung 4-3 Schematischer Aufbau eines Westernblots

4.4.9 Spezifischer Proteinnachweis mit Antikörpern

Der in Milch abgesättigte Blot wurde 1-2 Stunden mit dem in Absättigungslösung bzw. TBST verdünnten Antikörper bei RT inkubiert. Die Verdünnung war abhängig vom verwendeten Antikörper (Kapitel 3). Nach der Antikörperinkubation wurde der Blot 3x10 Minuten mit TBST gewaschen. Die Sekundärantikörperinkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur (Verdünnung Kapitel 3) in der Regel in Milch. Anschließend wurde erneut 3x10 Minuten in TBST gewaschen. Die Detektion erfolgte anschließend mit ECL (4.4.10).

4.4.10 Enhanced Chemi-Luminescence (ECL)

Für eine Detektion über ECL musste ein Sekundärantikörper verwendet werden, der an Peroxidase gekoppelt war. Die ECL-Reaktion wurde im Anschluss an die oben beschriebenen Waschschritte durchgeführt. Dafür wurden die beiden ECL-Lösungen (Amersham Pharmacia Biotech) im Verhältnis 1:1 gemischt, der Blot damit benetzt und 1-3 min inkubiert. Durch die Peroxidase wird die ECL-Lösung so umgesetzt, dass Licht in Form chemischer Lumineszenz emittiert wird. Danach wurde die Lösung abgetropft und der Blot faltenfrei in Frischhaltefolie eingeschlagen. Anschließend wurde mit dem Blot ein Röntgenfilm (Agfa) belichtet. Die Expositionsdauer lag je nach Signal zwischen 1 Sekunde und über Nacht. Der Röntgenfilm wurde 1-3 min im Entwicklerbad inkubiert und dann nach kurzem Spülen mit Wasser fixiert. Zum Schluss wurde der Film noch gründlich mit Wasser gespült und getrocknet. Zur Dokumentation wurden die Filme eingescannt und mit Adobe Photoshop bearbeitet.

4.4.11 Entfernung gebundener Antikörper (Strippen)

- Stripppuffer (50 ml):
 - 100 mM Tris-HCl, pH 6.7
 - 2% (w/v) SDS
 - 390 µl β-Mercaptoethanol
- TBST (siehe 4.4.8)

Um eine Nitrozellulose-Membran für eine weitere Antikörperinkubation verwenden zu können, müssen zunächst die gebundenen Antikörper entfernt werden. Die Antigen-Antikörper-Bindung kann durch Zugabe von reduzierenden Reagenzien oder einem saurem pH-Wert bei mittlerer Hitze gelöst werden. Der Blot wurde zunächst gründlich mit TBST gewaschen und dann für exakt eine halbe Stunde bei 50°C in Stripppuffer unter leichter Bewegung inkubiert. Anschließend wurde die Membran in einem großen Volumen TBST für dreimal 10 Minuten gewaschen. Danach konnte der Blot erneut abgesättigt und mit einem anderen Primärantikörper inkubiert werden.

4.4.12 Proteine mit His-tag

4.4.12.1 Herstellung eines Proteins mit C-terminalem Histidin-tag

Um Histidin-Fusionsproteine herstellen zu können, wurde zunächst der entsprechende kodierenden DNA-Abschnitt unter Berücksichtigung des Leserasters in den Expressionsvektor pQC-6xHis einkloniert und in Bakterien transformiert. Bei der Expression dieses Konstrukts entsteht ein Protein, das am Carboxyterminus sechs Histidinreste trägt. Durch diese spezifische Aminosäureabfolge ist es möglich, das Fusionsprotein über Ni-NTA-Agarosekügelchen aufzureinigen. Für die Expression eines Proteins mit Histidin-Anhang („Tag“) wurde der Bakterienstamm M15 verwendet (siehe Kapitel 3).

- LB-Selektionsmedium (siehe 4.1.1)
- IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid; SL: 1M in H₂O_{bidest.})

Eine Flüssigkultur wurde mit einer Übernachtskultur (4.1.1.2) angeimpft und bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Nach dem die Bakterienkultur eine Zelldichte von OD600 = 0,5 – 0,8 erreicht hatte, wurden die Expression des Fusionsproteins durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration = 1 mM) in den Zellen induziert. Die Induktion dauerte 1,5-4 Stunden. Zur Kontrolle der Proteinexpression wurde kurz vor der IPTG-Induktion ein definiertes Volumen aus der Expressionskultur entnommen und ebenfalls für vier Stunden bei denselben Bedingungen weiter kultiviert. Die nicht-induzierte Probe diente als Kontrolle, ob das Fusionsprotein nach der Induktion von den Bakterienzellen im gewünschten Maß exprimiert wurde. Beide Kulturen wurden anschließend für 10 Minuten bei 5.000 xg zentrifugiert. Die Bakteriensedimente konnten entweder direkt für die Aufreinigung verwendet oder für einen längeren Zeitraum bei -20°C gelagert werden.

4.4.12.2 Denaturierende Aufreinigung des Proteins mit C-terminalem Histidin-tag

Als Protokoll für die His-Tag Reinigung diente das Ni-NTA Spin Handbook (Qiagen). Die Reinigung beruht darauf, dass die positiven Ladungen von sechs aufeinanderfolgenden Histidinen bei pH 8.0 an Ni-NT Agarose (Qiagen) binden und bei einem pH von 5,9 bzw. 4,5 eluiert werden können, nachdem andere Zellbestandteile gewaschen wurden. Da nur schwerlösliche Proteine aufgereinigt wurden, wurde immer die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt.

- Puffer B - E:
 - 8 M Harnstoff
 - 0,1 M NaH₂PO₄
 - 10 mM Tris/HCl
- Puffer B pH 8,0
- Puffer C pH 6,3
- Puffer D pH 5,9
- Puffer E pH 4,5
- Neutralisationspuffer (pH 9,5)
 - 1M Tris/HCl

Die induzierten Bakterienpellets wurden in 5 ml Puffer B pro Gramm Pellet resuspendiert und über Nacht bei 4°C unter Drehen inkubiert. Das Lysat wurde auf Eis sonifiziert (Einstellung 7: Mikro/Mini-Tip; fünf mal kurz) und dann bei 10.000 xg (Sorvall Zentrifuge, HB-6 Rotor) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die vorbereitete Säule gegeben (~1 ml Ni-NT Agarose pro 200 ml Flüssigkultur; mit Puffer B equilibriert). Der Durchlauf wurde aufbewahrt und die Säule wurde daraufhin mit dem 5fachen Säulenvolumen Puffer B und Puffer C gewaschen und anschließend dreimal mit 1 ml Puffer D und fünfmal mit 1 ml Puffer E eluiert. Zu jedem Aliquot wurde 1/10 Volumen Neutralisationspuffer zugegeben bzw. vorgelegt. Das Eluat wurde in kleine Aliquots à 500 μ l aufgefangen. Die aufgereinigten Proteine konnten im neutralisierten Puffer E für mehrere Tage bei 4°C oder über einen längeren Zeitraum bei -20°C gelagert werden, ohne dass Degradationserscheinungen auftraten. Über

eine Western Blot-Analyse (4.4.8) wurde überprüft, in welchen Elutionsfraktionen sich die Proteine befanden. Zum weiteren Gebrauch konnten die Elutionsfraktionen direkt eingesetzt werden, oder sie wurden gegen den entsprechenden Puffer dialysiert (4.4.14).

4.4.13 Bestimmung der Proteinkonzentration durch eine BSA-Reihe

Um die ungefähre Konzentration eines gereinigten und dialysierten Proteins oder eines Antikörpers zu bestimmen, wurden unterschiedliche Volumina der zu bestimmenden Proteinlösung im SDS-Gel mit BSA-Standards (bovines Serumalbumin) verglichen.

4.4.14 Renaturierung aufgereinigter Proteine

Durch die Dialyse können Proteine ihre natürliche Faltung wieder annehmen, wenn der Harnstoff sukzessive aus dem Puffer entfernt wird. Durch langsames Absenken der Harnstoffkonzentration im den Dialyseschlauch umgebenden Medium, strömt der Harnstoff aufgrund des osmotischen Gradienten durch die Membran nach außen. Der Dialyseschlauch wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gründlich durchgespült und an einem Ende mit Dialyseklammern verschlossen. Anschließend wurde die Proteinlösung eingefüllt und der Schlauch mit einer weiteren Klammer verschlossen. Anschließend erfolgte die renaturierende Dialyse unter ständigem Rühren.

- Dialyselösungen (jeweils 1 l):
 - 1 h bei RT 6 M Harnstoff/1-fach PBS
 - 1 h bei RT 4 M Harnstoff/1-fach PBS
 - 1 h bei 4°C 3 M Harnstoff/1-fach PBS
 - 1 h bei 4°C 2 M Harnstoff/1-fach PBS
 - 1 h bei 4°C 1 M Harnstoff/1-fach
 - 1 h bei 4°C 1-fach PBS
 - ÜN bei 4°C 1-fach PBS

4.5 Arbeiten mit *Xenopus laevis*

4.5.1 Operative Entnahme von Ovar

- Anästhesierungsmedium MS 222:
 - 0,2 % (w/v) (3-Aminobenzoessäureethylestermethansulfonat)
 - in Leitungswasser lösen und bei 4°C lagern
- Modified Barth-Medium (MBS):
 - 90 mM NaCl
 - 10 mM HEPES
 - 2 mM NaHCO_3
 - 1 mM KCl
 - 0,8 mM MgSO_4
 - 0,4 mM CaCl_2
 - 0,3 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$
 - Zugabe von eine Spatelspitze Phenolrot
 - pH 7.6 mit NaOH einstellen

Für die Präparation von Oozyten wurden *Xenopus laevis* Weibchen für 20 Minuten in MS222 betäubt. Nachdem die Tiere vollständig narkotisiert waren, wurden sie mit dem Rücken auf Eis gelegt, um zusätzlich den Kreislauf zu verlangsamen. Mit einem Einschnitt von einem Zentimeter wurde die Bauchhöhle geöffnet. Durch diese Öffnung wurden Teile des Ovars entnommen und in MBS überführt. Die Wunde wurde zugenäht und die Frösche konnten nach dem Aufwachen zurück in ein Zuchtbecken gegeben werden. Die Oozyten konnten bis zur weiteren Verwendung höchstens 48 Stunden bei 16 °C in MBS aufbewahrt werden.

4.5.2 Operative Entnahme von Hoden und Geweben

- Anästhesierungsmedium MS 222:
 - 0,2 % (w/v) (3-Aminobenzoessäure-ethylestermethansulfonat)
 - in Leitungswasser lösen und bei 4°C lagern
- Aufbewahrungs-Medien:
 - (A): PBS (siehe 4.2.2)
 - (B): RNAlater[®] solution (Ambion)
 -

Geschlechtsreife *Xenopus laevis* Männchen wurden für mindestens 20 Minuten in Anästhesierungsmedium MS222 betäubt und anschließend auf Eis gelegt. Die entnommenen Hoden bzw. Gewebeprobe wurden sofort in Aufbewahrungs-Medium überführt. In PBS konnten sie maximal 48 Stunden bei 4°C, in RNAlater[®] konnten sie dagegen für Monate bei -20°C gelagert werden.

4.5.3 Herstellung eines Oozytenextrakts

Entsprechende Mengen von verschiedenen Oozytenstadien (ausgehend von vier Oozyten Stadium 6) wurden mit einem Eppendorf-Teflon-Homogenisator in MBS (siehe 4.5.1) oder PBS (4.2.2) homogenisiert. Anschließend wurde die Lösung bei 5000 xg für fünf Minuten zentrifugiert, um unlösliches Material zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und konnte für Folgeversuche verwendet oder gefällt (4.4.1) werden.

4.5.4 Stimulierung der Eireifung

- HCG (Humanes Choriongonadotropin):
 - 2 U/μl (Sigma)
 - lyophilisiertes Hormon in 5 ml sterilem H₂O_{bidest.} lösen
- 1-fach MMR (Marc's Modified Ringer) (pH 7.8):
 - 100 mM NaCl
 - 15 mM HEPES
 - 2 mM KCl
 - 2 mM CaCl₂
 - 1 mM MgCl₂
 - pH einstellen auf 7.8

Geschlechtsreife *Xenopus laevis* Weibchen können durch Injektion des menschlichen Schwangerschaftshormon HCG (humanes Choriongonadotropin) zur Eireifung und Abbläichen stimuliert werden. Abhängig von der Körpergröße, wurden den Tieren 300 bis 800 Einheiten des Hormons gespritzt. Nach 12 Stunden beginnt das stimulierte Weibchen mit der Eiablage, die durch sanftes Massieren des Hinterleibs gefördert werden kann. Die Eier wurden direkt in 1-fachem MMR in eine 150-mm-Kukturschale abgelaicht. Injizierte Tiere konnten nach einer 3-monatigen Ruhephase erneut stimuliert werden.

4.5.5 In vitro Fertilisation

- 1-fach MMR: (4.5.4)
- 0,1-fach MMR: 1:10 Verdünnung von 1-fach MMR
- Cystein-Lösung (pH 7.8):
 - 2% (w/v) Cystein-HCl
 - in 0,1-fach MMR lösen
 - pH einstellen auf 7.8

Die frisch gelaichten Froscheier wurden zunächst mit 1-fachem MMR gründlich gewaschen. Anschließend wurde die Salzlösung vollständig entfernt. Der Hoden wurde mit einem sauberen

Skalpell in Längsrichtung aufgeschnitten und mit einer Pinzette vorsichtig über die Eier gestrichen. Nach 5 Minuten wurden die befruchteten Eier mit 0,1-fachem MMR überschichtet. 15 Minuten später drehen sich die befruchteten Eier mit der pigmentierten animale Seite nach oben. Eine erfolgreiche Befruchtung konnte durch das Verschwinden des hellen Chromosomenflecks am animalen Pol nach etwa einer halben Stunde beobachtet werden. 45 Minuten nach der Befruchtung wurde die Gallerthülle chemisch entfernt. Das 0,1-fache MMR wurde durch die Cystein-Lösung (pH 7.8) ersetzt und etwa 5 Minuten einwirken lassen. Das Cystein drängt sich in die Disulfid-Brücken der Gallertproteine, wodurch diese voneinander getrennt werden. Unter der Stereolupe wurde das Auflösen der Gallerthülle ständig kontrolliert, da ein zu langes Einwirken der Cystein-Lösung ebenfalls die Embryonenproteine negativ beeinträchtigen kann.

4.5.6 Embryonenhaltung und Isolation

- 0,1-fach MMR: (4.5.4)
- Aktivkohle-Agarschalen (1 l):
 - 20 g Aktivkohle
 - 20 g Agar-Agar
- aufkochen und auf 50°C abkühlen lassen
- 5 g Sulfodiazin

Nach Entfernung der Gallerthülle wurden die Embryonen in Aktivkohle-Agarschalen überführt, die mit 0,1-fachem MMR gefüllt waren. Aktivkohle und das Antibiotikum Sulfodiazin erhöhen die Überlebensrate der Embryonen. Die Entwicklung fand bei ca. 23°C statt. Die erreichten Entwicklungsstadien wurden anhand der Normentafel nach Nieuwkoop und Faber (Nieuwkoop and Faber, 1975) bestimmt.

4.5.7 Manuelle Isolierung von Oozyten

Oozyten konnten manuell, mit Hilfe von Uhrmacherpinzetten, defollikuliert werden. Dabei wurden die Follikelzellmembran und die Vitellinmembran entfernt. Ovarstücke von ca. 30 Oozyten wurden dafür in Petrischälchen gefüllt mit MBS überführt, wobei defollikulierte Oozyten in frischem Medium für einige Stunden bei Raumtemperatur gelagert werden konnten. In dieser Arbeit wurden Oozyten der Stadien II-VI manuell defollikuliert und für RT-PCR-Experimente verwendet (4.3.1). Stadium I Oozyten konnten nicht manuell defollikuliert werden und wurden durch Collagenase-Verdau (4.5.8) vereinzelt.

4.5.8 Isolierung von Oozyten durch Collagenase-Verdau

- Collagenase-Lösung:
 - 0,2% Collagenase Typ IA aus *Clostridium histolyticum* (Sigma)
 - MBS (4.5.1)

Oozyten konnten durch einen Collagenase-Verdau von ihrer Follikelzellmembran befreit werden. Derart behandelte Oozyten wurden für Mikroinjektionsexperimente benötigt. Das Ovar musste dafür zunächst operativ entnommen werden (4.5.1). Einzelne Stücke von ca. 30 Oozyten wurden in einen Erlenmeyer-Kolben gefüllt mit Collagenase-Lösung gegeben und unter leichtem Schütteln in einem Wasserbad bei 28°C für 90 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die vereinzelt Oozyten in MBS mehrfach gewaschen, konnten darin für 24 Stunden gelagert, oder für weitere Experimente verwendet werden.

4.5.9 Mikroinjektion in das Zytoplasma von Oozyten

- MBS (4.5.1)
- verschiedene in vitro hergestellte mRNAs (4.3.13)

Reifes Ovar von *Xenopus laevis* wurde einem Collagenase-Verdau (4.5.8) unterzogen. Für die Mikroinjektion wurden hier nur prävitellogene Oozyten der Stadien I-II verwendet. Die zu injizierenden Oozyten wurden nach dem Verdau aussortiert und in eine mit MBS gefüllte Petrischale (\varnothing 60 mm) überführt. In der Petrischale befand sich ein Objektträger SuperFrost® Plus (Menzel-Gläser). Auf diesem hafteten die Eizellen besonders gut und ließen sich leichter mikroinjizieren. Es wurden Injektionsnadeln der Firma Eppendorf (Femtotips) mit einem Innendurchmesser von 0,5 μ m verwendet. Zur Injektion wurde die Spitze jeder Nadel am Rand eines Deckgläschens, welches sich ebenfalls in der Petrischale befand, abgebrochen. Mit Hilfe des FemtoJet® (Eppendorf) und unter einem Umkehrmikroskop mit Mikromanipulator wurden in jede Oozyten ca. 30 pg mRNA injiziert. Nach der Injektion wurden die Oozyten in Petrischalen mit frischem MBS überführt und im Dunkeln bei 20°C für 24 Stunden inkubiert.

4.5.10 Mikroinjektion in das Zytoplasma von somatischen Zellen

- verschiedene in vitro hergestellte mRNAs (4.3.13)

Die Zellen wurden in Schälchen auf Deckgläschen, in die mittig ein Ring mit einem Diamantmesser eingeritzt wurde, ausgesät und in der Schale injiziert. Injiziert wurden nur die Zellen, die sich innerhalb des Ringes befanden, um sie nach der Inkubation leichter zu identifizieren. Wie unter 4.5.9 beschrieben wurden Injektionsnadeln der Firma Eppendorf (Femtotips) mit einem Innendurchmesser von 0,5 μ m und der FemtoJet® (Eppendorf) verwendet. In jede Zelle wurden ca. 3pg mRNA injiziert, wobei die Zellen nach der Mikroinjektion verschlossen im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen mit den injizierten Zellen aus den Schälchen genommen, fixiert (4.6.2.1) oder lebend (4.9.3) unter dem Mikroskop betrachtet.

4.5.11 Inkubation der Oozyten mit Zellgiften

- 200 nM Leptomycin B (Sigma) in MBS (siehe 4.5.1)
- 50 μ g/ μ l Actinomycin D (Sigma) in MBS
- 50 μ g/ μ l Cycloheximid (Sigma) in MBS
- 1 mM Methyladenosine/DMSO (Sigma) in MBS
- 1 mM Adenosindialdehyd/DMSO (Sigma) in MBS

In einigen Experimenten wurden Oozyten mit Zellgiften behandelt, um die Auswirkungen des jeweiligen Zellgiftes auf bestimmte Proteine und Strukturen innerhalb der Oozyte zu beobachten. Die Eizellen von *Xenopus laevis* wurden in dieser Arbeit mit Leptomycin B (LMB), Actinomycin D (AMD), Cycloheximid (CHX), dem Methyltransferaseinhibitor Methyladenosine (MTA) bzw. Adenosindialdehyd (AdOx) inkubiert (alle von Sigma) (Verdünnungen siehe oben). Die Inkubation der Oozyten in AMD erfolgte für vier Stunden bei Raumtemperatur, die der anderen Zellgifte über Nacht bei 16°C. Die Toxine wurden nach der Inkubation nicht durch Waschschriffe entfernt, stattdessen wurden die Oozyten sofort für Folgeversuche (z.B. Einbettung für TEM) weiterverwendet. In parallelen Kontrollexperimenten wurden die Oozyten in MBS bzw. MBS/DMSO ohne Zusätze inkubiert.

4.6 Immunologische Methoden

4.6.1 Immunpräzipitation mit Sheep anti-mouse IgG Dynabeads® M-450 (Invitrogen)

Die Immunpräzipitation (IP) dient zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Der Nachweis der Protein-Interaktion erfolgt bei einer IP invitro, indem mit Hilfe eines Antikörpers ein bestimmtes Protein samt Interaktionspartner aus einem Proteingemisch heraus präzipitiert wird. Das präzipitierte Protein und seine Interaktionspartner werden im Anschluss im Western Blot (4.4.8) nachgewiesen. Zur Präzipitation wurden Dynabeads® M-450 (Dyna) verwendet. Die verwendeten

Beads waren mit polyklonalem sheep anti-mouse IgG-Antikörper beschichtet und konnten somit Maus Antikörper binden. Nach der Bindung des Maus-Antikörpers wurden die Beads mit prävitellogenem Oozytenextrakt inkubiert (4.5.3) und im Anschluss wurden die gebundenen Proteine mitsamt Antikörper wieder eluiert und analysiert.

- PBS (4.2.2)
- 300 µl Oozytenextrakt/PBS (10-20 µg/µl)
- Natrium-Phosphat-Puffer pH 8,0:
 - 100mM Na₂HPO₄
 - 100 mM NaH₂PO₄
 → Na₂HPO₄ als Grundlage nehmen und mit NaH₂PO₄ den pH-Wert einstellen
- Präzipitationspuffer (pH 8,0):
 - Na-Ph-Puffer
 - 0,1% (w/v) Bovines Serumalbumin (BSA)
- Maus-Antikörper (pro Ansatz):
 - 1 µg anti-EF1A (clone CBP-KK1, upstate)
 oder
 - 0,5 µg IV'D4 (eigene Herstellung)
- 25 µl (4x10⁸ Beads/ml) Sheep-anti-mouse Dynabeads® (Invitrogen)

Das Oozytenextrakt wurde bei 5000 xg für fünf Minuten zentrifugiert. Der jeweilige Maus-Antikörper wurde zum Überstand gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Drehtisch inkubiert. Währenddessen wurden die Beads mit 500 µl Präzipitationspuffer 30 Minuten bei Raumtemperatur abgesättigt, die Beads mit einem Magneten pelettiert und der Überstand abgenommen. Im Anschluss wurde vorinkubierte Antikörper-Antigen-Mischung zu den Beads gegeben und der Ansatz für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur auf einem Drehtisch inkubiert. Nach der Bindung wurden die Beads dreimal mit PBS (4.2.2) gewaschen und im Anschluss für eine SDS-PAGE (4.4.4) vorbereitet.

4.6.2 Immunlokalisationen

Mit der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie können intrazelluläre Antigene in Geweben oder Kulturzellen von spezifischen Antikörpern im Lichtmikroskop lokalisiert werden. Dabei erkennt ein spezifischer Primärantikörper das zu analysierende Protein, wobei ein universeller Sekundärantikörper, der kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, an den Primärantikörper bindet.

4.6.2.1 Fixierung von somatischen Kulturzellen

Zunächst müssen die Zellen fixiert und in einem nachfolgenden Schritt permeabilisiert werden, um die Zugänglichkeit der Antikörper ins Innere der Zellen zu gewährleisten.

4.6.2.1.1 Methanol/Aceton-Fixierung

Die Arbeitsschritte dieser Methode werden bei -20°C durchgeführt, wodurch empfindliche Zellstrukturen besonders schonend fixiert werden. Durch die Behandlung mit Methanol wird den Zellen das Wasser entzogen und dadurch die Proteinstrukturen fixiert. Das Lösungsmittel Aceton sorgt für die notwendige Permeabilisierung der Zellwände und Lipidmembranen.

- Methanol: 100% (techn.), -20°C
- Aceton: 100% (techn.), -20°C
- PBS (4.2.2)

Auf Deckgläschen gewachsene Kulturzellen wurden kurz in PBS gewaschen und anschließend für 3 Minuten bei -20°C in Methanol entwässert. Anschließend wurden die Deckgläschen für 10 Minuten in Aceton bei -20°C inkubiert und luftgetrocknet.

4.6.2.1.2 Formaldehyd/Triton-Fixierung

Durch Formaldehyd werden lösliche und freie funktionelle Gruppen zellulärer Proteine chemisch vernetzt und dadurch immobilisiert. Das Detergenz Triton sorgt dafür, dass die Lipidmembranen der Zellen partiell durchlässig werden.

- Formaldehyd-Lösung:
 - 2% (v/v) 37%ige Formaldehyd-Lösung in PBS
 - zum Lösen auf maximal 60°C erhitzen
- Triton-Lösung:
 - 0,1% (v/v) Triton™ X-100 in PBS
- PBS (4.2.2)

Auf Deckgläschen gewachsene Kulturzellen wurden kurz in PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur in Formaldehyd-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen kurz in PBS gewaschen und danach für 10 Minuten in der Triton-Lösung bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach der Permeabilisierung wurden die Zellen dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen und konnten für die indirekte Immunfluoreszenz verwendet werden.

4.6.2.2 Indirekte Immunfluoreszenz bei somatischen Kulturzellen

- PBS (4.2.2)
- Primär- und Sekundärantikörper: (Verdünnung in PBS; Kapitel 3)
- Hoechst 33258 (SL $5\ \mu\text{g mL}^{-1}$; Serva)
- Mowiol: 10 g Mowiol (Hoechst)
 - in 40 ml KH_2PO_4 -freiem PBS (pH 8.0) für 16 h rühren;
 - 20 ml Glycerin zugeben und nochmals 16 h rühren;
 - ungelöste Partikel abzentrifugieren und Überstand aliquotiert bei -20°C aufbewahren.

Nach der Fixierung der Kulturzellen wurden die Deckgläschen gegebenenfalls mit PBS befeuchtet und in eine Feuchtekammer für die Antikörperinkubation überführt, da die Zellen niemals austrocknen durften. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem verdünnten Primärantikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Pro Deckglas wurden $50\ \mu\text{l}$ der Verdünnung aufpipettiert. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Deckgläschen dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubiert.

4.6.3 Indirekte Immunlokalisation mit Gefrierschnitten von *Xenopus laevis* Oozyten

4.6.3.1 Vorbereitung des Gewebes

- PBS (4.2.2)
- 10%ige Zuckerlösung:
 - 10% (w/v) Saccharose in PBS
- 30%ige Zuckerlösung:
 - 30% (w/v) Saccharose in PBS
- Jung Einbettmedium für Gefrierschnitte (Leica Instruments GmbH)
- 1:1 Einbettmedium
 - 50% (v/v) Einbettmedium in PBS

Weiblichen *Xenopus laevis* wurde Ovar entnommen (4.5.1) und in kleine Einheiten von ca. 30 Oozyten getrennt, die anschließend durch einen Zuckergradienten entwässert wurden. Dafür wurden die Ovarstückchen solange in 10%iger Zuckerlösung auf einem Drehtisch bei 4°C inkubiert bis sie auf den Boden des Inkubationsgefäßes sanken. Im Anschluss wurden sie in eine 30%ige Zuckerlösung überführt und darin für mindestens 60 Minuten bei 4°C inkubiert. Abschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubation in 1:1-Medium. Danach wurden die Ovarstücke in zur Hälfte mit Einbettmedium gefüllte Gefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Gewebe konnte so für mehrere Monate bei -70°C gelagert werden.

4.6.3.2 Schneiden und Fixieren des Gewebes

Die Gefrierschnitte wurden in einem Kryostat-Mikrotom bei einer Kühltemperatur von -20°C hergestellt. Die eingefrorenen Gewebestückchen wurden mit Einbettmedium auf einem Objektisch befestigt. Es wurden Schnitte von 5µm Dicke hergestellt und direkt auf gereinigte Objektträger bzw. Deckgläschen überführt. Nachdem die Schnitte luftgetrocknet waren, wurde die Qualität mit Hilfe eines Umkehrmikroskops überprüft. Die Ovar-Gefrierschnitte wurden 10min in Aceton p.A. bei -20°C fixiert und anschließend erneut bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die Präparate auf den Objektträgern wurden anschließend mit Antikörpern inkubiert.

4.6.3.3 Immunlokalisation

- PBS (4.2.2)
- Primär- und Sekundärantikörper: (Verdünnung in PBS; Kapitel 3)
- Hoechst 33258 (SL 5 µg mL⁻¹; Serva)
- Mowiol: 10 g Mowiol (Hoechst)
 - in 40 ml KH₂PO₄-freiem PBS (pH 8.0) für 16 Stunden rühren;
 - 20 ml Glycerin zugeben und nochmals 16 Stunden rühren;
 - ungelöste Partikel abzentrifugieren und Überstand aliquotiert bei -20°C aufbewahren.
- 100% Ethanol techn.

Um das Austrocknen der Schnitte zu verhindern, wurden die folgenden Schritte bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt. Zunächst wurden 30µl Primärantikörperlösung aufgetragen und 30min inkubiert. Nichtgebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Der jeweilige Sekundärantikörper wurde ebenfalls auf die Schnitte pipettiert und für 30 Minuten inkubiert. In den letzten zehn Minuten wurde das Fluorochrom Hoechst 33258 zur Markierung der DNA dazugegeben. Anschließend wurde erneut gewaschen, die Präparate eine Minute in 100% Ethanol techn. dehydriert und bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Abschließend wurden die Präparate in Mowiol eingebettet.

4.6.4 Indirekte Immunlokalisation auf in Polyesterwachs eingebetteten *X. laevis* Oozyten

4.6.4.1 Fixieren des Gewebes

- 2% wässrige Trichloressigsäure (TCA)
- 100% EtOH p.A.
- 100% MetOH p.A.

Weiblichen *Xenopus laevis* wurde Ovar entnommen (4.5.1) und in kleine Einheiten von ca. 30 Oozyten getrennt, die anschließend für zwei Stunden in 2% TCA (wässrig) fixiert wurden. Die Oozyten wurden im Anschluss in 100% EtOH überführt und über Nacht entwässert. Alternativ war auch eine Fixierung durch 100% MetOH über Nacht bei -20°C möglich.

4.6.4.2 Einbettung von Ovar in Polyesterwachs

Nach beiden Fixierungsmöglichkeiten (4.6.4.1) konnte das Ovar in 40°C warmes Polyesterwachs überführt werden. Die Oozyten wurden nach einer Stunde in frisches Wachs gegeben und über Nacht bei 40°C darin inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Wachs erneut ausgewechselt und im Anschluss konnten die Oozyten darin bei Raumtemperatur ausgehärtet werden.

4.6.4.3 Schneiden des Gewebes

Zunächst wurde der das Gewebe umgebende Polyesterwachsblock mit einem Skalpell auf Form getrimmt, um das Gewebe weitestgehend vom Wachs zu befreien. Es sollte dabei eine pyramidenförmige Form entstehen. Der Polyesterwachsblock wurde an der Unterseite erhitzt und auf einen Holzblock fixiert. Danach konnte er ins Schlittenmikrotom eingesetzt werden. Es wurden 3-5 µm dicke Schnitte angefertigt. Eine Serie von 5-10 Schnitten wurden vorsichtig mit einer Pinzette auf einen Objektträger mit einem kleinen Tropfen Wasser überführt, der zum Ausspreiten der Schnitte auf eine 60°C warme Heizplatte für etwa 10 Sekunden gelegt wurde. Nachdem sich die Schnitte gestreckt hatten, wurde das überschüssige Wasser entfernt und die Präparate für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur vollständig getrocknet. Die Präparate konnten bei 4°C für mehrere Tage aufbewahrt werden.

4.6.4.4 Immunlokalisation

Die Immunlokalisation von Polyesterwachs-Gewebeschnitten wurde wie unter 4.6.3.3 beschrieben durchgeführt.

4.6.5 Whole-mount Immunfluoreszenz von *Xenopus* Oozyten

4.6.5.1 Vorbereitung des Gewebes

- PBS (4.2.2)
- Dent's Fixierungslösung:
 - MetOH/DMSO ≅ 80%/20%
- absteigende Methanolreihe:
 - 100%, 96%, 90%, 70%, 50%, 30% Methanol p.A.
 -

Weiblichen *Xenopus laevis* wurde Ovar entnommen (4.5.1) und in kleine Einheiten von ca. 30 Oozyten getrennt, die anschließend über Nacht in Fixierungslösung bei -20°C inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden sie mit Hilfe einer absteigenden Methanolreihe rehydriert und konnten entweder in PBS bei 4°C gelagert oder sofort für die Immunlokalisation weiter verwendet werden.

4.6.5.2 Immunlokalisation

- PBS (4.2.2)
- Primär- und Sekundärantikörper: (Verdünnung in PBS; siehe Kapitel 3)
- Fixogum

Um das Austrocknen der Oozyten zu verhindern, wurden die folgenden Schritte bei Raumtemperatur in gefüllten Gläschen durchgeführt. Zunächst wurden die Oozyten in 1ml Primärantikörperlösung 30 min inkubiert. Nichtgebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Der jeweilige Sekundärantikörper wurde ebenfalls für 30 Minuten inkubiert und erneut mit PBS gewaschen. Die Präparate wurden in Lochkammern gefüllt mit PBS überführt und mit einem Deckgläschen und Fixogum abgedichtet.

4.6.6 Immungoldlokalisation an Gefrierschnitten von *X. laevis* Oozyten (Pre-embedding)

- Primär- und Sekundärantikörper: (Verdünnung in PBS; Kapitel 3)
- Cacodylatpuffer:
 - 0,05M Cacodylsäure Na-Salz Trihydrat
- 2,5% Glutaraldehyd mit Ionen:
 - 5ml 25% Glutaraldehyd
 - 2,5ml 1M KCl
 - 1,25ml 0,1M MgCl₂
 - 41,25ml 0,05M Cacodylatpuffer pH 7,2
- 2% OsO₄ in 0,05 M Cacodylatpuffer
- aufsteigende Ethanolreihe:
 - 50%, 70%, 90%, 96%, 100% Ethanol p.A.
- Propylenoxid
- Epon-Lösung A: (1ml = 1,077g)
 - 50ml DDSA
 - 31ml Epon 812 (Serva)
- Epon-Lösung B: (1ml = 1,212g)
 - 44,5ml MNA
 - 50ml Epon 812
- Epon-Gemisch: (4:3 w/w)
 - 24,6g Lösung A
 - 20,8g Lösung B
 - 0,8ml DMP-30

Wie bereits unter 4.6.3 beschrieben, wurden Gefrierschnitte von *Xenopus* Ovar auf Deckgläschen angefertigt, luftgetrocknet, zehn Minuten in Aceton p.A. bei -20°C fixiert und wieder luftgetrocknet.

Auf die vorbereiteten Schnitte wurden etwa 30µl der Primärantikörperlösung gegeben und 60-90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Präparate zweimal drei Minuten in PBS gewaschen, bevor der Zweitantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur zugegeben wurde. Danach wurden die Proben erneut gewaschen und 30 Minuten mit der Glutaraldehydlösung fixiert, in Cacodylatpuffer gewaschen und mit der OsO₄-Lösung kontrastiert. Durch Glutaraldehyd kam es zur Vernetzung und Immobilisierung von Proteinen, durch Osmiumtetroxid werden vor allem Membranen angefärbt. Anschließend wurden die Proben mit H₂O_{bidest.} gewaschen und über Nacht in wässriger 0,5%iger Uranylacetatlösung inkubiert. Nach drei fünfminütigen Waschschrritten in H₂O_{bidest.} wurden die Proben in einer aufsteigenden, vorgekühlten Ethanolreihe (50 %, 70 %, 90 %, 96 %; je 5 Minuten) dehydriert und dann je zweimal 10 Minuten in 100 % Ethanol und Propylenoxid überführt. Dann wurden die Proben 4 Stunden in einem 50:50 Gemisch aus Epon und Propylenoxid und anschließend über Nacht in Epon inkubiert. Zur Aushärtung wurden die Proben in einen 60°C Inkubationsschrank gegeben, wobei auf die Deckgläschen eine Gelatine kapsel gefüllt mit Epon aufgesetzt wurde (Flacheinbettung). Nach zwei Tagen konnten die Proben für die Anfertigung von Ultradünnschnitten angetrimmt werden. Dazu wurde bei den Flacheinbettungen das Deckglas abgesprengt und eine Pyramide von 1-2 mm Kantenlänge in das gehärtete Epon geschnitten.

4.6.7 Immunlokalisation an Gefrierschnitten mit Ultrasmall Nanogold und anschließender Silberverstärkung (Pre-embedding)

- PBS (4.2.2)
- 2% Formaldehydlösung:
 - 37%ige Formaldehydlösung
 - PBS

- 50 mM Ammoniumchlorid in PBS
- 0,5% Triton in PBS
- Primär- und Sekundärantikörper: (Verdünnung in PBS; Kapitel 3)
- 2% Glutaraldehyd in PBS
- Silberverstärkungslösung:
 - Developer und Enhancer (Aurion Silver Enhancement Kit, Aurion) im Verhältnis 1:20
- aufsteigende Ethanolreihe:
 - 50%, 70%, 90%, 96%, 100% Ethanol p.A.
- Propylenoxid
- Epon (4.6.6)

Um Strukturen in Zellen zu lokalisieren, die möglicherweise wegen ihrer Kompaktheit für große Goldpartikel schwer zugänglich sind, wurden sekundäre Antikörper gekoppelt an ultrakleine Goldpartikel (Nanogold) gefolgt von einer Silberverstärkung, eingesetzt. Wie oben beschrieben wurde die Verteilung eines Proteins in der Zelle mit Hilfe von Primärantikörper nachgewiesen. Der sekundäre Antikörper hingegen war an ein 1,4 nm-Goldpartikel gekoppelt, welches durch Silberverstärkung vergrößert werden konnte. Hierbei wurden über eine Silberverstärkungslösung Silberionen an die Oberfläche des Nano-Gold-Partikels angelagert. Dazu wurden die Gefrierschnitte (4.6.3) zehn Minuten in 2% Formaldehydlösung inkubiert. Eine 10minütige Inkubation in der Ammoniumchloridlösung sollte restliches PFA neutralisieren, um eine spätere Fixierung von Antikörpern zu vermeiden. Nach der Absättigung wurden die Deckgläschen in PBS überführt und dreimal fünf Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurde der erste Antikörper eine Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 6maligem Waschen für fünf Minuten in PBS wurden die Präparate dann mit einem zweiten goldgekoppelten Antikörper für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf wurde sechsmal fünf Minuten mit PBS gewaschen, nachfixiert für zehn Minuten mit 2% Glutaraldehyd/PBS und anschließend viermal fünf Minuten in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gewaschen. Zur Silberverstärkung der Nano-Gold-markierten Zweitantikörper wurden die Präparate für 60 Minuten in einer dunklen, feuchten Kammer mit der Silberverstärkungslösung inkubiert. Um die Reaktion der Silberionen mit den Nano-Gold-Partikeln zu stoppen, wurde viermal fünf Minuten in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gewaschen. Nun erfolgte, wie unter 4.6.6 beschrieben, die Entwässerung und Einbettung der Proben.

4.6.8 Einbettung von Gewebe in LR-White mit anschließender Immunlokalisation (Post-embedding)

LR-White ist ein hydrophiles Acrylharz, das neben Epon für die Immunhistochemie verwendet wird. Die Fixierung für das Postembedding weicht aufgrund der notwendigen Erhaltung der Antigenizität von der Standardfixierung (4.6.3) ab.

- PBS (4.2.2)
- 4% Formaldehydlösung:
 - 37%ige Formaldehydlösung
 - PBS
- 50 mM Ammoniumchlorid in PBS
- aufsteigende Ethanolreihe:
 - 30%, 50%, 70%, 90%, 100% Ethanol p.A.
- LR-White-Lösung:
 - Verhältnis: LR-White (London Resin Ltd) :Beschleuniger = 50:1 (w/w)
- Primär- und Sekundärantikörper: (Verdünnung in PBS; Kapitel 3)
- Puffer 1 (LB 0):
 - PBS (4.2.2)

- Puffer 2 (LB1):
 - LB 0
 - 1% (w/v) BSA (Sigma)
 - 0,1% (w/v) Tween 20 (Applichem)
- Puffer 3 (LB 2):
 - LB 0
 - 0,1% (w/v) BSA
 - 0,1% (w/v) Tween 20
- 2% Uranylacetat
- Reynold´s Bleicitrat
- NaOH-Plätzchen

Die Ovarstückchen von *Xenopus* wurden über Nacht in 4% Formaldehydlösung bei 4°C fixiert und anschließend fünfmal drei Minuten in PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe für jeweils zweimal 30 Minuten (30%, 50%, 70%, 90% auf Eis und 100% bei Raumtemperatur). Die dehydrierten Proben wurden in eine 1:1 Mischung aus LR-White und Ethanol überführt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Austausch gegen reines LR-White wurden die Proben zunächst eine Stunde inkubiert, dann wurde erneut reines LR-White ausgetauscht, die Proben für 3-4 Stunden inkubiert und schließlich in frischem LR-White über Nacht inkubiert. Die Vorgänge fanden alle bei 4°C statt. Anschließend wurden die Proben auf 1,5 ml Eppendorf-Gefäße aufgeteilt, luftdicht verschlossen und bei 40°C in einem Inkubationsschrank für mindestens drei Tage polymerisiert. Danach konnten die Ovarstücke wie üblich ultradünn geschnitten und im Anschluss mit Antikörpern inkubiert werden. Die Ultradünnschnitte befanden sich auf mit Pioloform beschichteten Nickelnetzchen. Die Netze wurden jeweils fünf Minuten auf LB 0 bzw. LB 1 Tropfen aufgelegt. Die anschließende Antikörperinkubation erfolgte für eine Stunde in LB 1. Vor der Inkubation mit dem Sekundarantikörper für eine Stunde in LB 2 wurden folgende Waschschriffe durchgeführt: jeweils zweimal zehn Minuten auf einem Tropfen LB 1 bzw. LB 2. Nach der Antikörperinkubation wurden die Netze erneut für zweimal zehn Minuten auf einem Tropfen LB 2, danach fünf Minuten mit PBS und zweimal fünf Minuten mit H₂O_{bidest.} gewaschen. Anschließend mussten die Ultradünnschnitte des Ovars noch kontrastiert werden. Dazu wurden sie in einer Kammer neben NaOH-Plätzchen fünf Minuten auf einem Tropfen 2%igem Uranylacetat inkubiert, zweimal mit H₂O_{bidest.} gewaschen und erneut für fünf Minuten auf einem Tropfen Bleicitrat inkubiert und danach mit H₂O_{bidest.} gewaschen. Die überschüssige Flüssigkeit wurde mit Filterpapierstreifen abgesaugt und die Netze in einer Gridbox aufbewahrt.

4.7 Einbettung von *Xenopus* Ovar in Epon

- 2,5% Glutaraldehyd mit Ionen
- 0,05 M Cacodylatpuffer (4.6.6)
- 2% OsO₄:
 - 50% (v/v) 4%iges OsO₄
 - 25% (v/v) H₂O_{bidest.}
 - 25% (v/v) 0,2 M Cacodylatpuffer
- 0,5% Uranylacetat
- vor Verwendung 5 Minuten bei 10000 xg zentrifugieren
- aufsteigende Ethanolreihe:
 - 50%, 70%, 90%, 96%, 100% Ethanol p.A.
- Propylenoxid
- Epon (4.6.6)

Diese Methode der Einbettung eignete sich besonders gut zur Strukturhaltung von Gewebe- hier Ovarstückchen. Die gesamte Prozedur wurde in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen durchgeführt. Die Proben wurden auf Eis jeweils 30 Minuten mit der Glutaraldehydlösung fixiert, in Cacodylatpuffer gewaschen

und mit der OsO_4 -Lösung 1-3 Stunden kontrastiert. Anschließend wurden die Proben mit Wasser gewaschen, über Nacht bei 4°C in wässriger, 0,5 %iger Uranylacetatlösung inkubiert. Nach drei 5minütigen Waschschrritten in Wasser wurden die Proben in einer aufsteigenden, vorgekühlten Ethanolreihe (50 %, 70 %, 90 %, 96 %; je 5 Minuten) dehydriert und dann je zweimal 10 min in 100 % Ethanol und anschließend in Propylenoxid überführt. Dann wurden die Proben 4 Stunden in einem 50:50 Gemisch aus Epon und Propylenoxid und anschließend über Nacht in Epon inkubiert. Zur Aushärtung wurden die Proben in einen 60°C Inkubationsschrank gegeben. Nach zwei Tagen konnten die Proben für die Anfertigung von Ultradünnschnitten angetrimmt werden. Dazu wurde eine Pyramide von 1-2 mm Kantenlänge in das gehärtete Epon geschnitten.

4.8 Kontrastierung von Epon-Ultradünnschnitten

- 2% Uranylacetat
- Reynold´s Bleicitrat
- abgekochtes $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
- NaOH-Plätzchen
- Waschlösung 1:
100% Methanol p.A.
- Waschlösung 2:
- 50% (v/v) Methanol p.A. in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
- Waschlösung 3:
- $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

Die Ultradünnschnitte befanden sich auf mit Pioloform beschichteten Kupfernetzen. Zunächst wurde $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ abgekocht und abgekühlt. Um die CO_2 -Konzentration zu minimieren, wurde die Kontrastierung in einer Kammer, die mit NaOH-Plätzchen bestückt war, durchgeführt. Die Netze wurden für 15-20 Minuten jeweils auf einem Tropfen 2%igem Uranylacetat inkubiert und danach jeweils dreimal 30 Sekunden in Gläsern der Waschlösungen 1,2 und 3 getaucht.

Im Anschluss erfolgte eine Inkubation auf Bleicitratropfen für acht Minuten und erneutes dreimaliges Waschen in Puffer 3. Überschüssiges $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ wurde mit Filterpapier entfernt, bevor die Netze in einer Gridbox aufbewahrt werden konnten.

4.9 Mikroskopie

4.9.1 Analyse von Fluoreszenzpräparaten am Epifluoreszenzmikroskop

Für die mikroskopische Analyse von Fluoreszenzpräparaten wurde ein Zeiss Axiophot mit Quecksilberlampe HB050 verwendet. Zur Dokumentation wurde ein digitales Kamerasystem der Firma Pixelfly verwendet (CCD-Sensor). Die erhaltenen Daten wurden mit Adobe Photoshop bearbeitet.

4.9.2 Analyse am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM)

Verwendet wurde ein konfokales Umkehrmikroskop des Typs TCS-SP 2 der Firma Leica. Bei der konfokalen Mikroskopie wird ein im Präparat vorhandener Fluoreszenzfarbstoff durch einen Laserimpuls einer spezifischen Wellenlänge angeregt, worauf dieser seinerseits Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Dieses emittierte Licht wird durch eine Blende im optischen System des Mikroskops (das sog. Pinhole) zurück auf ein Kameraelement geleitet. Dieses Pinhole lässt fast ausschließlich emittiertes Licht der Fokusebene des Anregungslasers durch. Dadurch kann man mit einem konfokalen Mikroskop optische Schnitte durch ein Präparat legen, die als Ergebnis ein Bild liefern, das neben einer guten Auflösung in den x- und y-Ebenen auch eine gute Auflösung in der z-Ebene besitzt. Angeregt wurden die Fluorochrome durch einen Ar/Kr-Laser bei 488 nm für EGFP und bei 568 nm für Texas Red bzw. RFP. Einfache optische Schnitte wurden aufgenommen entweder unter Verwendung des 20x, 40x oder eines 63x Neofluar Ölimmersionsobjektivs. Dabei wurde bei

einem Pinhole zwischen 0,4 und 0,7 4- bis 8fach akkumuliert (senkt den Hintergrund durch unspezifisch auftretende Fluoreszenzsignale). Wurden im selben Präparat mehrere Fluorochrome analysiert, wurden sie sequentiell aufgenommen, was ein Durchscheinen des einen Farbkanals, den sog. „Crosstalk“, in den anderen verhinderte.

4.9.3 Lebendbeobachtung von Zellen unter dem Mikroskop

4.9.3.1 Kulturzellen

Um lebende Zellen mit einem Mikroskop zu beobachten, wurden die Zellen in Glasbodenschälchen ausgesät. Sie konnten so direkt mit dem Umkehrmikroskop betrachtet werden und vorher durch Transfektion (4.2.3) oder Inkubation mit Zellgiften (4.5.11) manipuliert werden.

4.9.3.2 *Xenopus laevis* Oozyten

Für die Lebenbeobachtung von Oozyten mussten diese zunächst manuell (4.5.7) oder durch einen Collagenase-Verdau (4.5.8) vereinzelt werden. Außerdem mussten geeignete Beobachtungskammern angefertigt werden. Dazu wurde mittig in einen Objektträger ein 0,5 cm großes Loch gebohrt (Werkstatt). Dieses Loch wurde mit einem Deckgläschen mittels Paraffin auf einer Seite verschlossen. In die Vertiefung wurden die einzelnen Oozyten in MBS gegeben, die Kammer mit einem weiteren Deckgläschen verschlossen und mit Fixogum abgedichtet. Die Oozyten konnten so für ca. 12 Stunden für Beobachtungen unter dem Mikroskop (CLSM und Fluoreszenzmikroskop) verwendet werden.

4.9.4 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Für die EM-Aufnahmen wurde ein EM10 (Zeiss Oberkochen) verwendet. Nach der Entwicklung wurden die EM-Negative mit einem Flachbettscanner; Epson Perfection V700 Photo gescannt und mit Hilfe des Programms Photoshop CS2 bearbeitet.

4.9.5 Bioinformatische Programme

Für die molekulare Charakterisierung der EF1A-Isoformen wurden einige bioinformatische Programme verwendet, die im Folgenden aufgeführt sind:

- Alignment auf Nukleotid- und Aminosäureebene: MultAlin (Corpet, 1988)
- Identitätsvergleiche auf Nukleotid- bzw. Proteinebene: NCBI/BLAST (*Algorithm*: discontinuous megablast bzw. *Algorithm*: blastp)
- Berechnung des
- Berechnung des molekularen Gewichts und des IEPs: Compute pI/Mw (Bellquist et al., 1993 und 1994; Gasteiger et al., 2005)
- Kalkulation potentieller Phosphorylierungsstellen: NetPhos2.0 Server (Blom, Gammeltoft und Brunak; 1999)
- Motivbereichsuche: NCBI/BLAST Conserved Domains (Marchler-Bauer et al., 2005 und 2007; Marchler-Bauer und Bryant, 2004)

5. Ergebnisse

5.1 Verteilung des Antikörpers IV'D4 in verschiedenen Zelltypen und Geweben

Der monoklonale Maus-Antikörper IV'D4 wurde durch Immunisierung einer Maus mit prävitellogem Oozytenextrakt von *Xenopus laevis* erzeugt. Ausgewählt wurde er wegen der deutlichen Immunfluoreszenz-Markierung der Kernhülle von prävitellogenen *Xenopus* Oozyten. In der vorliegenden Arbeit sollte der Antikörper näher charakterisiert werden, um die markierten Strukturen sowie deren Antigene zu identifizieren.

5.1.1 Lichtmikroskopische Lokalisation an Gefrierschnitten von prävitellogenen *Xenopus* Oozyten

Für die Immunfluoreszenzaufnahmen wurden Gefrierschnitte von prävitellogenen *Xenopus laevis* Oozyten angefertigt, mit Aceton fixiert und mit dem Antikörper IV'D4 inkubiert.

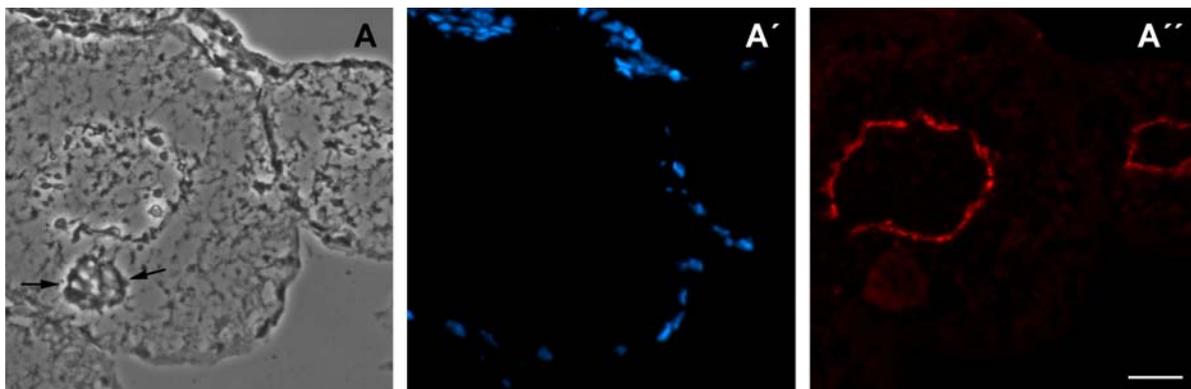


Abbildung 5-1 Indirekte Immunfluoreszenzaufnahmen prävitellogener *Xenopus* Oozyten am konventionellen Fluoreszenzmikroskop. (A) Der Antikörper IV'D4 markiert die Kernhülle (A''). In der Phasenkontrastaufnahme (A) ist zu erkennen, dass sich der Bb (Pfeile) in unmittelbarer Nähe des Zellkerns im Zytoplasma befindet. Die Hoechst-Färbung (A') markiert die Zellkerne der Follikelzellen um die Oozyte herum. Im Oozytenkern ist die DNA nicht sichtbar angefärbt, da ihre Konzentration aufgrund der enormen Größe des Nukleus viel geringer ist als in den Kernen somatischer Zellen. (B) Die Vergrößerung eines markierten Oozytenkerns zeigt ein deutliches Punktemuster. Eichstriche: (A) 50µm; (B) 10µm.

In Abbildung 5-1 ist die prominente Kernperipherie-Anfärbung durch den Antikörper IV'D4 deutlich sichtbar (A'' und B). In der Vergrößerung des Oozytenkerns ist gut zu erkennen, dass es sich bei der Markierung um ein Punktemuster und nicht um eine homogene Färbung der Kernhülle handelt (B). Die Punkte deuteten darauf hin, dass der Antikörper definierte Strukturen der Kernperipherie anfärbte. Die Annahme, dass es sich dabei um Kernporenkomplexe handeln könnte, war deshalb naheliegend. Um dies zu überprüfen, wurde eine Doppellokalisierung mit IV'D4 und einem Porenkomplex-Antikörper durchgeführt, der das Nukleoporin Nup62 erkennt. Dazu wurden Gefrierschnitte von prävitellogenen Oozyten zunächst mit dem Meerschweinchen-Antikörper anti-Nup62 und anschließend mit dem monoklonalen Maus-Antikörper IV'D4 inkubiert, gefolgt von geeigneten sekundären Antikörpern. Da die Dichte der Kernporen in den Oozyten sehr hoch ist, erscheint das

Markierungsmuster des Nup62-Antikörpers als homogene Kernhüllenfärbung (Abbildung 5-2: A und B). IV'D4 färbt danach keine Kernporen an (Abbildung 5-2: A' und B'), es zeigte sich aber deutlich, dass sich die durch IV'D4 markierten Strukturen an der Kernhülle befinden (Abbildung 5-2, Merge).

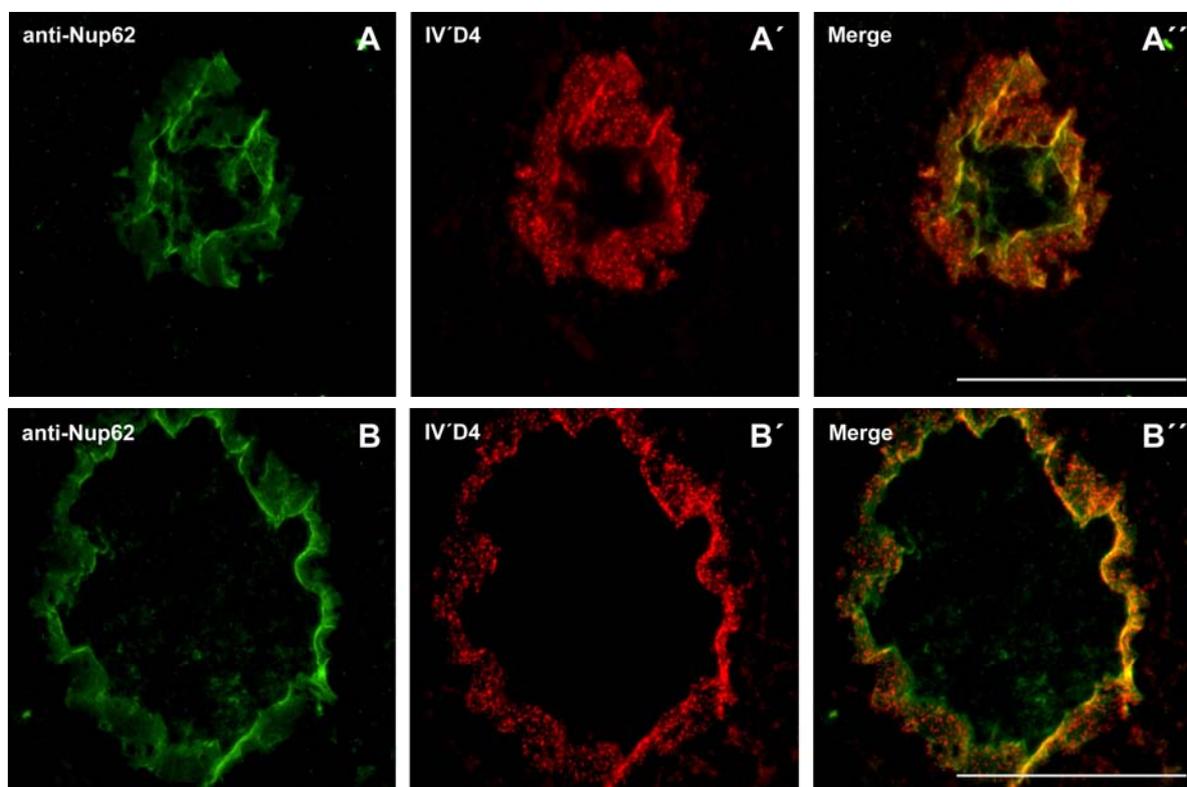


Abbildung 5-2 Indirekte Immunfluoreszenzaufnahmen am konventionellen Fluoreszenzmikroskop. (A) Flachschnitt, (B) Anschnitt einer prävitellogenen Xenopus Oozyte. Die Schnitte wurden mit anti-Nup62 (grün) und IV'D4 (rot) inkubiert. Anti-Nup62 markiert die Kernhülle in einem homogenen Muster, da die Kernporendichte in Oozyten sehr hoch ist (A und B). IV'D4 zeigt dagegen ein feines Punktemuster an der Kernhülle und im Zytoplasma in Kernnähe (A' und B'). Die Übereinanderlagerung der Signale beider Antikörper verdeutlicht, dass sich die durch IV'D4 markierten Strukturen in unmittelbarer Nähe der Kernhülle befinden (A'' und B''). Eichstriche: 50µm.

Das Punktemuster in unmittelbarer Nähe der Kernhülle, das der Antikörper IV'D4 markierte, stellte demnach nicht ausschließlich eine Kernporenkomplexfärbung dar. Welche strukturellen Einheiten den Markierungen entsprachen, konnte durch diesen Versuchsansatz nicht ermittelt werden. Die bisher erwähnten immunzytochemischen Versuche wurden an Gefrierschnitten angefertigt, die mit Aceton fixiert waren und keine optimale Strukturhaltung aufwiesen. Lampenbürstenchromosomen und amplifizierte Nukleolen waren daher nicht zu erkennen. Eine bessere Strukturhaltung des Gewebes wurde durch chemische Formaldehyd-Fixierung der Gefrierschnitte erreicht. Der Antikörper IV'D4 erkannte jedoch bei dieser Fixiervariante keine Antigene. Deshalb wurden im Anschluss weitere Lokalisierungsmethoden getestet, um so möglicherweise das Markierungsmuster von IV'D4 mit Strukturen in prävitellogenen Oozyten korrelieren zu können.

5.1.2 Einbettung prävitellogener *Xenopus* Oozyten in Polyesterwachs

Die Morphologie des Gewebes kann durch eine Einbettung in Paraffin bzw. Polyesterwachs beim Anfertigen von Schnitten besser erhalten werden als bei Gefrierschnitten. Deshalb wurde prävitellogenes Ovar in Paraffin bzw. in Polyesterwachs eingebettet und geschnitten. Leider färbte der Antikörper IV'D4 unter diesen Bedingungen die Kernhülle nicht mehr an. In Abbildung 5-3 ist der Schnitt einer prävitellogenen Oozyte gezeigt, die in Polyesterwachs eingebettet wurde. Die bessere morphologische Strukturhaltung, im Vergleich zu den Gefrierschnitten, ist deutlich zu erkennen. Die Phasenkontrastaufnahme (A) zeigt den Oozytenkern, die amplifizierten Nukleolen im Nukleoplasma und den Bb (*). In der Hoechst-Aufnahme (A') sind die Follikelzellen, Lampenbürstenchromosomen im Oozytenkern, sowie die mitochondriale DNA im Bb markiert.

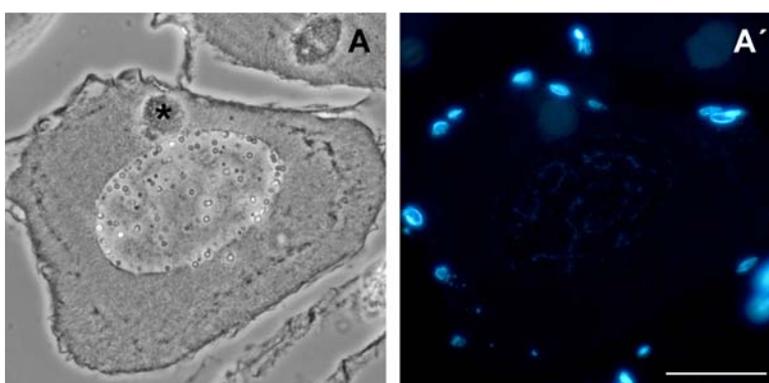


Abbildung 5-3 Schnitt durch eine in Polyesterwachs eingebettete prävitellogene Oozyte. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines konventionellen Mikroskops angefertigt und zeigen in (A) die Phasenkontrastaufnahme in der der Zellkern, die amplifizierten Nukleolen im Nukleoplasma und der Bb (*) zu erkennen sind. In (A') ist die Hoechst-Färbung gezeigt, bei der die Zellkerne der Follikelzellen, die Lampenbürstenchromosomen im Oozytenkern und die mitochondriale DNA im Bb markiert sind. Eichstrich: 50µm.

5.1.3 Whole-mount Immunfluoreszenz mit IV'D4 an prävitellogenen *Xenopus* Oozyten

Zusätzlich zur Inkubation von IV'D4 auf Gefrierschnitten wurde ein whole-mount Immunfluoreszenzexperiment an fixierten Oozyten von *Xenopus laevis* durchgeführt. Bei den whole-mount Versuchen ist eine homogene, zytoplasmatische Färbung mit einer schwachen Anreicherung des Fluoreszenzsignals an der Kernperipherie zu beobachten (Abbildung 5-4; A'). Ein punkteartiges Muster um die Kernhülle herum ist in Abbildung 5-4 jedoch nicht erkennbar. Es ist möglich, dass eventuell vorhandene markierte Proteinaggregate an der Kernhülle durch das starke zytoplasmatische Signal überdeckt wurden. Bei Gefrierschnitten wird vermutlich ein großer Anteil löslicher Proteine ausgewaschen, während strukturgebundene Proteine auf dem Schnitt verbleiben und mit Hilfe des Antikörpers markiert werden können. Das unterschiedliche Markierungsmuster von IV'D4 an whole-mount Präparaten und Gefrierschnitten kann auch darauf beruhen, dass durch die Formaldehydfixierung der Oozyten während der Präparation die Zugänglichkeit der Antigene verändert wird. Anhand der Abbildungen 5-1 und 5-4 lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Antigene von IV'D4 gleichmäßig im Zytoplasma prävitellogener Oozyten verteilt, in Kernnähe jedoch zu distinkten Aggregaten verdichtet sind.

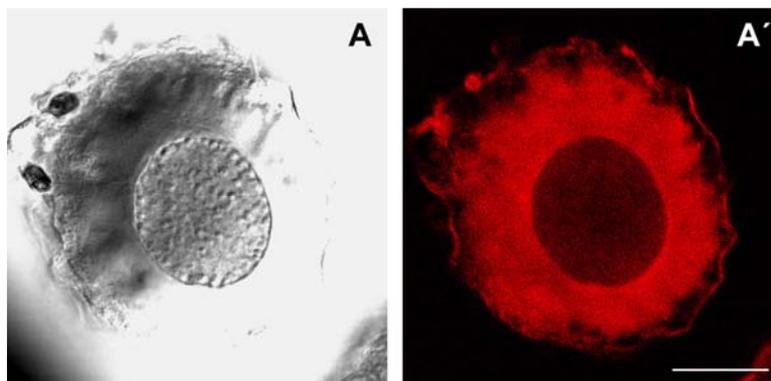


Abbildung 5-4 Whole-mount Immunlokalisation des Antikörpers IV'D4 an einer prävitellogenen *Xenopus* Oozyte. Die Aufnahme erfolgte mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (CLSM). Der Antikörper färbt das gesamte Zytoplasma mit einer Anreicherung um den Zellkern herum (A'). Die Interferenzkontrastaufnahme ist in (A) dargestellt. Die zahlreichen amplifizierten Nukleolen sind deutlich erkennbar. Eichstrich: 50µm.

Mit den beschriebenen Versuchen konnten demnach keine Strukturen an der Oozytenkernhülle identifiziert werden, die durch den Antikörper IV'D4 markiert wurden. Deswegen sollte mittels elektronenmikroskopischer Experimente versucht werden, die perinukleären Fluoreszenzpunkte zellulären Strukturen zuzuordnen.

5.1.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen prävitellogener *Xenopus* Oozyten

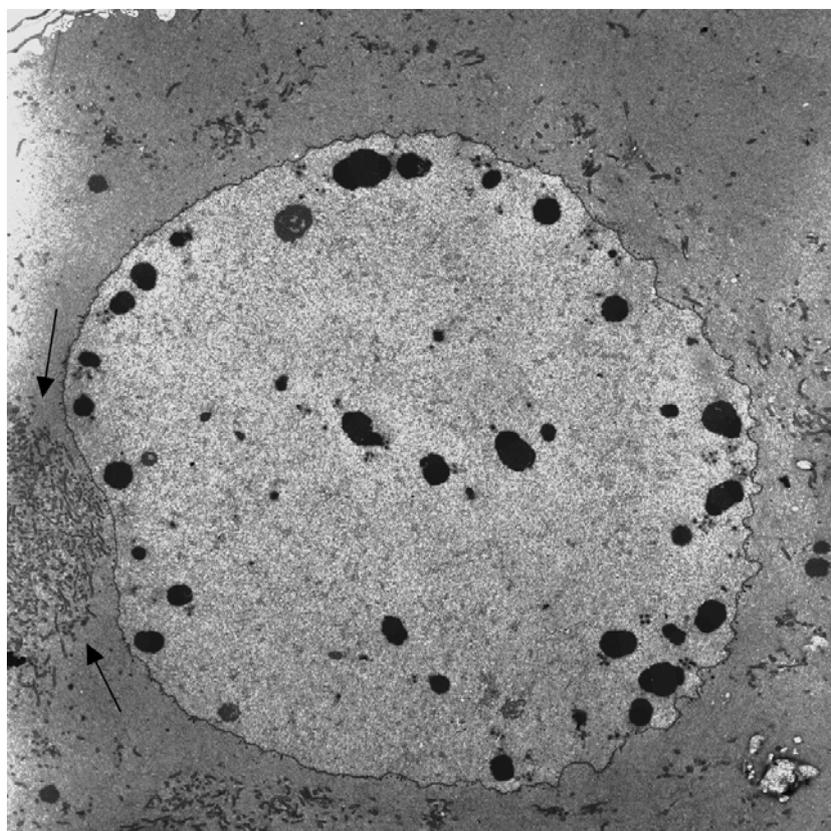


Abbildung 5-5 Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme einer prävitellogenen *Xenopus* Oozyte. Gut zu erkennen sind der Zellkern, die Kernhülle, die amplifizierten Nukleolen und eine Ansammlung von Mitochondrien (markiert durch Pfeile).

Die Abbildung 5-5 zeigt die Übersichtsaufnahme einer prävitellogenen *Xenopus* Oozyte. Neben dem Zellkern, der zahlreiche, stark kontrastierte amplifizierte Nukleolen enthält, ist ein Anschnitt des Bb zu erkennen (markiert durch Pfeile). Die Struktur ist an der auffälligen Anhäufung der Mitochondrien deutlich zu erkennen. Die Kernhülle grenzt gut sichtbar das Nukleoplasma vom Zytoplasma ab. Bei höherer Vergrößerung sind an der zytoplasmatischen Seite der Kernhülle eine Vielzahl von rundlichen oder länglichen, elektronendichten Strukturen erkennbar, die in das Zytoplasma hineinragen (Abbildung 5-6).

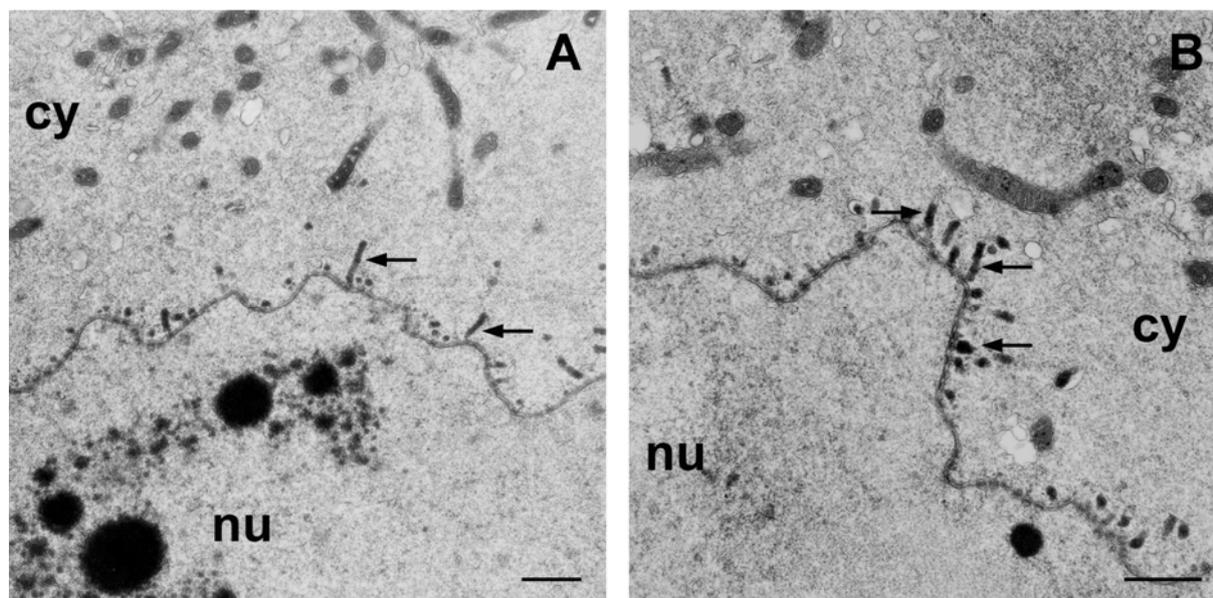


Abbildung 5-6 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Kernhüllenregion von *Xenopus laevis* Oozyten. Das prävitellogene Ovar wurde in Epon eingebettet und ultradünn geschnitten. Auffällig sind die länglichen Aggregate (Pfeile in A und B), die von der zytoplasmatischen Seite der Kernhülle ausstrahlen und häufig mit Kernporen assoziiert sind. nu: Nukleoplasma; cy: Zytoplasma. Eichstriche: 500nm.

In Abbildung 5-7 ist eine hohe Vergrößerung eines Ausschnitts der Kernhülle einer prävitellogenen *Xenopus* Oozyte abgebildet. Sehr deutlich erkennbar ist, dass einige Nuage an Kernporen assoziiert sind und in das Zytoplasma hineinragen. Es handelt sich um elektronendichte Strukturen, deren Komponenten organisiert und komprimiert vorliegen. Sie weisen dabei eine Länge von mehreren 100nm auf und haben einen Durchmesser von ca. 100nm.

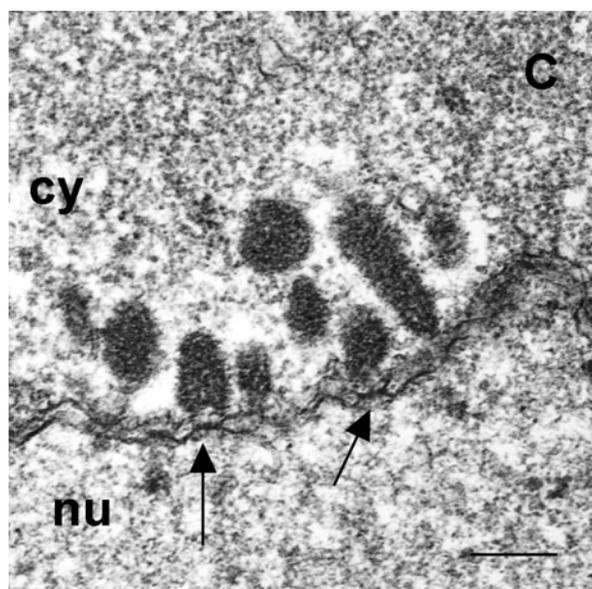


Abbildung 5-7 Vergrößerung eines Ausschnitts der Kernhülle einer *Xenopus* Oozyte. Die Nuage befinden sich im Zytoplasma und sind an Kernporen assoziiert (markiert durch Pfeile). Abgebildet sind Längs- und Querschnitte der Strukturen. Sie weisen eine Länge von >100nm und einen Durchmesser von ca. 100nm auf. Eichstrich: 250nm.

Diese Strukturen sind charakteristische Merkmale in *Xenopus* Oozyten und werden als Nuage bezeichnet. Nuage sind typische keimzellspezifische Komponenten zahlreicher Spezies. Es gibt Hinweise, die darauf schließen lassen, dass es sich bei Nuage um Vorläuferstrukturen der Germinal Granules handeln könnte (Eddy, 1975; Kloc et al., 2004a; Saffman und Lasko, 1999). Die Nuage-Strukturen sind um den gesamten Zellkern herum gleichmäßig verteilt und nicht in bestimmten Bereichen, wie z.B. in der Nähe des Bb angereichert (Bilinski et al., 2004). Nuage ist häufig mit Kernporen assoziiert, weshalb vermutet wird, dass es sich dabei um Ribonukleoproteine (RNPs) handelt, die gerade durch Kernporen aus dem Nukleo- in das Zytoplasma transportiert wurden. Die Lokalisation der Nuage und das Markierungsmuster des Antikörpers IV'D4 weisen in prävitellogenen *Xenopus* Oozyten große Ähnlichkeiten auf. Die Frage, ob es sich bei den perinukleären Punkten, die der Antikörper IV'D4 markiert, um Nuage handelt, lag deshalb nahe und wurde im nächsten Schritt durch eine Immunlokalisation auf elektronenmikroskopischer Ebene beantwortet.

5.1.5 Immungold-EM mit IV'D4 an *Xenopus laevis* Oozyten

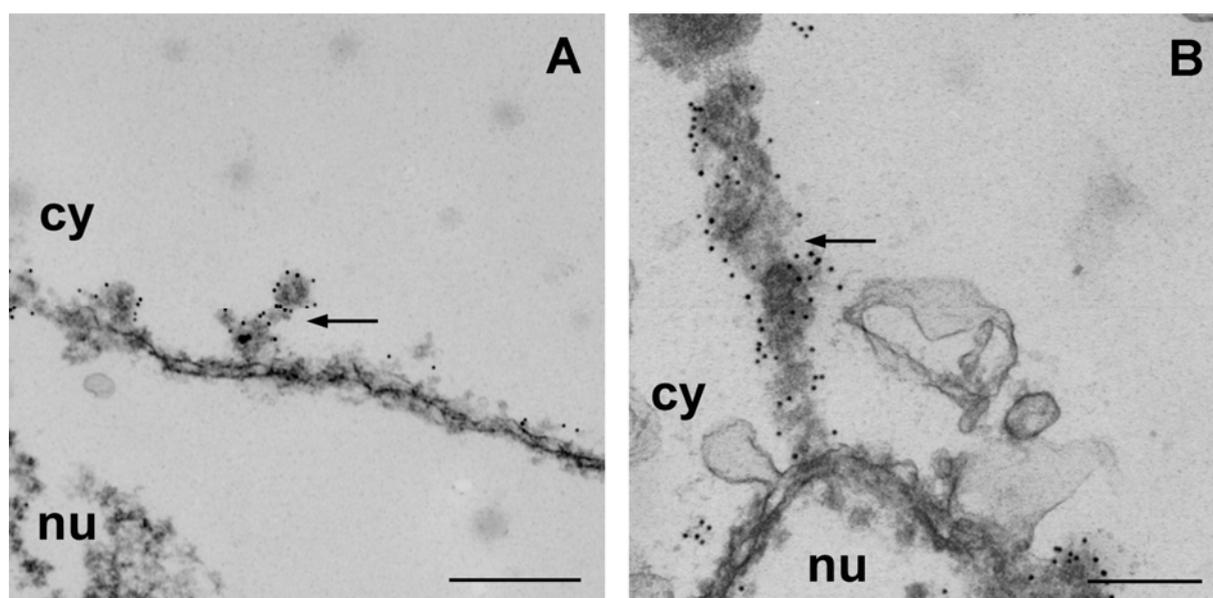


Abbildung 5-8 Immunlokalisation auf EM-Ebene mit IV'D4 auf *Xenopus laevis* Oozyten. Nuage (markiert durch Pfeile) befindet sich in Assoziation mit Kernporen und ragt in das Zytoplasma. nu: Nukleoplasma; cy: Zytoplasma. Eichstriche: A+B: 200nm.

In Abbildung 5-8 ist deutlich zu erkennen, dass das Markierungsmuster des Antikörpers IV'D4 den Nuage-Strukturen entspricht. Die Präparate wurden durch eine Preembedding-Prozedur angefertigt, da die experimentellen Bedingungen gut vergleichbar mit der Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten waren. Dabei wird zwar Material wie z.B. das Zytoplasma ausgewaschen, die Kernhülle und daran assoziierte Strukturen bleiben jedoch erhalten und können vom Antikörper erkannt werden.

Es wurden auch Postembedding-Prozeduren an Lowicryl- oder LR-White-Ultradünnschnitten durchgeführt. Leider stellte sich heraus, dass der Antikörper IV'D4 unter diesen Bedingungen das Antigen nicht mehr erkannte.

5.1.6 Lichtmikroskopische Lokalisation des Antigens von IV'D4 an Gefrierschnitten von *Xenopus* Hoden

Im Anschluss sollte die Frage geklärt werden, ob das Antigen von IV'D4 nur in Oozyten, oder auch in weiteren Geweben von *Xenopus* vorhanden ist. Deswegen wurde zunächst eine Immunfluoreszenz mit IV'D4 an *Xenopus laevis* Hodengewebe durchgeführt. Dazu wurden einem adulten Krallenfrosch Hoden entnommen und von diesem Gefrierschnitte angefertigt. Die Phasenkontrastaufnahmen in Abbildung 5-9 zeigen jeweils Ausschnitte eines Hodentubusquerschnitts (A und B). Die Spermatogonien und Spermatozyten befinden sich nahe der Tubuswand, in der Mitte des Tubus sind die Spermatozyten lokalisiert. Die Hoechst-Aufnahmen zeigen eine Zellkernfärbung aller Zelltypen (A' und B'). In den Immunfluoreszenzaufnahmen weisen die Spermatozyten eine auffällige Markierung auf, die sich deutlich vom feinen Punktemuster in prävitellogenen Oozyten unterscheidet. In unmittelbarer Nähe des Zellkerns färbt IV'D4 eine einzelne punktartige Struktur (Abbildung 5-9; A'' und B'').

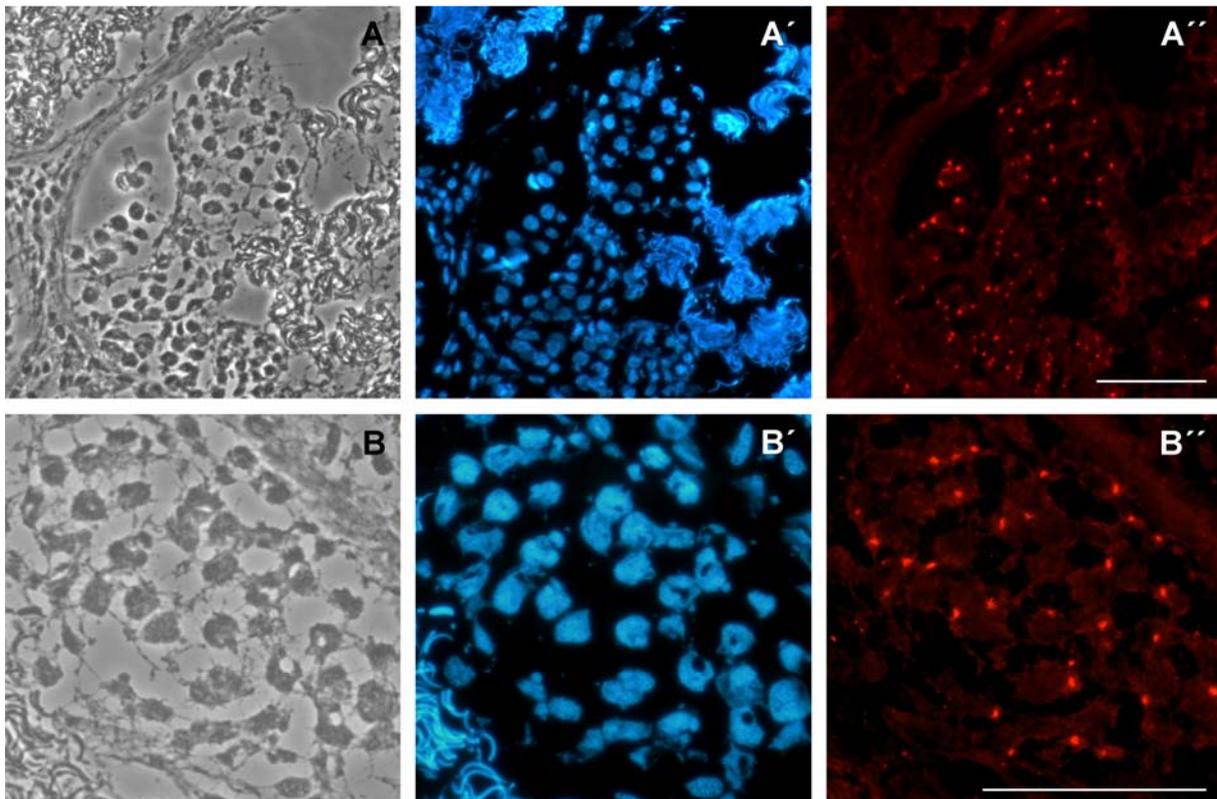


Abbildung 5-9 Inkubation von IV'D4 an Gefrierschnitten von *Xenopus laevis* Hoden. Die Aufnahmen wurden am konventionellen Fluoreszenzmikroskop angefertigt und zeigen jeweils Ausschnitte eines Hodentubus. Im Phasenkontrast (A/B) sind die Tubuswand und zahlreiche Keimzellen verschiedener Stadien zu erkennen. Die Hoechst-Färbung (A'/B') markiert sämtliche Zellkerne. Dadurch sind unterschiedliche Zellkernformen, die unterschiedliche Entwicklungsstadien der Keimzellen widerspiegeln, gut sichtbar. In der Immunfluoreszenzaufnahme markiert der Antikörper eine Struktur in der Nähe der Kernhülle von Spermatozyten, bei der es sich vermutlich um den Chromatiod body handelt (A'' und B''). Eichstriche: 50µm.

Bei diesem markierten Organell handelt es sich vermutlich um den Chromatoid body (CB), der charakteristisch für die männlichen Keimzellen ist. Der CB ist eine hochdynamische Struktur, die sich oft in Assoziation mit Kernporen befindet und die über zytoplasmatische Brücken in benachbarte Zellen gelangen kann (Parvinen und Parvinen, 1979, Ventela et al., 2003). Die Funktion des CB ist bis dato unklar, angenommen wird aber, dass es sich um ein Organell handelt, welches in post-transkriptionelle Prozesse involviert ist und spezifische mRNAs speichert. Es wird vermutet, dass der CB in männlichen Keimzellen das Pendant von Nuage in Oozyten, darstellt (Parvinen, 2005).

5.1.7 Immunfluoreszenz mit IV'D4 an somatischen *Xenopus*zellen

Nachdem festgestellt wurde, dass sich das Antigen von IV'D4 in Oozyten im Zytoplasma und in den Nuage, sowie höchstwahrscheinlich im CB von Spermatozyten befindet, wurde im nächsten Schritt die Verteilung in somatischen Zellen überprüft. Hierfür wurden Versuche mit *Xenopus* A6-Zellen und XTC-Zellen durchgeführt. Beide Zelltypen erbrachten die gleichen Ergebnisse. Im Folgenden werden daher nur XTC-Zellen beschrieben. Für die Immunfluoreszenz wurden Zellen auf Deckgläschen ausgesät und bei geeigneter Zelldichte mit Formaldehyd fixiert. In Abbildung 5-10 ist das Versuchsergebnis dargestellt. In der Immunfluoreszenzaufnahme (A'') ist deutlich zu erkennen, dass das Antigen homogen im Zytoplasma verteilt und weitgehend vom Nukleoplasma ausgeschlossen ist.

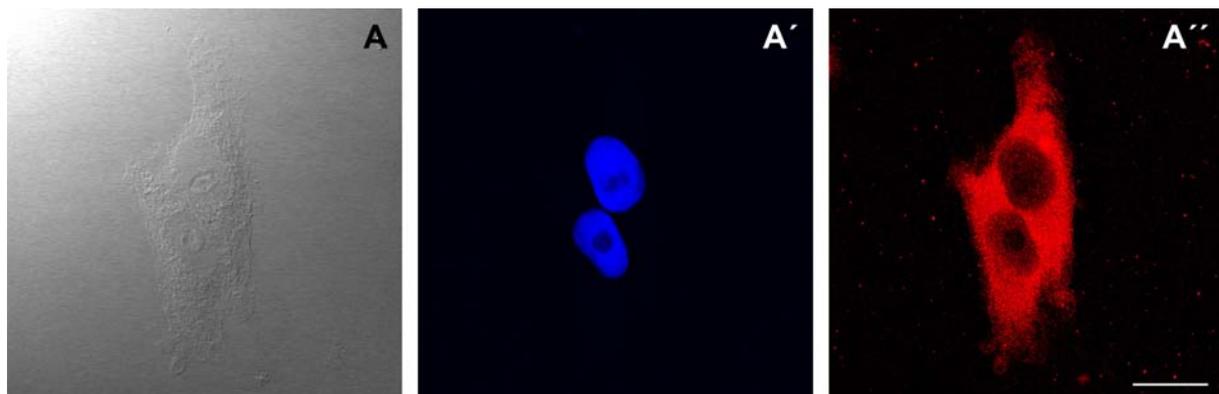


Abbildung 5-10 Immunfluoreszenz an XTC-Zellen mit IV'D4. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe des CLSM angefertigt und zeigen zwei Zellen. Der Antikörper markiert homogen das Zytoplasma, aber nur schwach das Nukleoplasma (A''). Die entsprechende Interferenzkontrastaufnahme (A) und DNA-Anfärbung mit Hoechst 33258 (A') sind ebenfalls abgebildet. Eichstrich: 20µm.

5.1.8 Vergleich der Markierungsmuster von IV'D4 und Antikörper Y12

Vor Kurzem wurde beschrieben, dass Y12 *Xenopus*-Nuage markiert (Bilinski et al., 2004). Dieser Antikörper erkennt bestimmte Sm-Proteine bzw. Proteine mit symmetrischen Dimethylargininmodifikationen (Brahms et al., 2000; Hebert et al., 2002; Boisvert et al., 2002; Graydon et al., 2006). Es wurde postuliert, dass Nuage Vorläuferstrukturen der Germinal Granules sein könnten. Sm-Proteine könnten demnach spezifische keimzell-determinierende mRNAs der Germinal Granules im Nukleoplasma binden und beim Export der mRNA-Moleküle aus dem Zellkern in Nuage-Strukturen behilflich sein (Bilinski et al., 2004).

Bei diesem Experiment wurden zunächst Gefrierschnitte von prävitellogenen *Xenopus laevis* Oozyten mit dem Antikörper Y12 (Lerner et al., 1981) inkubiert. In Abbildung 5-11 ist in der Fluoreszenzaufnahme zu erkennen, dass der Antikörper Strukturen sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma und an der Kernperipherie markiert. Bei den Partikeln im Zellkern

handelt es sich um sogenannte B-Snurposomen, welche das Oozyten-Gegenstück zu den „interchromatin granule clusters“ (IGCs) bzw. den „splice factor domains“ oder auch „speckles“ darstellen (Doyle et al., 2002). Die Aggregate an der Kernhülle stellen vermutlich Nuage-Strukturen dar. Die Markierung im Zytoplasma war dagegen von unbekannter Bedeutung. Um zu verdeutlichen, dass der Y12 Nuage markiert, wurden im nächsten Schritt Immungoldlokalisationen an prävitellogenen *Xenopus laevis* Oozyten durchgeführt.

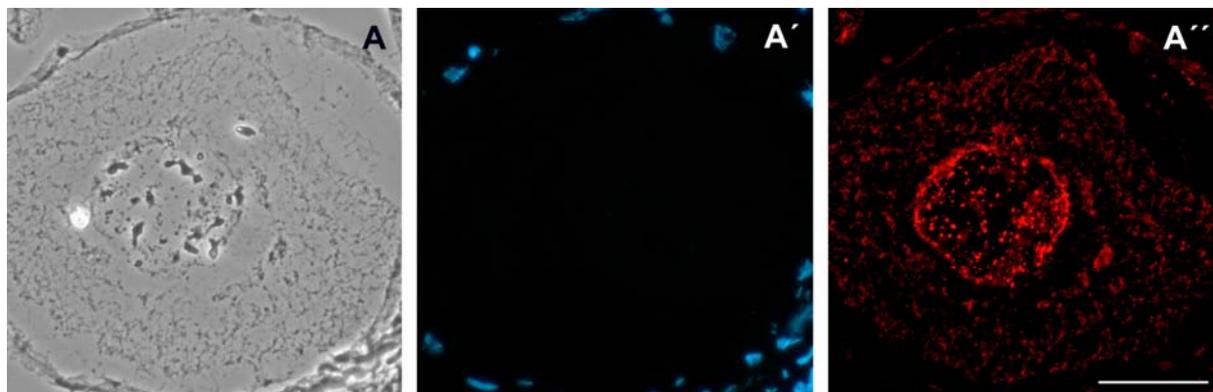


Abbildung 5-11 Inkubation von Y12 an Gefrierschnitten von *Xenopus laevis* Oozyten. In der Phasenkontrastaufnahme sind die Oozyte und der Zellkern gut zu erkennen (A). Die Hoechst-Färbung (A') markiert die Zellkerne der Follikelzellen. Der Antikörper markiert die B-Snurposomen innerhalb des Zellkerns und zytoplasmatische Strukturen, die an der Kernperipherie angereichert sind (A''). Hierbei handelt es sich um Nuage-Strukturen. Eichstrich: 50µm

5.1.9 EM-Immungoldlokalisationen an *Xenopus laevis* Oozyten mit Y12

Für die elektronenmikroskopische Lokalisierung von Y12 wurde eine post-embedding Immungoldlokalisation an *Xenopus laevis* Ovar durchgeführt. Mit dieser Methode war es möglich, eine sehr gute Strukturhaltung des eingebetteten Gewebes zu gewährleisten. In der Abbildung 5-12 ist deutlich gezeigt, dass das Zytoplasma und andere leicht lösliche Komponenten auch nach der Einbettung noch gut zu erkennen sind und nicht ausgewaschen wurden. Die Nuage-Strukturen sind deutlich markiert, wie die Anreicherung der Goldpartikel belegt. Dieses Ergebnis bestätigt die Befunde von Bilinski et al., 2004. Die Markierung innerhalb des Nukleoplasmas beruht vermutlich auf der Anwesenheit der B-Snurposomen. Diese Ergebnisse spiegeln das Immunfluoreszenzmuster wider, mit markierten speckles im Nukleoplasma und Strukturen an der Kernhülle (Abbildung 5-11).

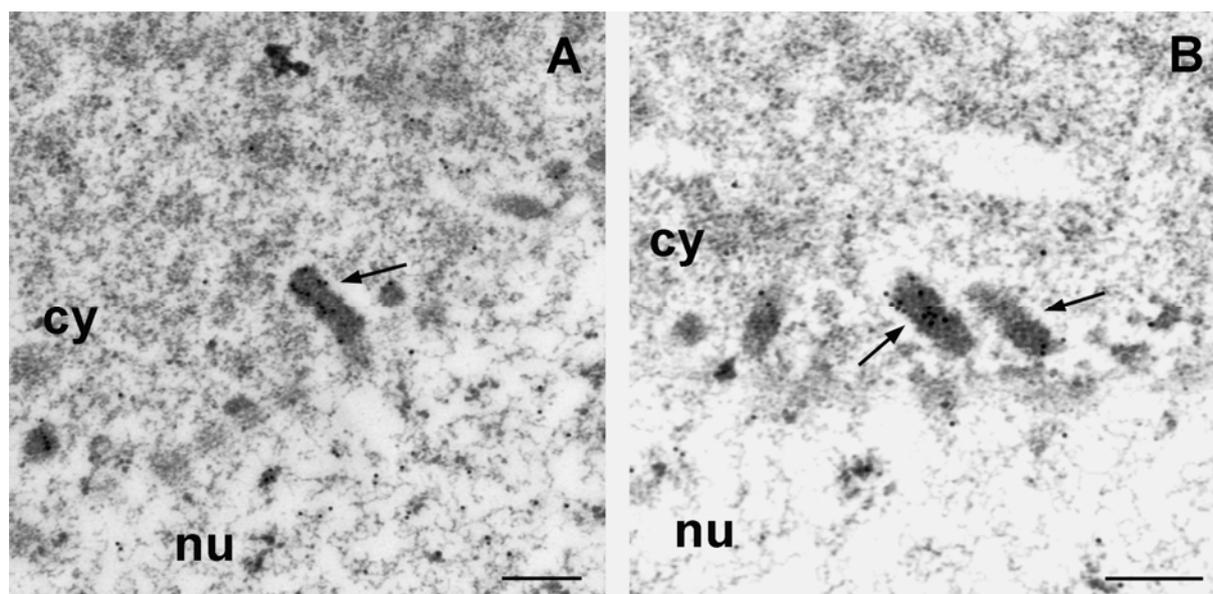


Abbildung 5-12 Immungoldlokalisation mit Y12 an *Xenopus laevis* Oozyten. Die Nuage-Strukturen sind mit Goldpartikeln markiert (Pfeile). Gezeigt ist eine Postembedding Lokalisierung an Ultradünnschnitten von LR-White eingebetteten Oozyten. Die Kernmembranen sind nur schwach erkennbar, da nicht mit OsO_4 fixiert wurde. nu: Nukleoplasma; cy: Zytoplasma. Eichstriche: A: 500nm; B: 200nm.

5.2 Veränderung der Nuage-Strukturen durch zelluläre Inhibitoren

In den vorherigen Abschnitten konnte durch Immunfluoreszenz und Immungold-EM gezeigt werden, dass der Antikörper IV'D4 zytoplasmatische Nuage an der Kernhülle von prävitellogenen *Xenopus laevis* Oozyten erkennt. Über die Dynamik der Strukturen war bis dato nichts bekannt. Es lagen auch keine Erkenntnisse darüber vor, ob es sich bei den Nuage um Material handelt, das über die Kernporen aus dem Zellkern oder in den Zellkern transportiert wird. Daher wurde untersucht, ob Transkriptions- und Translationsprozesse Einfluss auf die Nuage ausüben. Es war bekannt, dass in prävitellogenen Oozyten viele Proteine und RNAs in Form von RNPs gespeichert werden. Einen besonders hohen Anteil bilden dabei das 7S RNP und vor allem das 42S RNP, das ca. 20% des gesamten Proteingehalts prävitellogener Oozyten ausmacht. Es setzt sich aus den Proteinen 42Sp43 und 42Sp50, sowie aus 5S rRNA und tRNAs im Verhältnis 1:2:1:3 zusammen (Johnson et al., 1984). Die Vermutung, dass Nuage Orte des 42S RNP-Zusammenbaus sein könnten, zum Zeitpunkt an dem 5S rRNAs und tRNAs den Zellkern durch die Kernporen verlassen, lag deshalb nahe. Darum sollte im Folgenden getestet werden, ob bzw. wie sich Nuage nach Inkubation mit verschiedenen zellulären Inhibitoren verändern.

5.2.1 Inkubation mit Actinomycin D (AMD), Cycloheximid (CHX) und Leptomycin B (LMB)

Zunächst wurde Ovar mit dem Zytostatikum Actinomycin D (AMD) inkubiert. Hohe Konzentrationen von AMD hemmen die RNA-Synthese durch Blockierung der RNA-Polymerasen und damit auch den RNA-Transport aus dem Zellkern in das Zytoplasma. Da in anderen Organismen bereits bestimmte mRNAs als Komponenten von Nuage identifiziert wurden (z.B. *vasa* mRNA in Zebrafisch, Knaut et al., 2000), sollte überprüft werden, ob die Inhibition der mRNA-Synthese und des mRNA-Transports die Nuage verändert. Prävitellogenes Ovar wurde 4 Stunden in AMD (50µg/ml) inkubiert und danach für die Elektronenmikroskopie aufgearbeitet. Die Abbildung 5-13 (A) zeigt, dass die Behandlung mit

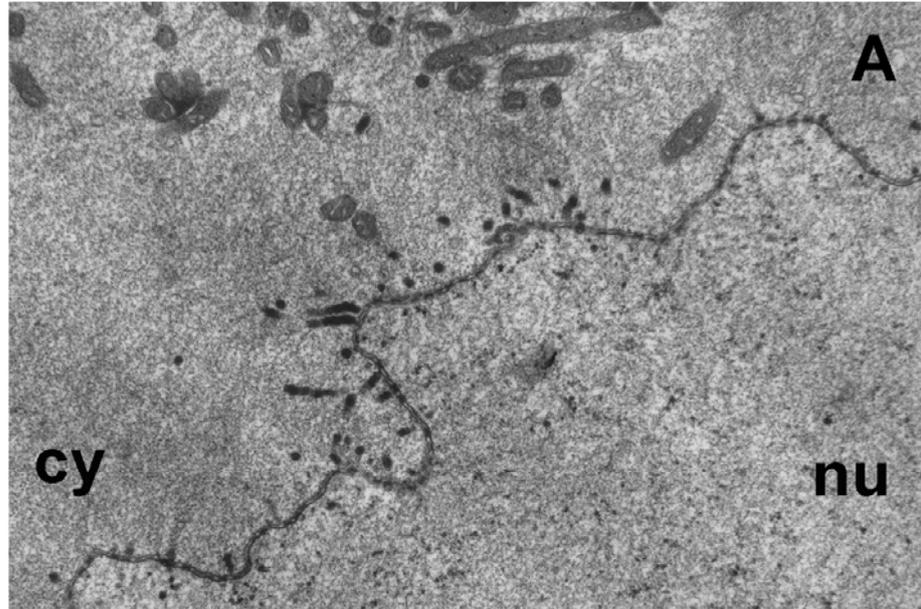
diesem Zytostatikum keinen sichtbaren Einfluss auf die strukturelle Organisation der Nuage ausübte. Die Anzahl, Anordnung und Form der Nuage unterschieden sich nicht von denen unbehandelter Oozyten (Abbildung 5-6).

Da in Nuage, neben RNAs, auch bereits Proteinkomponenten wie z.B. Proteine mit Dimethylargininmotiven identifiziert wurden (Abbildung 5-12 und Bilinski et al., 2004), sollte im nächsten Versuch überprüft werden, ob eine Hemmung der Translation eine strukturelle Veränderung der Nuage hervorrufen könnte. Deshalb wurde prävitellogenes *Xenopus* Ovar über Nacht in Cycloheximid (50µg/ml) inkubiert. CHX ist ein Antibiotikum, das in eukaryotischen Zellen als Translationshemmer wirkt. Es hemmt die Aktivität der 60S-Untereinheit der Ribosomen, womit eine erfolgreiche Proteinbiosynthese verhindert wird. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 5-13 (B) dargestellt und zeigt, dass auch eine Inhibition der Translation zu keiner eindeutigen Veränderung der Nuage führte. Die Strukturen wiesen allerdings eine dichtere, kugeligere Form auf und hatten zu einem großen Teil den Kontakt zu den Kernporen auf der zytoplasmatischen Seite der Kernhülle verloren.

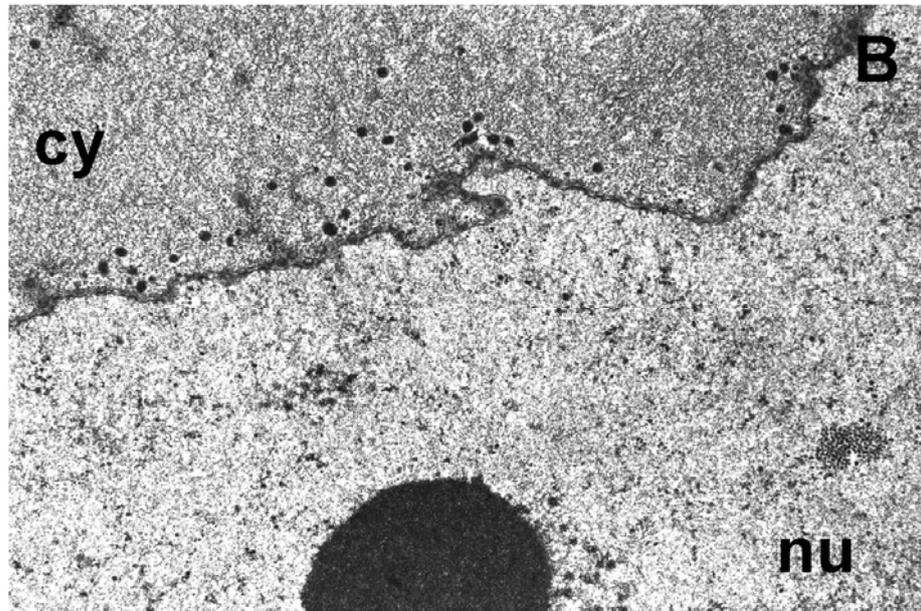
Schließlich wurde Ovar mit Leptomycin B (200nM) über Nacht inkubiert. LMB inhibiert CRM1 (Exportin 1) und verhindert somit den Export von Proteinen mit leucinreichen Kernexportsequenzen (NES) aus dem Zellkern in das Zytoplasma. Mit Hilfe dieses Versuchs sollte herausgefunden werden, ob Nuage Aggregate darstellen, die sich auf der zytoplasmatischen Seite der Kernpore bilden, wenn Proteine bzw. RNPs exportiert werden. Wie in Abbildung 5-13 (C) zu erkennen ist, sind auch hierbei keine Unterschiede in Form und Aufbau der Nuage im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 5-6) zu erkennen.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass weder eine Hemmung der Transkription, der Translation, sowie des nukleären Exports über den CRM1-Weg eine Veränderung der Nuage in Form, Gestalt und Anzahl bewirken.

AMD



CHX



LMB

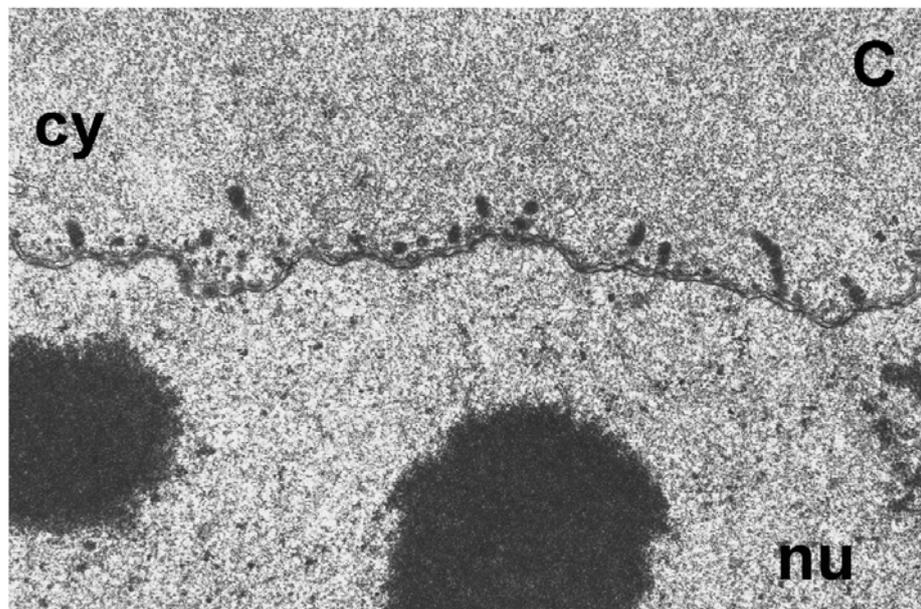


Abbildung 5-13 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von prävitellogenem *Xenopus* Ovar, das mit Actinomycin D (A), Cycloheximid (B) bzw. Leptomycin B (C) inkubiert wurde. In allen drei Abbildungen ist zu erkennen, dass sich die Nuage in ihrer strukturellen Organisation, ihrer Anordnung und Anzahl nicht von denen in Kontrolloozyten (Abbildung 5-6) unterscheiden. cy: Zytoplasma; nu: Nukleoplasma.

5.2.2 Inkubation mit Methyltransferase-Hemmern

Es wurde bereits gezeigt, dass beide Antikörper Y12 und IV'D4 Nuage in *Xenopus* Oozyten erkennen. Der Antikörper Y12 erkennt Proteine mit symmetrisch methylierten Argininresten, zu denen insbesondere die Sm-Proteine zählen (Lerner et al., 1981; Brahms et al., 2000 and Graydon et al., 2006). Anhand des folgenden Versuchs sollte überprüft werden, ob durch die Hemmung der Dimethylierung die strukturelle Organisation der Nuage beeinflusst und ob das Markierungsmuster von IV'D4 verändert wird.

Arginin-Methylierung ist eine posttranslationelle Modifikation von Proteinen, die durch Methyltransferasen vermittelt wird. Man unterscheidet dabei Typ I und Typ II Methyltransferasen. Der Typ I induziert eine asymmetrische Dimethylierung (aDMA) von Argininresten, wohingegen die Typ II-Methyltransferasen PRMT5 und PRMT7 eine symmetrische Dimethylierung (sDMA) katalysieren (Coté and Richard, 2005; Bedford and Richard, 2005). Der Inhibitor Methylthioadenosin (MTA) führt zu einer kompetitiven Hemmung und Adenosindialdehyd (Adox) zu einer generellen Hemmung der Methyltransferasen (Coté and Richard, 2005). Anhand von Versuchen mit dem *Drosophila*-Ortholog von PRMT5, Dart5, ist bekannt, dass die symmetrische Dimethylierung der Sm-Proteine keine Auswirkung auf die Biogenese der snRNPs hat, die Reifung der Oozyten und der Spermien jedoch gestört ist (Gonsalvez et al., 2006). Da angenommen wird, dass Nuage eine Vorläuferstruktur der Germinal Granules ist, die für die Determinierung der Keimzellen verantwortlich sind, lag die Vermutung nahe, dass eine Hemmung der Dimethylierung der Sm-Proteine einen Einfluss auf die Struktur der Nuage haben könnte.

Deshalb wurde für diesen Versuch prävitellogenes *Xenopus* Ovar 24 Stunden in 1mM Adox- bzw. MTA-Lösung inkubiert. Als Kontrolle wurde Ovar im gleichen Medium ohne MTA inkubiert. Für die Immunfluoreszenzexperimente wurden Gefrierschnitte angefertigt, die mit IV'D4 bzw. Y12 inkubiert wurden (Abbildungen 5-14 und 5-15). Außerdem wurden Teile des Ovars elektronenmikroskopisch untersucht.

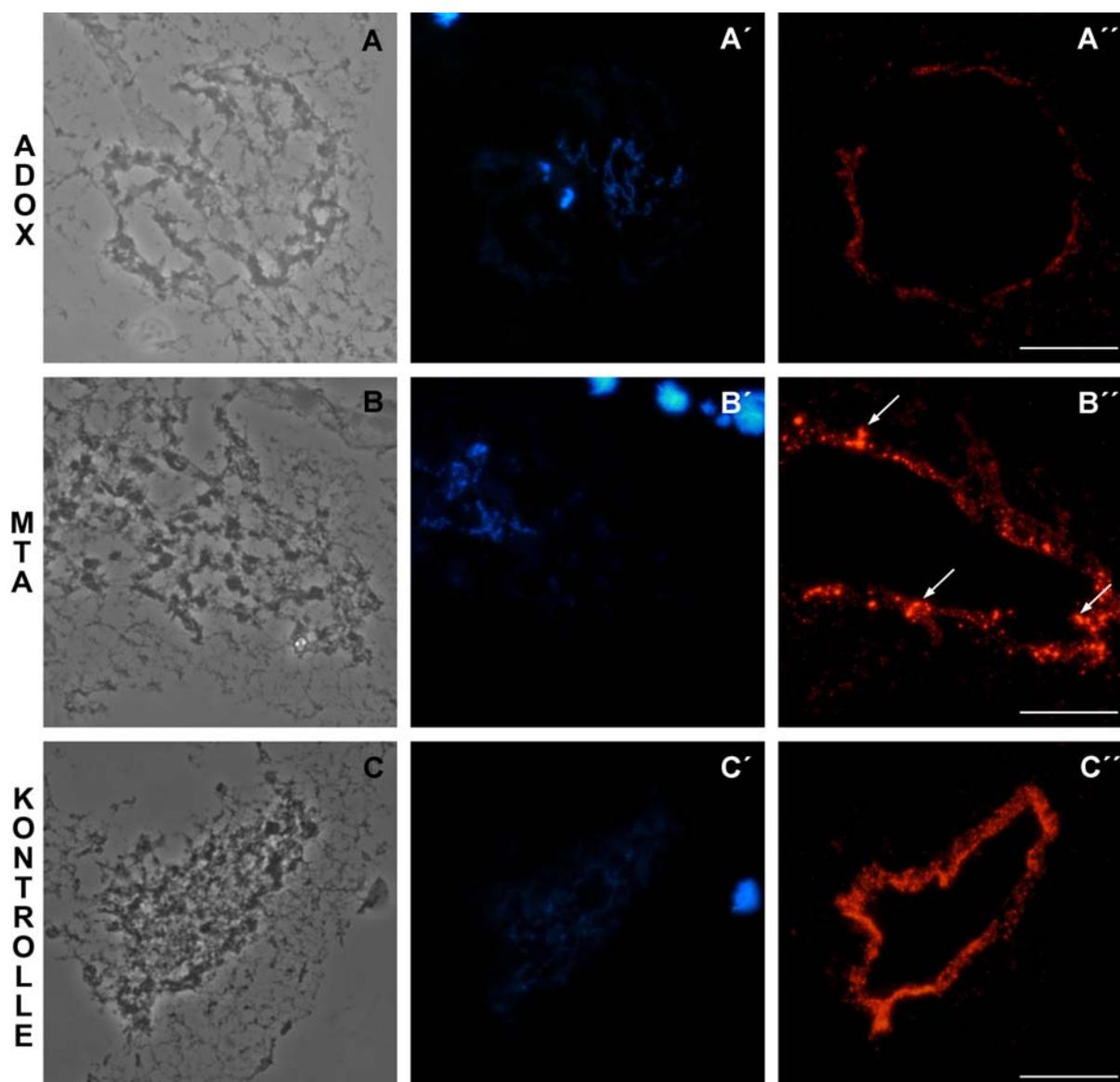


Abbildung 5-14 Immunfluoreszenz mit IV'D4 an Gefrierschnitten von *Xenopus laevis* Ovar, das mit den Methyltransferasehemmern Adox bzw. MTA inkubiert wurde. Phasenkontrastaufnahmen (A/B/C); DNA-Färbung mit Hoechst (A'/B'/C'); Immunfluoreszenz mit IV'D4 (A''/B''/C''). Die Aufnahmen zeigen jeweils die Kernregion und wurden mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop angefertigt. Eichstriche: 50µm.

Auch wenn die strukturelle Organisation der Oozyten in den Gefrierschnitten nicht sehr gut erhalten ist, lassen sich die Oozytenkerne im Phasenkontrast eindeutig erkennen (Abbildung 5-14: A-C). In den Hoechst-Aufnahmen sind die Follikelzellen und Lampenbürstenchromosomen gefärbt (Abbildung 5-14: A'-C'). Die Immunfluoreszenzaufnahme der Kontrolloozyte nach Inkubation mit IV'D4 (Abbildung 5-14: C'') zeigt das typische, gepunktete Markierungsmuster der Kernhülle, das bereits in den Abbildungen 5-1 und 5-2 beschrieben ist. Dagegen ist unter Einfluss des generellen Methyltransferase-Hemmers Adox das Signal durch IV'D4 deutlich reduziert (Abbildung 5-14: A''). Nach Inkubation mit MTA blieb das gepunktete Markierungsmuster der Kernperipherie erhalten. Zusätzlich erschienen jedoch noch größere fluoreszierende Foci an der Kernhülle (Abbildung 5-14: B'', markiert durch Pfeile). Der Antikörper Y12 erbrachte ähnliche Ergebnisse, die in der folgenden Abbildung dargestellt sind.

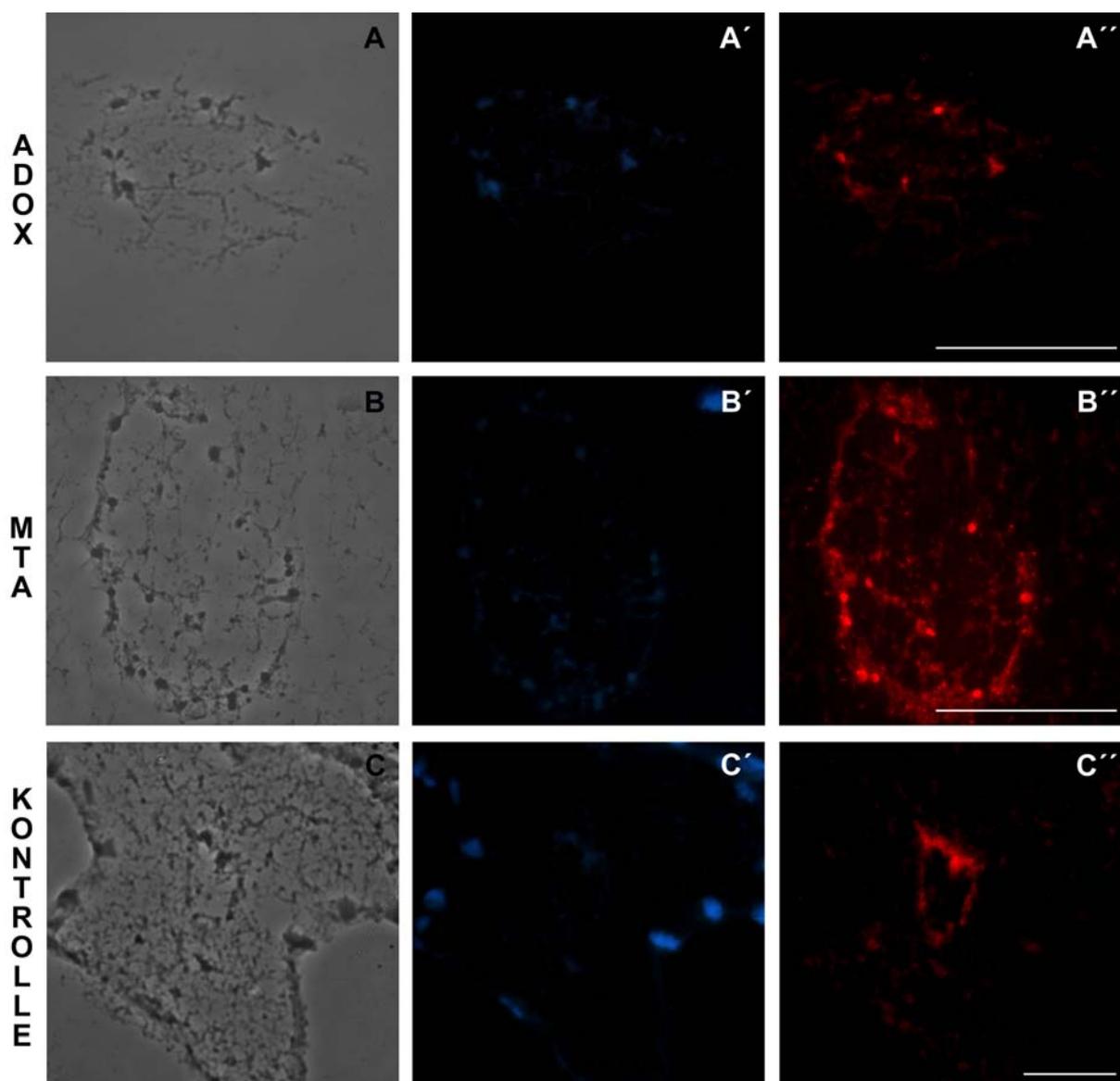


Abbildung 5-15 Indirekte Immunfluoreszenz mit Y12 an Gefrierschnitten von *Xenopus laevis* Ovar, das mit Adox bzw. MTA inkubiert wurde. Phasenkontrastaufnahmen (A/B/C); DNA-Färbung mit Hoechst (A'/B'/C'); Immunfluoreszenz mit Y12 (A''/B''/C''); Eichstriche: 50µm.

Die Anfärbung von Gefrierschnitten der Kontrollloozyten mit Y12 zeigt das schon beschriebene Markierungsmuster der Kernhülle (Abbildung 5-15: C''). Da der Oozytenkern flach angeschnitten ist, lassen sich die B-Snurposomen oder splicing speckles nicht erkennen. In den Phasenkontrastaufnahmen sind die Zellkerne deutlich sichtbar (Abbildung 5-15: A-C). Unter Einfluss von Adox wurde auch das Markierungsmuster durch Y12 verändert (Abbildung 5-14: A''). Das Signal erscheint im Vergleich zur Kontrolle (C'') deutlich reduziert. Eine Inkubation mit MTA bewirkte ebenfalls eine, wenn auch geringere Reduzierung des Fluoreszenzsignals von Y12. Auch hierbei war die Bildung von auffällig großen Foci an der Kernhülle zu beobachten (Abbildung 5-14: B'').

Die Behandlung prävitellogener Oozyten mit Adox bzw. MTA bewirkt eine Reduzierung der Methylierung von Proteinen. Dieser Effekt kann durch Y12 sichtbar gemacht werden, da der Antikörper Proteine mit symmetrisch methylierten Argininresten erkennt. Erstmals wurde hier gezeigt, dass der Vorgang auch durch IV'D4 nachgewiesen werden kann. Auch auf elektronenmikroskopischer Ebene konnte nach einer Hemmung der Methyltransferasen eine

strukturelle Veränderung der Nuage beobachtet werden. Sie erschienen weniger dicht gepackt bzw. aufgelockert (Abbildung 5-16). Die Nuage stellen sich nach der Hemmung als vesikelartige Strukturen dar, deren elektronendichtes Material an der Peripherie konzentriert ist. Der Effekt war sowohl durch die Behandlung mit MTA (A), als auch durch die Inkubation mit Adox (B) zu beobachten.

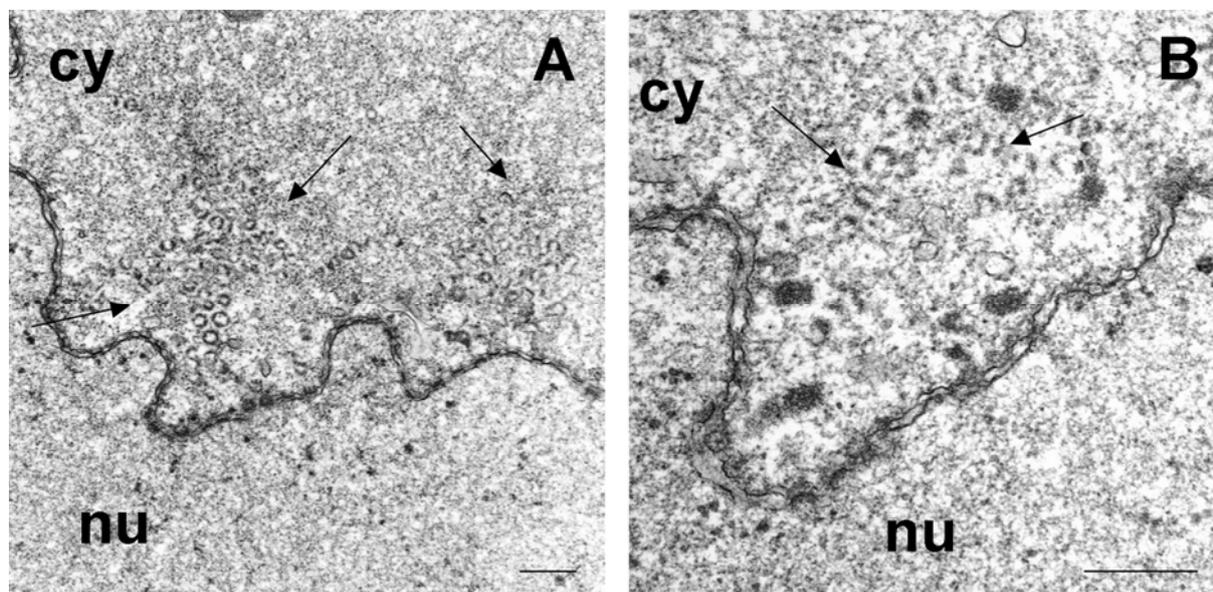


Abbildung 5-16 Elektronenmikroskopische Aufnahme der Kernhüllenregion von *Xenopus* Oozyten, die mit den Methyltransferase-Hemmern MTA (A) bzw. Adox (B) inkubiert wurden. Die behandelten prävitellogenen Oozyten wurden in Epon eingebettet und ultradünn geschnitten. Die Nuage erscheinen in ihrer Dichte aufgelockert und weisen eine runde, vesikelartige Gestalt auf. Eichstriche: 500nm.

5.3 Biochemische Identifizierung des IV'D4-Antigens

Nachdem gesichert war, dass der Antikörper IV'D4 die perinukleären Nuage in prävitellogenen *Xenopus laevis* Oozyten anfärbte, sollte die biochemische Natur des IV'D4-Antigens ermittelt werden. Dazu wurde zunächst ein Immunblot mit Extrakt aller sechs Oozytenstadien durchgeführt. Obwohl IV'D4 in reiferen Oozyten keine definierten Strukturen in der Immunfluoreszenz anfärbte, könnte das entsprechende Antigen weitgehend gleichmäßig verteilt und so leicht der Beobachtung entgangen sein.

5.3.1 Immunblot mit prävitellogem *Xenopus* Oozytenextrakt

Im ersten Schritt der biochemischen Charakterisierung von IV'D4 wurde Extrakt von prävitellogenen *Xenopus*-Oozyten durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit IV'D4 inkubiert. Der Antikörper markiert eine einzelne Proteinbande bei ca. 50 kDa, die auch im Coomassie-Gel bereits deutlich zu erkennen ist (Abbildung 5-17). Somit wurde angenommen, dass es sich beim Antigen von IV'D4 um ein Protein handelt, das in relativ hoher Konzentration in Oozyten vorliegt. Die Vermutung lag nahe, dass es sich dabei um ein Protein aus dem 42S RNP, nämlich 42Sp50, handeln könnte. Dieses Ribonukleoproteinpartikel liegt in prävitellogenen Oozyten in sehr hoher Konzentration vor und dissoziiert im Verlauf der Oogenese. Das könnte die Erklärung dafür sein, dass der Antikörper IV'D4 in der Immunfluoreszenz nur Strukturen in prävitellogenen Oozyten markiert.

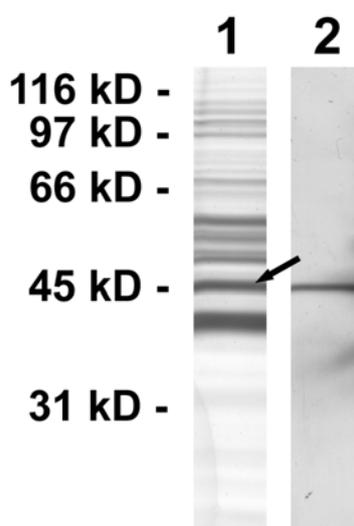


Abbildung 5-17 Coomassie-Gel von prävitellogenem *Xenopus* Oozytenextrakt (1) und Immunblot mit Antikörper IV'D4 (2). Der Extrakt von zehn prävitellogenen Oozyten wurde aufgetragen und durch SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend geblottet und die Nitrozellulose mit IV'D4 inkubiert. Der Antikörper erkennt eine Proteinbande bei ca. 50 kDa (2). Die im Gel verbliebenen Proteine wurden mit Coomassie-Blau gefärbt. Die 50kD Bande ist durch einen Pfeil markiert (1).

5.3.2 Expression während der Oogenese

Für diesen Versuch wurde von jedem Oozytenstadium ein Extrakt hergestellt, die Proteine durch SDS-Page aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Membran wurde im Anschluss mit IV'D4 inkubiert. Der Antikörper erkannte in allen Oozytenstadien eine Proteinbande bei ca. 50kDa (Abbildung 5-18). Aus den Signalstärken der einzelnen Banden dieses Immunblots könnte man schließen, dass in prävitellogenen Oozyten die größte Menge des IV'D4-Antigens vorlag. Allerdings war durch die beträchtlichen Größenunterschiede der Oozyten und ihre unterschiedlichen Dottermengen ein quantitativer Vergleich der Signale kaum möglich. Neben Oozytenextrakt wurde auch Herzgewebe untersucht. Auch hier wurde eine Bande bei ca. 50kDa markiert (Abbildung 5-18).

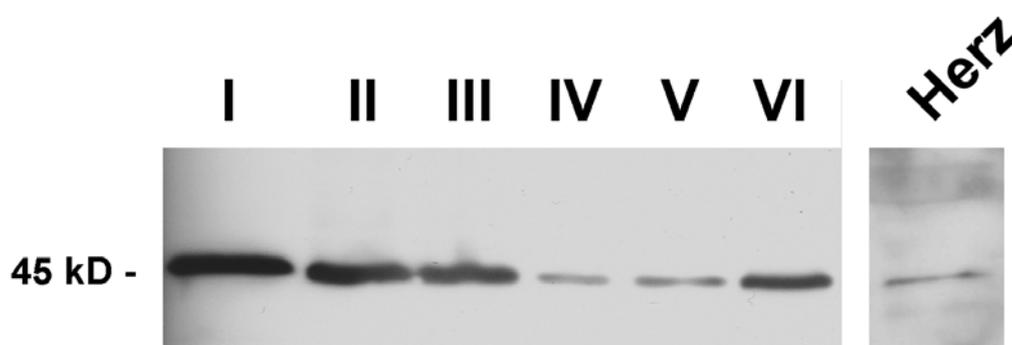


Abbildung 5-18 Immunblot mit Antikörper IV'D4 unter Verwendung von Extrakten verschiedener Oozytenstadien. Aufgetragen wurde ein Volumen, das zehn Stadium I Oozyten entsprach. IV'D4 erkennt in jedem Oozytenstadium (I-VI) eine Bande bei ca. 50kDa.

Das Ergebnis dieses Versuchs ist, dass der Antikörper IV'D4 ein Protein erkennt, das sehr häufig in jungen Oozyten, aber auch in allen anderen Oozytenstadien und in somatischem Gewebe vorkommt. Wenn es sich, wie unter 5.3.1 vermutet, um das Protein 42Sp50 des 42S RNPs handeln würde, dann sollte es in den reifen Oozytenstadien und vor allem in somatischen Geweben (z.B. Herz) nicht vorhanden sein (Kapitel 2.9). Es ist allerdings bekannt, dass 42Sp50 eine Variante des Elongationsfaktors 1A darstellt und dass in *Xenopus* neben 42Sp50 noch zwei weitere Varianten des Elongationsfaktors vorliegen: EF1A-S (somatisch), das laut Literatur nahezu ausschließlich in somatischem und embryonalem Gewebe vorkommt, sowie EF1A-O (oozytenspezifisch), das in Keimzellen und Embryonen bis zur Neurulation exprimiert wird (Abdallah et al., 1991; Dje et al., 1990; Krieg et al., 1989). Die Isoformen des Elongationsfaktors 1A und deren Expressionsmuster sind in der Einleitung ausführlicher beschrieben (Kapitel 2.8). Daher lag die Vermutung nahe, dass der Antikörper IV'D4 neben 42Sp50 ebenfalls die nah verwandten EF1A-Isoformen erkennt, was die positiven Resultate mit Herzgewebe erklären würde.

5.3.3 Vergleichende Immunblots mit IV'D4 und einem Antikörper gegen EF1A mit Extrakten verschiedener Oozytenstadien

Im nächsten Versuch wurde erneut eine Nitrozellulose mit Extrakten aller Oozytenstadien mit IV'D4 inkubiert, gestrippt und danach mit einem kommerziellen anti-EF1A Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper reagiert mit allen Isoformen des Elongationsfaktors 1A in verschiedenen Organismen. Auch hier wurden wieder 10 Stadium I Oozytenvolumenäquivalente/Spur durch SDS-Page aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Wie in Abbildung 5-19 dargestellt, erkannten beide Antikörper (IV'D4: A; und anti-EF1A: B) in allen Oozytenstadien dieselben Proteine bei ca. 50kDa. Damit war klar, dass der Antikörper IV'D4 tatsächlich den Elongationsfaktor EF1A erkennt, und zwar vermutlich alle drei Isoformen. Das schwache Signal in Spur I ist auf die bereits erwähnte biologische Variabilität der Oozyten zurückzuführen und bedeutet nicht, dass in Stadium I weniger Protein im Vergleich zu den anderen Stadien (II-VI) vorhanden war. Die drei Isoformen können zwar anhand ihrer Proteinsequenz voneinander unterschieden werden, ähneln sich aber in ihren molekularen Massen so stark, dass sie durch eine eindimensionale Gelelektrophorese nicht aufgetrennt werden konnten.

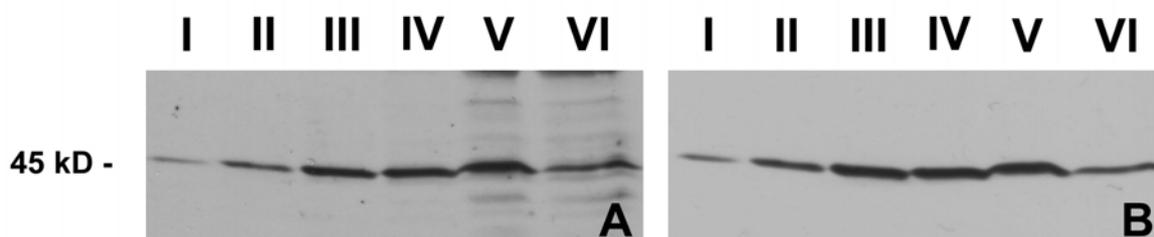


Abbildung 5-19 Vergleichender Immunblot mit verschiedenen Oozytenextrakten. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Zunächst wurde die Nitrozellulose mit IV'D4 (A) inkubiert, anschließend gestrippt und mit anti-EF1A (B) inkubiert. Beide Antikörper markieren dieselben Proteinbanden bei ca. 50kDa.

5.3.4 Expression von EF1A in verschiedenen Oozytenstadien und Geweben

Um die Verteilung von EF1A in weiteren Organen und Geweben zu analysieren, wurden Immunblots durchgeführt. Der Antikörper gegen EF1A erkannte in allen untersuchten Proben eine Proteinbande bei ca. 50kDa (Abbildung 5-20).

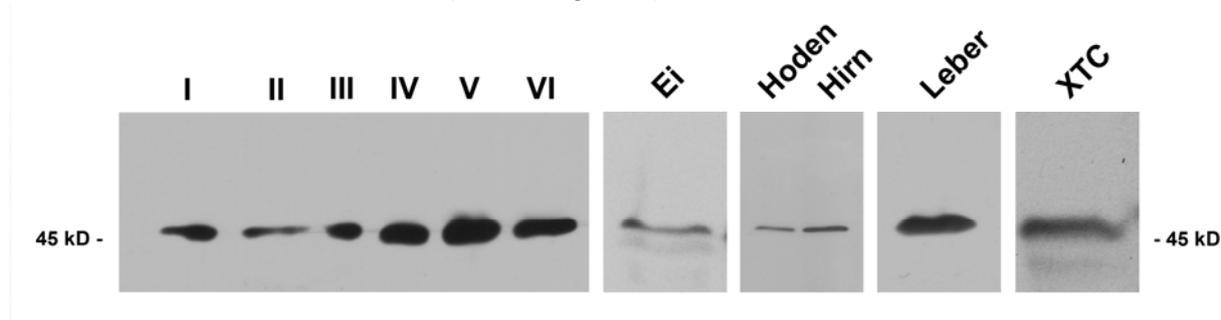


Abbildung 5-20 Immunblots verschiedener Oozytenstadien, Organe und Gewebe eines adulten *Xenopus laevis*. Die extrahierten Proteine wurden elektrophoretisch durch eine SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit dem Antikörper anti-EF1A inkubiert.

5.3.5 Immunpräzipitationen mit den Antikörpern IV'D4 und anti-EF1A

Mit den Immunpräzipitationsversuchen sollte überprüft werden, ob beide Antikörper die gleichen Proteine auch in nativer Konformation binden. Die Experimente wurden mit den beiden Antikörpern IV'D4 und anti-EF1A durchgeführt. Dazu wurde Oozytenextrakt mit dem jeweiligen Antikörper (IV'D4 oder anti-EF1A) inkubiert und die Antigen/Antikörper-Komplexe mit Dynabeads isoliert. Die Proteine wurden im Anschluss durch eine SDS-Page aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit anti-EF1A detektiert. In (A) und (B) wurde Oozytenextrakt vor (Spuren 1) und nach (Spuren 2) der Immunpräzipitation aufgetragen (Abbildung 5-21). Die nahezu gleiche Bandenintensität in den Spuren 1 und 2 zeigt, dass die Immundepletion des Extrakts nicht vollständig erfolgte. Dies lag vermutlich an der hohen Konzentration der entsprechenden Antigene. Die verwendeten Primärantikörper wurden in den Spuren 3 aufgetragen, zu erkennen ist die jeweilige schwere Kette (die leichte Kette ist aus dem Gel gelaufen). In den Spuren 4, in denen das eluierte Immunpräzipitat aufgetragen wurde, sieht man jeweils die schwere Kette der Antikörper und EF1A (markiert mit *). Als Kontrolle (Spuren 5) diente ein Ansatz ohne Zugabe der Primärantikörper. Die Ergebnisse zeigen, dass beide Antikörper aus Oozytenextrakt EF1A immunpräzipitieren (mit * markierte Banden in den Spuren 4 der Abbildung 5-21).

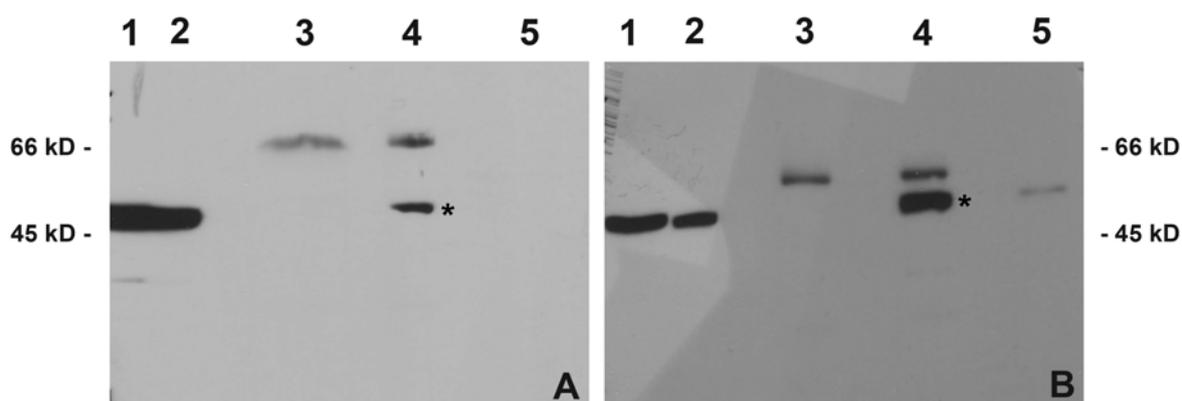


Abbildung 5-21 Immunpräzipitation mit IV'D4 (A) und anti-EF1A (B) unter Verwendung von Oozytenextrakt. Die Immunblot-Analyse wurde mit anti-EF1A durchgeführt. In den Spuren 1 wurde Oozytenextrakt vor, in den Spuren 2 nach der Immunpräzipitation aufgetragen. Spuren 3 zeigen die schweren Ketten des jeweiligen Primärantikörpers IV'D4 (A) oder anti-EF1A (B). In den Spuren 4 wurde das Immunpräzipitat aufgetragen (EF1A-Banden mit * markiert, die darüberliegenden Banden sind die schweren Ketten des Antikörpers). In den Spuren 5 ist die Kontrolle ohne Primärantikörper aufgetragen.

5.3.6 Bakterielle Expression und Aufreinigung von 42Sp50

Zum Nachweis, dass die beiden Antikörper IV'D4 und anti-EF1A tatsächlich *Xenopus* 42Sp50 erkennen, wurde rekombinantes 42Sp50 mit einem C-terminalen Hexahistidin-Tag in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und für einen Immunblot vorbereitet. Dazu wurde die cDNA von 42Sp50 (Z19545) mit einer DNA-Polymerase amplifiziert und über BamHI/HindIII-Restriktionsstellen in den pQC-6xHis Expressionsvektor kloniert. Anschließend wurde das Plasmid in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Durch die Sequenzierung des Vektors wurde sichergestellt, dass sich der DNA-Abschnitt im korrekten Leseraster innerhalb der multiplen Klonierungsstelle (MCS) befand und keine Punktmutation oder Deletion aufwies. Durch Zugabe von IPTG wurde die Expression des Fusionsproteins in *E. coli* XL1blue Zellen induziert. Die Bakterien wurden zwei Stunden nach dem Induktionsstartpunkt geerntet und die exprimierten Proteine durch Lyse aus den Bakterien gelöst. Anschließend wurde ein Teil des Bakterienlysats mit einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, um die Expression des rekombinanten Polypeptids nachzuweisen. Nach Anfärbung des Gels mit Coomassie-Blue konnte eine deutliche Bande bei etwa 50kDa nachgewiesen werden (keine Abbildung). Die Aufreinigung des Fusionsproteins erfolgte über das Hexahistidin-Tag unter denaturierenden Bedingungen mit einer Nickel-NTA-Agarosesäule. Im Anschluss wurden ca. 200ng des Fusionsproteins aus der Elutionsfraktion mit Hilfe einer SDS-Page aufgetrennt, geblottet und zunächst mit IV'D4 inkubiert. Danach wurde die Membran gestript und mit anti-His Antikörper inkubiert. Das gleiche Experiment wurde mit den Antikörpern anti-EF1A und anti-His durchgeführt.

Aus Abbildung 5-22 geht hervor, dass die Antikörper IV'D4 (A), anti-EF1A (C) und anti-His (B und D) dieselben Proteine erkennen. Das vollständige Fusionsprotein weist ein Molekulargewicht von 50kDa auf (Abbildung 5-22: Pfeile in A-D). Die weiteren Banden stellen Degradationsprodukte dar, die durch den Aufreinigungsprozess entstanden sind.

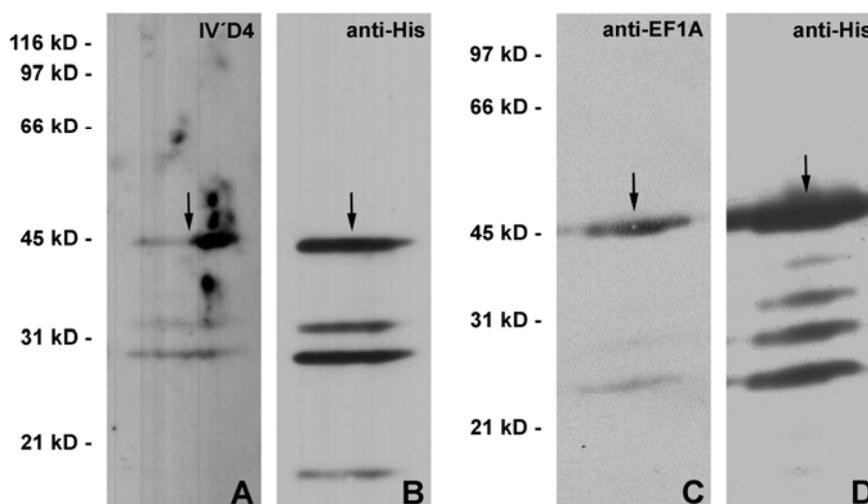


Abbildung 5-22 Überprüfung der Spezifität der Antikörper IV'D4 und anti-EF1A durch Vergleich mit einem anti-His Antikörper. 200ng des aufgereinigten 42Sp50-6xHis wurden in zwei Spuren elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit IV'D4 (A) bzw. anti-EF1A (C) inkubiert. Danach wurden die Membranen gestrippt und mit anti-His (B und D) inkubiert. Alle Antikörper erkennen die gleichen Proteinbanden. Das vollständige Fusionsprotein weist ein Molekulargewicht von ca. 50kDa auf, die Banden darunter stellen Degradationsprodukte dar, die durch den Aufreinigungsprozess entstanden sind.

Zusammenfassend lässt sich über die Antikörper IV'D4 und anti-EF1A sagen, dass beide in Immunblotexperimenten und Immunpräzipitationen identische Antigene erkennen. Immunblots zeigten, dass der Antikörper auch mit *Xenopus*-EF1A von somatischen Zellen reagierte (Abbildung 5-20). 42Sp50 ist die EF1A-Isoform in *Xenopus*, die die geringsten Sequenzübereinstimmungen zu den Säuger-EF1A aufweist (Tabelle 5-5). Da anti-EF1A auch rekombinantes 42Sp50 von *Xenopus* erkennt, liegt die Annahme nahe, dass der Antikörper auch die näher verwandte Isoform EF1A-O erkennt. Somit lässt sich festhalten, dass beide Antikörper die somatische Form von EF1A (EF1A-S) und die oozytenspezifische Variante 42Sp50 erkennen, sowie mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die dritte *Xenopus* Variante, EF1A-O. Weiterhin stellte sich heraus, dass sich nur der Antikörper IV'D4 für Lokalisationsstudien eignet. Beide Antikörper waren für Blots einsetzbar, anti-EF1A wies allerdings eine viel höhere Sensitivität gegenüber dem Antigen auf und eignete sich daher besser für biochemische Versuche. Aufgrund der Tatsache, dass beide monoklonalen Antikörper alle drei EF1A-Isoformen erkennen, lassen sich leider mit den bisher gezeigten Methoden keine Aussagen über die Lokalisierung bzw. die Expression der einzelnen Isoformen innerhalb von Zellen, Oozyten und Geweben machen.

5.4 2D-Gelelektrophorese von EF1A in Oozyten und Leber

Obwohl bekannt war, dass in *Xenopus laevis* drei Isoformen von EF1A existieren, markierten die Antikörper IV'D4 und anti-EF1A in Immunblots von Oozyten und verschiedenen Geweben immer nur eine Bande bei ca. 50kDa. Deshalb wurde durch zwei Varianten der 2D-Gelelektrophorese nach potentiellen Unterschieden in den biochemischen Eigenschaften der EF1A-Isoformen gesucht. Dabei können Proteine, die annähernd dieselbe molekulare Masse, aber einen anderen isoelektrischen Punkt aufweisen, voneinander unterschieden werden.

Zunächst wurden Stadium I Oozyten aus *Xenopus laevis* homogenisiert und mit RNAse verdaut, um die vorhandenen RNPs dadurch zu dissoziieren. RNA-gebundene Proteine

lagen nach der Behandlung frei vor und konnten so im Anschluss elektrophoretisch aufgetrennt werden. Das verdauten Extrakt wurde dann mit Aceton gefällt, mit dem zweidimensionalen NEPHGE-Verfahren aufgetrennt und der Immunblot mit anti-EF1A analysiert. Im Idealfall wurde erwartet, dass der Antikörper drei Proteinspots markierte, die die drei *Xenopus* EF1A-Isoformen darstellen. Die Abbildung 5-23 zeigt jedoch, dass in prävitellogenem Oozytenextrakt zahlreiche Varianten der EF1A-Isoformen vorliegen, die nahezu kontinuierlich den gesamten pH-Bereich von 4,6 bis 9,1 abdecken. Die Annahme lag nahe, dass es sich um Phosphorylierungsvarianten handelte (siehe 5.5.2 bzw. Tabelle 5-4). Die gleichen Analysen wurden auch mit reifem Oozytenextrakt und Lebergewebe durchgeführt und zeigten, dass in diesen Proben zwar deutlich weniger, aber immer noch mehrere Phosphorylierungsstadien der EF1A-Isoformen vorlagen (keine Abbildungen). Beim NEPHGE-Verfahren wurden die Proteine nicht bis zu ihrem tatsächlichen IEP aufgetrennt, was durch eine isoelektrische Fokussierung (IEF), die im Anschluss durchgeführt wurde, möglich ist. Damit sollte herausgefunden werden, ob durch diese Variante der 2D-Gelelektrophorese biochemisch zwischen den einzelnen EF1A-Varianten unterschieden werden kann.

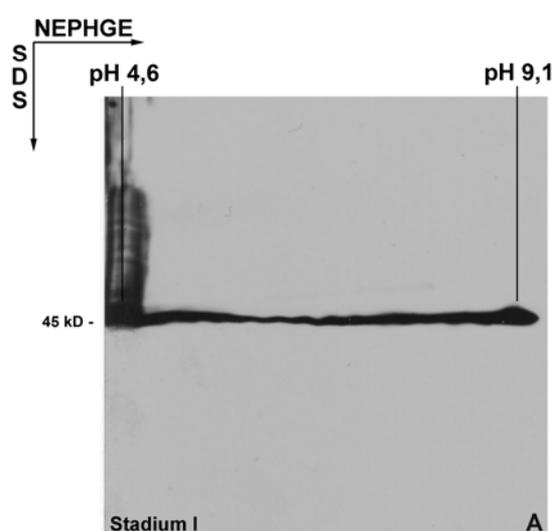


Abbildung 5-23 2D-Gelelektrophorese (NEPHGE) und anschließender Immunblot mit anti-EF1A von Stadium I Oozyten von *Xenopus*. Die EF1A-Isoformen liegen in prävitellogenen Oozyten in zahlreichen Phosphorylierungsstadien in einem pH-Bereich von 4,6-9,1 vor.

Bei der IEF werden vor allem saure Proteine bis zu ihrem tatsächlichen IEP aufgetrennt. Die Analyse von Stadium I, Stadium VI Oozyten und Lebergewebe aus *Xenopus laevis* machte ebenfalls viele EF1A-Isoformen sichtbar, die in Stadium VI Oozyten (Abbildung 5-24, B) und Lebergewebe (Abbildung 5-24, C) in einem pH-Bereich von 6,6 -6,9 liegen. Dagegen existieren in Stadium I Oozyten (Abbildung 5-24, A) EF1A-Varianten in zahlreichen Phosphorylierungsstadien, mit IEPs in einem pH-Bereich zwischen 7,1-6,2. Die in Abbildung 5-24 unter (A') gezeigte Probe von Stadium I Oozyten, wurde zusätzlich einer Phosphatasebehandlung unterzogen und im Anschluss mit RNase verdaut und gefällt. Die in prävitellogenem Oozytenextrakt vorhandenen EF1A-Isoformen lagen danach in deutlich weniger distinkten Phosphorylierungsstadien vor. Durch die Phosphatasebehandlung wurden die Proteine nur partiell dephosphoryliert. Es stellte sich heraus, dass aufgrund von methodischen Problemen keine vollständige Dephosphorylierung des vorhandenen Proteinpools erreicht wurde.

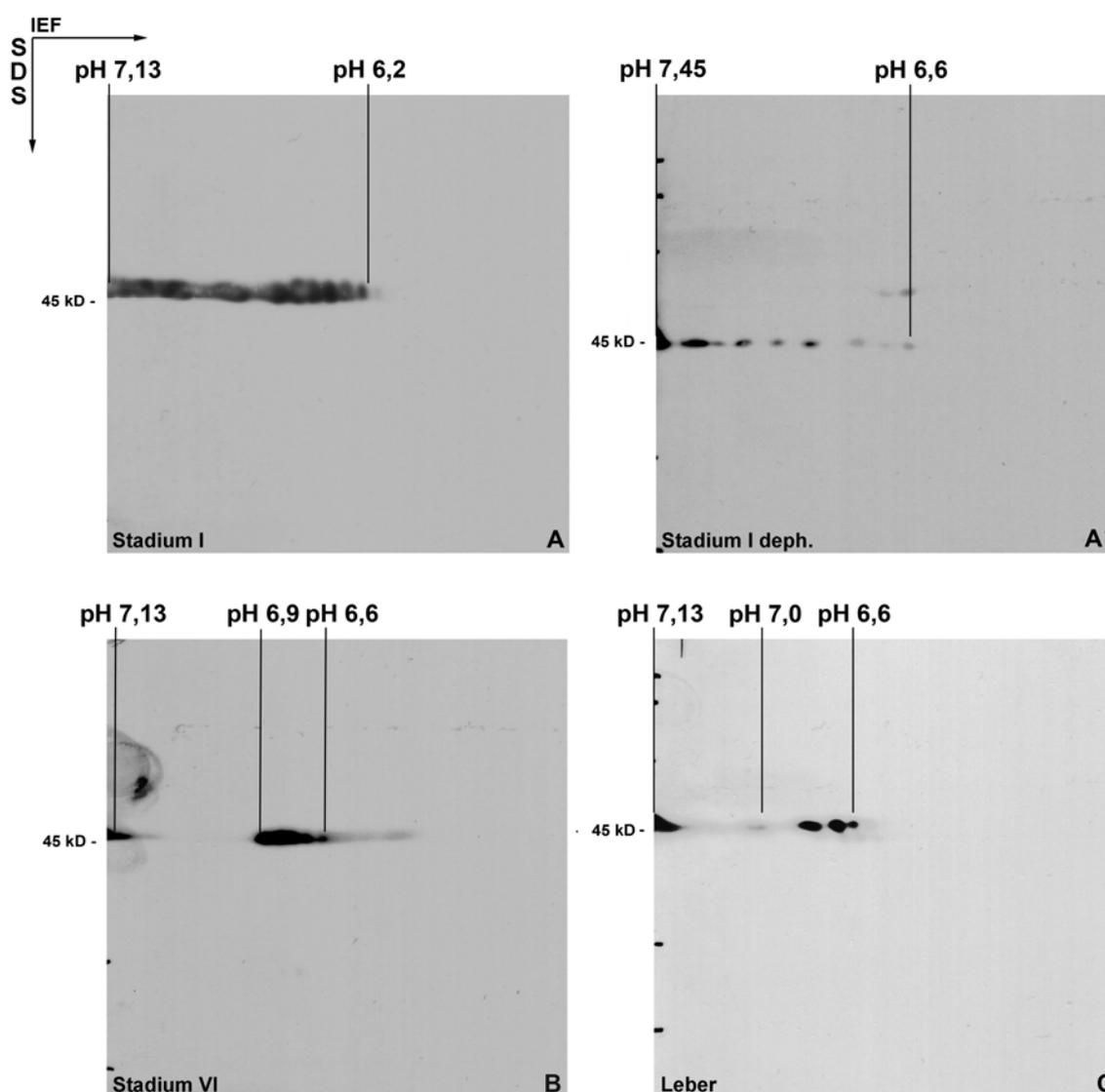


Abbildung 5-24 Die 2D-Gelelektrophorese der isoelektrischen Fokussierung (IEF) wurde zur Bestimmung des tatsächlichen IEPs von EF1A-Isoformen in verschiedenen Proben durchgeführt. EF1A aus prävitellogenen Oozyten (A) liegt in zahlreichen Phosphorylierungsvarianten vor, wohingegen bei den Proteinen aus Stadium VI Oozyten (B) und aus der Leber (C) nur wenige Phosphorylierungsstadien nachweisbar sind. In (A') ist die Probe prävitellogener Oozyten gezeigt, die mit der Phosphatase CIAP vorinkubiert wurde. Hierbei ist eine deutliche Reduzierung der stark phosphorylierten EF1A-Varianten zu erkennen.

Mit Hilfe der NEPHGE konnte gezeigt werden, dass die EF1A-Varianten in prävitellogenem Oozytenextrakt in zahlreichen Phosphorylierungsstadien (pH-Bereich von 4,6 bis 9,1) vorlagen. Der Proteinspot bei pH 9,1 stellt dabei vermutlich die vollständig dephosphorylierte Form von EF1A-S dar, da für EF1A-S dieser pH-Wert berechnet wurde (Tabelle 5-3).

Im Laufe der Oozytenreifung und in somatischem Gewebe akkumulieren die EF1A-Isoformen in einem pH-Bereich zwischen 6,6 bis 7,0. 42Sp50-mRNA konnte in somatischem Gewebe (außer Hirn) nicht nachgewiesen werden (Abbildung 5-29), weshalb angenommen wurde, dass es sich bei den markierten Proteinen in reifen Oozyten und in Lebergewebe um die EF1A-S und EF1A-O handelte (Abbildung 5-24: B und C). Dies würde bedeuten, dass EF1A-S zwischen 8-11 und EF1A-O zwischen 10-12 Phosphatgruppen aufweist. Beide

Proteine liegen somit in den genannten Geweben partiell phosphoryliert vor, da beide Proteine mehr potentielle Phosphorylierungsstellen aufweisen (Kapitel 5.5.2; Tabellen 5-4 und 5-5). Nach wie vor konnte mit den bisherigen Versuchen nicht zwischen den einzelnen EF1A-Isoformen unterschieden werden. Eine Untersuchung der zelltyp- bzw. stadienspezifischen Expression der EF1A-Genfamilie war mit den vorhandenen Antikörpern nicht möglich, da offenbar alle EF1A-Isoformen erkannt wurden. Diese Ergebnisse waren auch zu erwarten, da die Isoformen eine sehr hohe Sequenzverwandtschaft aufweisen. Die Proteine werden im nächsten Ergebnisteil auf molekularer Ebene charakterisiert.

5.5 Molekulare Charakterisierung der drei EF1A-Isoformen von *Xenopus laevis*

Da beide verwendeten Antikörper (IV'D4 und anti-EF1A) nicht zwischen den einzelnen Isoformen des Elongationsfaktors 1A unterscheiden können, konnte auch nicht geklärt werden, welche Isoform Bestandteil der Nuage-Strukturen ist. Daher wurde die Expressionsanalyse auf RNA-Ebene durchgeführt.

5.5.1 Analyse der Nukleotidsequenzen

Die Zugangsnummern der drei Nukleotidsequenzen der EF1A-Isoformen sind bei GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) registriert (Tabelle 5-1). Die EST-Klone der beiden Isoformen des Elongationsfaktors 1A (EF1A-S und EF1A-O) wurden über das RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Heidelberg) bezogen (Tabelle 5-1). Die cDNA von EF1A-S stammte von einem *Xenopus laevis* Embryo, die von EF1A-O aus der Niere eines adulten Tieres. Beide waren in den Expressionsvektor pCMV-SPORT6 der Firma Invitrogen inseriert. Die EST-Sequenzen wurden zunächst komplett durchsequenziert und im Anschluss in den pCR®2.1-TOPO® kloniert, der als Ausgangsvektor für alle weiteren Klonierungen diente. Der Sequenzvergleich der Nukleotidsequenzen aller drei Isoformen wurde mit Hilfe von MultAlin (Corpet, 1988) durchgeführt. Wie in Abbildung 5-25 zu erkennen ist, sind alle drei Sequenzen hoch konserviert. Das 5'-Ende von 42Sp50 ist um neun Nukleotide länger als die anderen beiden Isoformen. Die übrigen Nukleotidsequenzen sind in weiten Teilen identisch und unterscheiden sich über die gesamte Länge hinweg nur in einzelnen Basen.

	IMAG-Klon	Zugangsnummer	coding sequence
EF1A-S	IMAGp998P1712311Q1	BC043843 (Klein et al., 2002)	1389bp
EF1A-O	IMAGp998A1714715Q1	BC079786 (Klein et al., 2002)	1386bp
42Sp50		Z19545 (Cheng et al., 1993)	1392bp

Tabelle 5-1 Herkunftsdaten der verwendeten Nukleotidsequenzen von EF1A-S, EF1A-O und 42Sp50

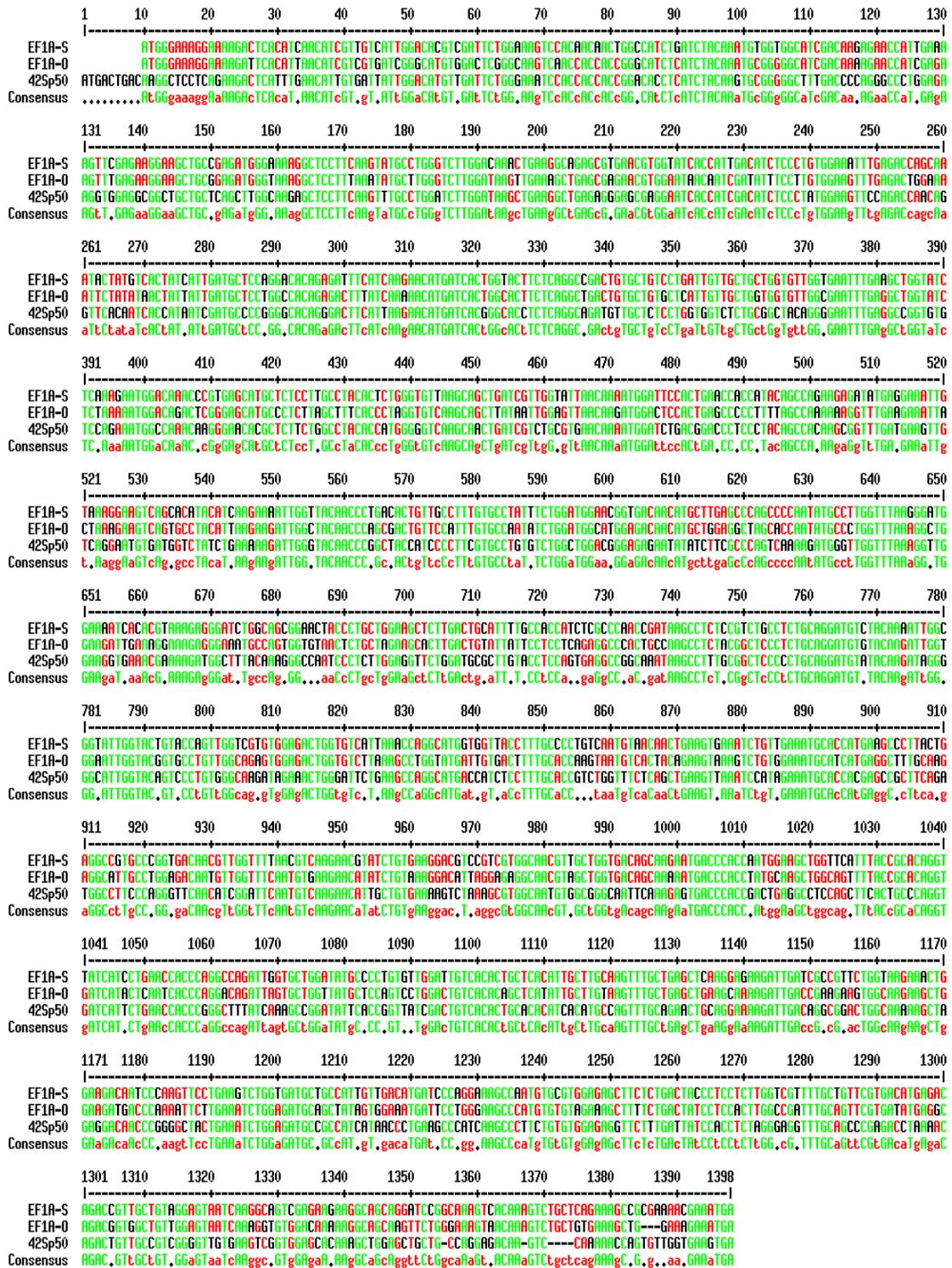


Abbildung 5-25 Nukleotidsequenzen von EF1A-S, EF1A-O und 42Sp50 (Vergleich mit Hilfe MultAlin; Corpet, 1988). Identische Nukleotide sind in grün, Unterschiede in einer Base in rot und Differenzen in mindestens zwei Basen in schwarz dargestellt.

5.5.2 Analyse der Aminosäuresequenzen

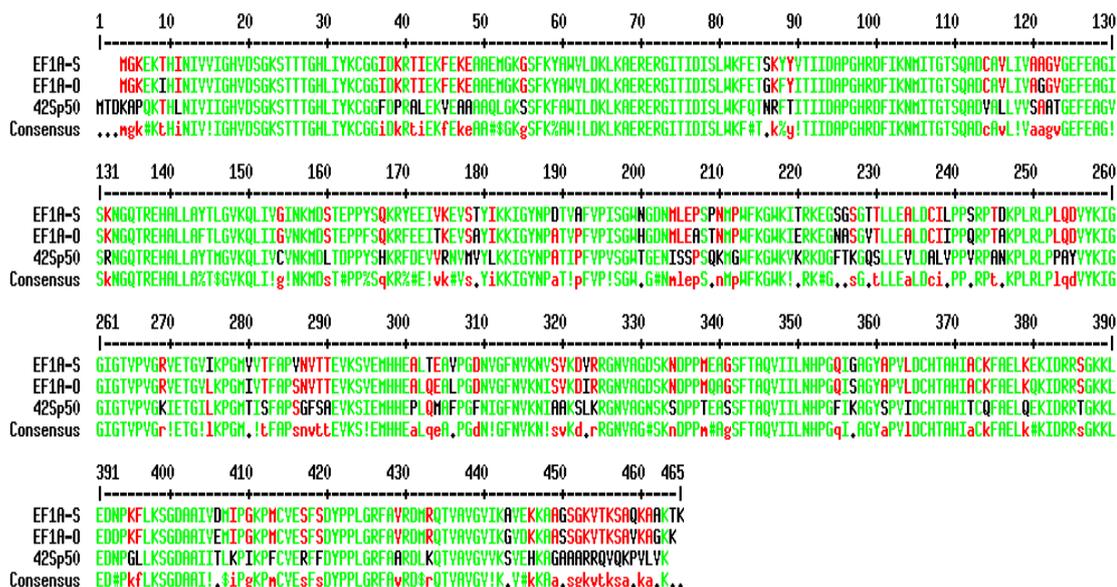


Abbildung 5-26 Aminosäuresequenz der EF1A-Isoformen (EF1A-S, EF1A-O und 42Sp50) von *Xenopus laevis* (MultAlin; Corpet, 1988). Identische Aminosäuren sind in grün, Austausch in nur einer Isoform in rot und Unterschiede in mindestens zwei Isoformen in schwarz dargestellt.

Der Aminosäuresequenzvergleich wurde ebenfalls mit MultAlin (Corpet, 1988) erstellt. Da die Nukleotidsequenzen aller drei Isoformen in einem hohen Prozentsatz identisch sind, war zu erwarten, dass die Aminosäuresequenzen ebenfalls stark konserviert sind. Die hohe Übereinstimmung ist in Abbildung 5-26 anhand der grün markierten Aminosäuren erkennbar. Es fällt auf, dass 42Sp50, im Vergleich zu den anderen Isoformen, Unterschiede im N- und C-Terminus aufweist. Die Übereinstimmungen in den Nukleotid- bzw. Proteinsequenzen der EF1A-Isoformen untereinander sind in Tabelle 5-2 dargestellt und wurden mit NCBI/BLAST Home (*Algorithm*: discontinuous megablast bzw. *Algorithm*: blastp) ermittelt. Bemerkenswert ist, dass 42Sp50 zu EF1A-S und EF1A-O weniger Ähnlichkeiten als EF1A-S und EF1A-O zueinander aufweist.

Nukleotidsequenz (kodierend)	EF1A-S	EF1A-O	42Sp50
EF1A-S	-	79%	69%
EF1A-O	79%	-	67%
42Sp50	69%	67%	-
Proteinsequenz	EF1A-S	EF1A-O	42Sp50
EF1A-S	-	91%	71%
EF1A-O	91%	-	71%
42Sp50	71%	71%	-

Tabelle 5-2 Identitätsvergleich der DNA- bzw. Proteinsequenzen der Xenopus EF1A-Isoformen .

Die molekulare Masse der Polypeptide und die isoelektrischen Punkte wurden mit Hilfe des Programms Compute pI/Mw (Bellquist et al., 1993 und 1994; Gasteiger et al., 2005) kalkuliert und sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

	Molekularmasse	Isoelektrischer Punkt
EF1A-S	50214	9,10
EF1A-O	50123	9,24
42Sp50	50678	9,69

Tabelle 5-3 Molekularmasse und isoelektrische Punkte der EF1A-Isoformen, die mit Hilfe des Programms Compute pI/MW (Bellquist et al., 1993 und 1994; Gasteiger et al., 2005) berechnet wurden.

Von zahlreichen Proteinen ist bekannt, dass sie während der Oogenese in unterschiedlichen Phosphorylierungszuständen vorliegen, wodurch die Funktionen und die Eigenschaften der Proteine verändert werden können. Deshalb wurden für alle drei EF1A-Isoformen mit der Software NetPhos2.0 Server (Blom, Gammeltoft und Brunak; 1999) Phosphorylierungsstellen von Serin, Tyrosin und Threonin kalkuliert (Tabelle 5-4). EF1A-S besitzt anhand der Aminosäuresequenz 26, EF1A-O 19 und 42Sp50 ebenfalls 19 putative Phosphorylierungsstellen. Der isoelektrische Punkt einer jeden Isoform steht im Zusammenhang mit der Anzahl der Phosphatreste. Die jeweiligen IEP-Verschiebungen in Bezug auf die Phosphorylierungsstellen der einzelnen EF1A-Isoformen sind in Tabelle 5-5 aufgelistet. Diese theoretischen Ergebnisse bestätigten somit die Aussagen, die aufgrund der 2D-Gelelektrophoreseversuche unter 5.4 getroffen wurden.

	Putative Phosphorylierungsstellen			
	Serin	Tyrosin	Threonin	Σ
EF1A-S	13	4	9	26
EF1A-O	12	2	5	19
42Sp50	13	1	5	19

Tabelle 5-4 Putative Phosphorylierungsstellen der EF1A-Isoformen *Xenopus laevis*. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des NetPhos2.0 Servers durchgeführt (Blom, Gammeltoft und Brunak; 1999).

EF1A-S			EF1A-O		42Sp50	
Phos- phate	Molekular- masse	IEP	Molekular- masse	IEP	Molekular- masse	IEP
0	50234,5791	9,10	50146,7174	9,24	50659,5648	9,71
1	50312,5431	8,98	50224,6814	9,13	50737,5288	9,64
2	50390,5071	8,82	50302,6454	9,00	50815,4928	9,57
3	50468,4711	8,62	50380,6094	8,85	50893,4568	9,49
4	50546,4351	8,34	50458,5734	8,65	50971,4208	9,40
5	50624,3991	7,94	50536,5374	8,37	51049,3848	9,30
6	50702,3631	7,55	50614,5014	7,99	51127,3488	9,19
7	50780,3271	7,26	50692,4654	7,61	51205,3128	9,06
8	50858,2911	7,04	50770,4294	7,34	51283,2768	8,91
9	50936,2551	6,86	50848,3934	7,13	51361,2408	8,72
10	51014,2191	6,71	50926,3574	6,96	51439,2048	8,46
11	51092,1831	6,57	51004,3214	6,81	51517,1688	8,14
12	51170,1471	6,44	51082,2854	6,67	51595,1328	7,82
13	51248,1111	6,32	51160,2494	6,55	51673,0968	7,58
14	51326,0751	6,20	51238,2134	6,43	51751,0608	7,40
15	51404,0391	6,10	51316,1774	6,32	51829,0248	7,25
16	51482,0031	5,99	51394,1414	6,22	51906,9888	7,12
17	51559,9671	5,89	51472,1054	6,12	51984,9528	7,00
18	51637,9311	5,80	51550,0694	6,02	52062,9168	6,90
19	51715,8951	5,70	51628,0334	5,93	52140,8808	6,79
20	51793,8591	5,61				
21	51871,8231	5,52				
22	51949,7871	5,44				
23	52027,7511	5,36				
24	52105,7151	5,29				
25	52183,6791	5,22				
26	52261,6431	5,16				

Tabelle 5-5 Änderung der errechneten Molekularmassen und der dazugehörigen isoelektrischen Punkte der drei EF1A-Isoformen in Abhängigkeit von der Anzahl der Phosphatreste.

Mit Hilfe des Programms NCBI/BLAST Conserved Domains (Marchler-Bauer et al., 2005 und 2007; Marchler-Bauer und Bryant, 2004) konnten in den Aminosäuresequenzen drei Motivbereiche identifiziert werden, die charakteristisch für den Elongationsfaktor 1A sind: (1) ein Nukleotidphosphat-bindendes Motiv (ATP/GTP-bindende Kassette) am N-Terminus, (2) das sogenannte EF1A-II-Motiv (Translationsfaktor II ähnliche Superfamilie) im Mittelteil der Aminosäuresequenz und (3) die EF1A-III-Domäne (Translationsfaktor III Superfamilie) am C-Terminus des Proteins. Das Motiv (1) bindet alle Nukleotide, bevorzugt allerdings ATP und GTP. Er wurde in zahlreichen Proteinen identifiziert und wird in zwei Klassen unterteilt: die

Kinase-GTP-Klasse und die ASCE-Klasse (additional strand catalytic E). Das Motiv (II) besteht aus einer β -Faltblatt-Struktur und ist an der Erkennung der 3'-Enden der tRNA beteiligt. Es wurde auch in anderen Proteinen wie z.B. dem Elongationsfaktor G und dem Translationsinitiationsfaktor IF-2 identifiziert. Die Domäne (III) ist an der Aktivierung der GTP-Hydrolyse beteiligt. Sie ist in zahlreichen Elongationsfaktoren, in "peptide chain release factors" und in Proteinen der GT-1 -Familie der GTPasen (GTPBP1) vorhanden (Marchler-Bauer et al., 2007). Die beschriebenen Motive wurden bei allen drei Isoformen identifiziert und sind in Abbildung 5-27 gezeigt.

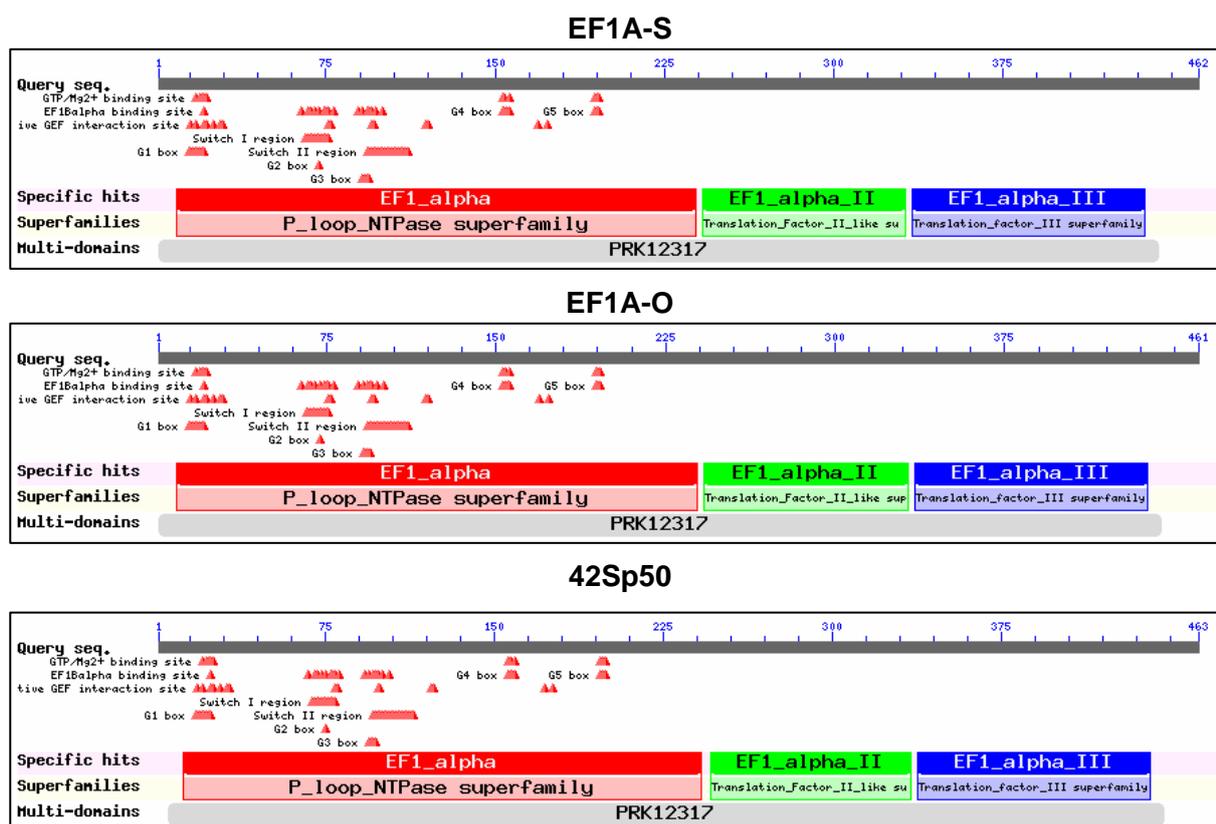


Abbildung 5-27 Proteindomänen der EF1A-Isoformen (von oben nach unten: EF1A-S; EF1A-O; 42Sp50). Die Analysen wurden mit Hilfe des Programms NCBI/BLAST Conserved Domains (Marchler-Bauer et al., 2005 und 2007; Marchler-Bauer und Bryant, 2004) durchgeführt. Die Isoformen weisen identische Proteindomänen auf: eine ATP-bindende, ein EF1A-II-Motiv und eine EF1A-III-Domäne.

5.5.3 Vergleich der EF1A-Familie in verschiedenen Spezies

Neben *Xenopus* weisen zahlreiche andere Spezies ebenfalls mehrere EF1A-Gene auf. Pflanzen besitzen bis zu 15, in Pilzen und der Bäckerhefe existieren dagegen nur zwei EF1A-Gene. Bei *Drosophila* wurden zweientwicklungsspezifisch exprimierte Gene entdeckt (Hovemann et al., 1988). Bei Säugern wurden ebenfalls zwei EF1A-Gene identifiziert, die aktiv transkribiert und als EF1A-1 bzw. EF1A-2 bezeichnet werden (Infante et al., 2008). Ein DNA- und Protein-Sequenzvergleich der *Xenopus* EF1A-Isoformen mit den zwei humanen EF1A-Varianten, als Vertreter der Säuger EF1A-Proteine, ist in der folgenden Tabelle gezeigt. Der Vergleich wurde mit dem NCBI/BLAST (*Algorithm*: blastp) durchgeführt.

	human EF1A-1 (Strausberg et al., 2002)		human EF1A-2 (Knudsen et al., 1993)	
	DNA	Protein	DNA	Protein
<i>Xenopus</i> EF1A-S	84%	95%	78%	90%
<i>Xenopus</i> EF1A-O	79%	91%	75%	89%
<i>Xenopus</i> 42Sp50	74%	71%	74%	72%
Identitäten in %				

Tabelle 5-6 Identitätsvergleich der DNA- bzw. Proteinsequenzen der *Xenopus* EF1A-Isoformen mit den beiden humanen Varianten des Proteins

Das humane EF1A-1 wird ubiquitär in allen untersuchten Geweben exprimiert, in Muskel- und Herzgewebe sind jedoch nur sehr geringe Mengen dieses Proteins vorhanden. EF1A-2 hingegen besitzt ein eingeschränktes Expressionsprofil und ist vor allem in Muskel-, Gehirn und Herzgewebe nachweisbar (Knudsen et al., 1993; Infante et al., 2008). *Xenopus* EF1A-S weist die größte Sequenzübereinstimmung zu humanem EF1A-1 auf (95% auf Aminosäuresequenz-Ebene, Tabelle 5-6). Auch *Xenopus* EF1A-O zeigt eine erstaunlich hohe Identität (89%, Tabelle 5-6) zum menschlichen EF1A-2-Protein in Anbetracht des doch sehr großen evolutionären Abstands. Das Protein 42Sp50 weist die geringsten Sequenzübereinstimmungen zu den beiden EF1A-Varianten der Säuger auf. Entsprechende Gene konnten nur in Amphibien und Knochenfischen identifiziert werden und scheinen bei Säugern zu fehlen (Infante et al., 2008). Die Vermutung lag nahe, dass die drei EF1A-Isoformen ebenfalls unterschiedliche Expressionsprofile aufweisen, wofür auch einige Literaturangaben sprechen. Im nächsten Versuch wurden deshalb durch RT-PCR-Experimente mRNA-Expressionsprofile für jede EF1A-Isoform ermittelt.

5.6 Expression der EF1A-Genfamilie während der Oogenese und in verschiedenen Geweben von *Xenopus laevis* mittels RT-PCR

Mit proteinbiochemischen Experimenten konnte nicht geklärt werden, welche EF1A-Isoformen während der Oogenese exprimiert werden und in den Nuage enthalten sind. Mit Hilfe der Reversen Transkriptions-(RT)-PCR sollte daher ein Expressionsprofil der EF1A-Genfamilie auf mRNA-Ebene während der Oogenese, der Embryogenese und in verschiedenen Geweben und Kulturzellen erstellt werden.

Dafür wurden für jede EF1A-Isoform jeweils ein 5´- bzw. 3´-Primer entworfen (Tabelle 5-7). Die Primerpaare sind im Anhang unter 9.1 aufgelistet und wurden so ausgewählt, dass sie spezifisch nur an jeweils eine EF1A-Isoform binden konnten. Die amplifizierten Fragmente unterschieden sich außerdem in ihrer Länge und konnten so im DNA-Agarosegel klar getrennt werden. Für die 3´-Primer wurden Sequenzen direkt hinter dem jeweiligen Stoppcodon gewählt und unterschieden sich deutlich in ihrer Sequenz voneinander. Die 5´-Primer wurden ebenfalls so ausgesucht, dass sie nur spezifisch an eine Isoform binden konnten (Anhang 9.1 und Tabelle 5-7). Die Primerpaare wurden zunächst auf ihre Spezifität für die jeweilige EF1A-Isoform getestet. Als Matrize dienten drei Plasmide, in die jeweils eine vollständige EF1A-Isoformsequenz inseriert war. Es wurden Positiv- und Negativkontrollen für jedes Primerpaar durchgeführt. Die Amplifikate der drei Isoformen sind in Abbildung 5-28 graphisch dargestellt.

EF1A-Isoform	Primerpaare	Länge (bp)
EF1A-S	BC04F/BC04R	907
EF1A-O	BC07F/BC07R	756
42Sp50	Z19F/Z19R	613

Tabelle 5-7 Nomenklatur der spezifischen Primerpaare, die für die RT-PCR der *Xenopus* EF1A-Isoformen verwendet wurden und die dazugehörige Länge der amplifizierten DNA-Fragmente (Details in Kapitel 9.1).

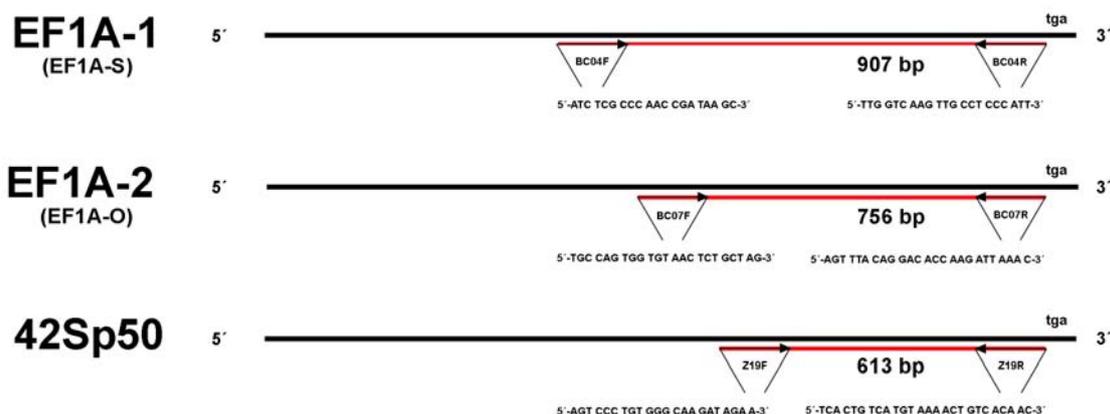


Abbildung 5-28 Graphische Erklärung zur Synthese der spezifischen DNA-Fragmente, die durch die jeweiligen spezifischen Primerpaare in den RT-Experimenten amplifiziert wurden (Abbildung 5-29). Die Amplifikate unterscheiden sich in ihrer Länge und konnten deshalb der jeweiligen Isoform zugeordnet werden.

Die cDNA für einen RT-PCR-Ansatz wurde mit Oligo(dT)-Primern aus 2 µg isolierter Gesamt-RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase synthetisiert. Eine PCR-Reaktion wurde mit jeweils einem der oben genannten Primerpaare durchgeführt (Tabelle 5-7). Anhand eines DNA-Agarosegels und Ethidiumbromid wurde überprüft, ob bestimmte Gewebe und Kulturzellen die untersuchte mRNA enthielten. Die Ergebnisse dieser Expressionsanalyse sind in Abbildung 5-29 gezeigt. Als Kontrolle wurden RT-PCRs mit HMGA2-Primern durchgeführt. Diese mRNA des high mobility group-Proteins wird in allen getesteten *Xenopus*-Geweben exprimiert (Hock et al., 2006). Die Expressionsanalyse der EF1A-Isoformen zeigte, dass EF1A-S bzw. -O in den untersuchten Geweben exprimiert wurden (Abbildung 5-29). 42Sp50-mRNA konnte in allen getesteten Oozyten- und Embryonalstadien, in Hoden- und Hirngewebe nachgewiesen werden. In Lebergewebe und in Kulturzellen (hier XTC) war dagegen keine mRNA dieser Isoform vorhanden. In somatischem Herzgewebe konnte ebenfalls nur mRNA von EF1A-S und -O und keine 42Sp50-mRNA nachgewiesen werden (keine Abbildung). Somit ist mRNA von 42Sp50 in Keimzellen und Embryonen, aber nicht in somatischen Standardzellen wie Leberzellen und Kulturzellen nachweisbar. Eine Ausnahme stellte Hirngewebe dar, das ebenfalls 42Sp50-mRNA exprimiert. Diese Beobachtung ist keine Besonderheit, da bereits zahlreiche andere Gene identifiziert wurden, die ausschließlich in Keimzellen und im Hirngewebe exprimiert werden. Dazu gehört z.B. das *Spnr*-Gen, dessen mRNA nur in Ovar-, Hoden- und Hirngewebe nachweisbar ist (Schumacher et al., 1995).

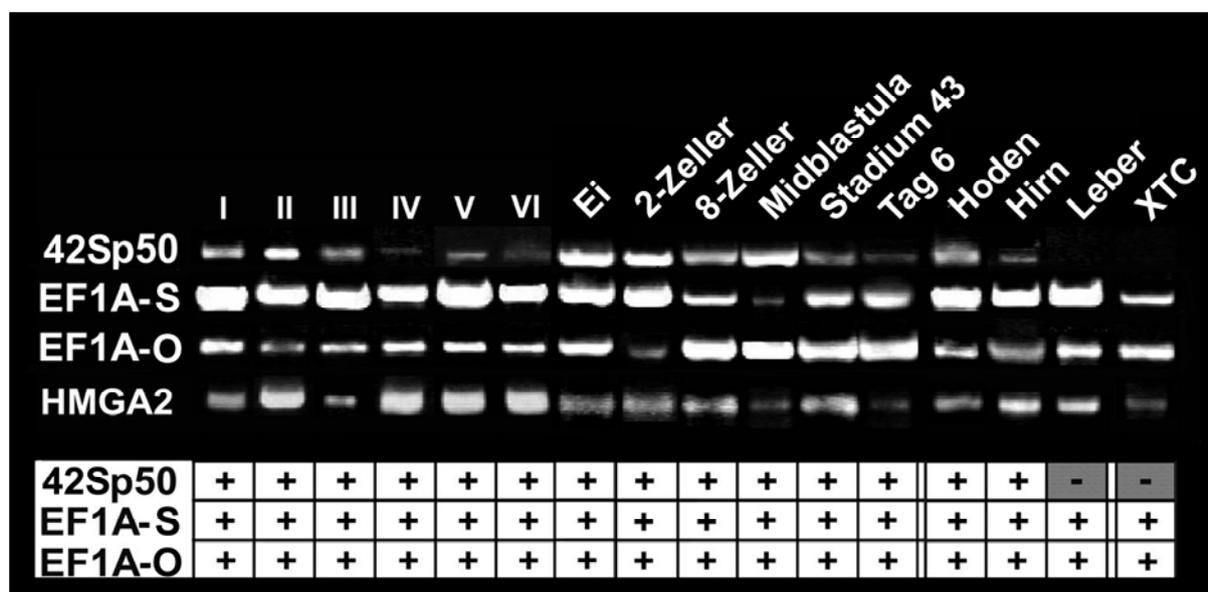


Abbildung 5-29 Expression der *Xenopus laevis* EF1A-Genfamilie während der Oogenese, der frühen Embryonalentwicklung und in verschiedenen Geweben und somatischen Zellen. Mit jeweils 2µg isolierter Gesamt-RNA pro Probe wurde eine RT-PCR-Analyse durchgeführt. Die Transkriptionsprodukte von EF1A-S und EF1A-O waren in allen untersuchten Zellen vorhanden, wohingegen 42Sp50-mRNA in Lebergewebe und XTC-Zellen nicht nachweisbar war. Als Kontrolle dienten HMGA2 spezifische Primer. Die Ergebnisse sind im unteren Teil der Abbildung schematisch zusammengefasst.

Die Ergebnisse, vor allem die der Oozytenstadien können nicht quantitativ gewertet werden. Es wurde zwar für jeden Ansatz die gleiche Menge isolierter Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben, die Zusammensetzung unterscheidet sich jedoch in den Oozytenstadien enorm voneinander. So enthalten Stadium VI Oozyten im Vergleich zum Stadium I ein Vielfaches an rRNA. Beim Einsatz gleicher Mengen isolierter Gesamt-RNA ist demnach in reifen Oozyten weitaus weniger mRNA/Ansatz enthalten, demnach fällt die Menge an synthetisierter cDNA geringer aus und die Intensität der Bande im Agarosegel erscheint schwächer. Für eine quantitative Expressionsanalyse müsste eine Real-time-PCR durchgeführt werden, was aufgrund der schlechten Vergleichbarkeit der einzelnen Oozytenstadien miteinander aber weniger aussagekräftig wäre. Es wurde deshalb davon abgesehen.

Literaturangaben besagen, dass *Xenopus* EF1A-S genau wie Säuger EF1A-1 in somatischen Geweben des adulten Tieres und des Embryos exprimiert wird und in Keimzellen kaum existent ist. EF1A-O wurde dagegen hauptsächlich in Keimzellen und in Embryonen bis zur Neurulation beschrieben (Abdallah et al., 1991; Dje et al., 1990; Krieg et al., 1989). Die hier durchgeführte Expressionsanalyse zeigt jedoch, dass sowohl EF1A-S als auch EF1A-O ubiquitär in allen getesteten *Xenopus*-Geweben exprimiert werden (Abbildung 5-29). Somit kann bei EF1A-O nicht mehr von einer oozytenspezifischen Variante gesprochen werden. Es wird daher vorgeschlagen, *Xenopus* EF1A-S mit humanem EF1A-1 (95% Identität), und *Xenopus* EF1A-O mit humanem EF1A-2 (89% Identität) gleichzusetzen. 42Sp50 fehlt bei Säugern und wurde bisher nur bei Amphibien und Fischen nachgewiesen (Infante et al., 2008). Für diese divergierende EF1A-Isoform (72% Identität) wird die Bezeichnung 42Sp50 beibehalten.

alte Nomenklatur	neue Nomenklatur
EF1A-S	EF1A-1
EF1A-O	EF1A-2

Tabelle 5-8 Einführung einer neuen Nomenklatur für zwei Isoformen des *Xenopus* EF1A.

5.7 Herstellung verschiedener Fusionskonstrukte der drei *Xenopus* EF1A-Isoformen mit fluoreszierenden Proteinen

Um die Verteilung der *Xenopus* EF1A-Isoformen in somatischen Zellen und Oozyten zu untersuchen, wurden verschiedene Fusionsproteine zwischen EF1A und fluoreszierenden Proteinen angefertigt (Tabelle 5-9). Das EGFP wurde sowohl N- als auch C-terminal an das Wirtsprotein angehängt, um einen möglichen Einfluss auf die Lokalisation des Fusionsproteins innerhalb der Zelle zu erkennen.

EF1A-1	EF1A-2	42Sp50
EGFP-EF1A-1	EGFP-EF1A-2	EGFP-42Sp50
EF1A-1-EGFP	EF1A-2-EGFP	42Sp50-EGFP
		42Sp50-MDsRed
		42Sp50-mRFP

Tabelle 5-9 Fusionskonstrukte der EF1A-Isoformen. Die Fluoreszenzproteine wurden N- und C-terminal an das jeweilige EF1A angehängt, dargestellt durch den Farbcode.

EF1A-1, EF1A-2 und 42Sp50 wurden über die Restriktionsschnittstellen EcoRI/EcoRI in die multiple Klonierungsstelle der eukaryontischen Expressionsvektoren pEGFP-N und pEGFP-C kloniert. Durch dieses pEGFP-Vektorsystem wurde an den Aminoterminus (C-Vektor) bzw. den Carboxyterminus (N-Vektor) des zu untersuchenden Proteins ein grün fluoreszierendes Protein („enhanced-GFP“) angehängt, das nach der Transfektion in Zellkulturzellen als Fusionsprotein exprimiert wurde. Das rot fluoreszierende MDsRed-Konstrukt von 42Sp50 wurde über die Restriktionsschnittstellen EcoRI/EcoRI in die multiple Klonierungsstelle eingefügt. Zunächst wurde das Leseraster des Vektors, durch einen Agel-Verdau mit anschließender Zugabe des KLENOW-Fragments zum Auffüllen der „sticky-ends“ und Religation, verändert. Des Weiteren wurde ein rot fluoreszierendes Protein von 42Sp50 durch die Klonierung der kompletten cDNA-Sequenzen über die Restriktionsschnittstelle EcoRI/EcoRI in den eukaryotischen Expressionsvektor pmRFP hergestellt.

5.8 Lokalisierung der EF1A-Fusionsproteine in Kulturzellen

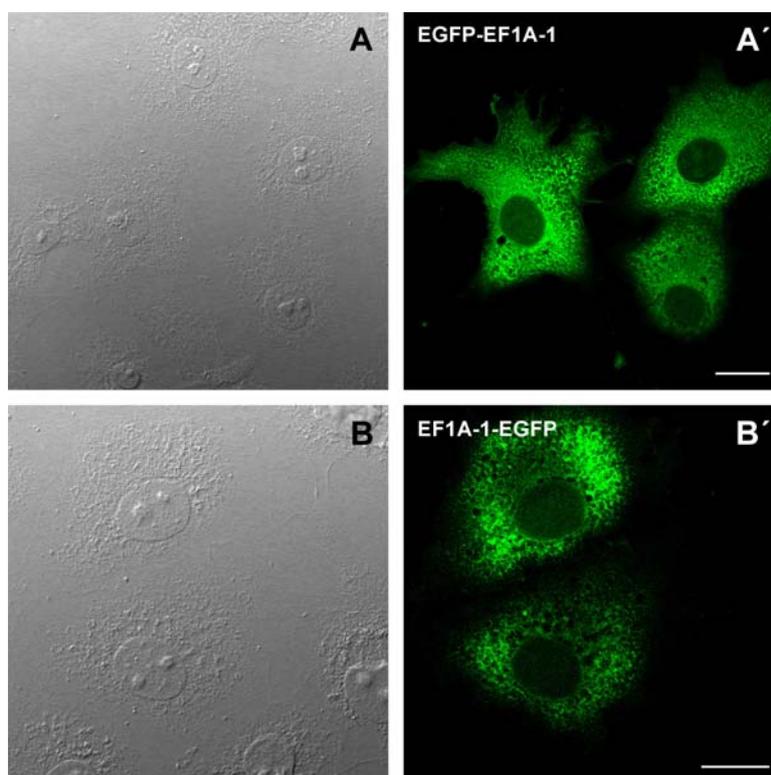


Abbildung 5-30 Verteilung von EGFP-EF1A-1 (A') und EF1A-1-EGFP (B') nach Expression in COS7-Zellen. Beide Fusionsproteine sind gleichmäßig im Zytoplasma verteilt. Die entsprechende Interferenzkontrastaufnahme der Zellen ist links gezeigt. Eichstriche: 20µm.

Für die Expression der grün fluoreszierenden EF1A-1-Proteine wurden Säuger COS7- und *Xenopus* A6-Zellen transfiziert und nach 24 Stunden mit Formaldehyd fixiert. Abgebildet sind hier nur die Versuche mit COS7-Zellen, da die Transfektionsrate bei diesen Zellen wesentlich höher lag als bei A6-Zellen. Die Verteilungsmuster aller Isoformen waren in beiden Zelllinien identisch. Die Untersuchung der Zellen mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) zeigte eine gleichmäßige Verteilung der EF1A-1 Fusionsproteine im Zytoplasma (Abbildung 5-30). Es war kein Signal im Nukleoplasma zu erkennen. Das Verteilungsmuster von EF1A-1 mit N- oder C-terminalem EGFP war identisch, so dass davon ausgegangen wurde, dass das relativ große EGFP-Protein keinen Einfluss auf die Lokalisierung des Elongationsfaktors ausübte (Abbildung 5-30). Dieses Ergebnis stimmt mit der Verteilung des Antigens von IV'D4 in *Xenopus*zellen überein (Abbildung 5-10).

Die Lokalisierung der EF1A-2 Fusionsproteine in COS7- und A6-Zellen zeigte das gleiche Markierungsmuster wie das der EF1A-Konstrukte. Die Proteine waren gleichmäßig im Zytoplasma verteilt, im Zellkern war erwartungsgemäß, aufgrund des Fehlens eines NLS, kein Signal zu beobachten (Abbildung 5-31). Diese Beobachtungen entsprechen der Lokalisierung von endogenem EF1A in Kulturzellen unterschiedlicher Spezies (Abbildung 5-10). Die Schlussfolgerung der Beobachtungen lautet demnach: in Kulturzellen ist EF1A ein homogen im Zytoplasma verteiltes Protein, das aus dem Zellkern ausgeschlossen ist (Minella et al., 1996; Bohnsack et al., 2002).

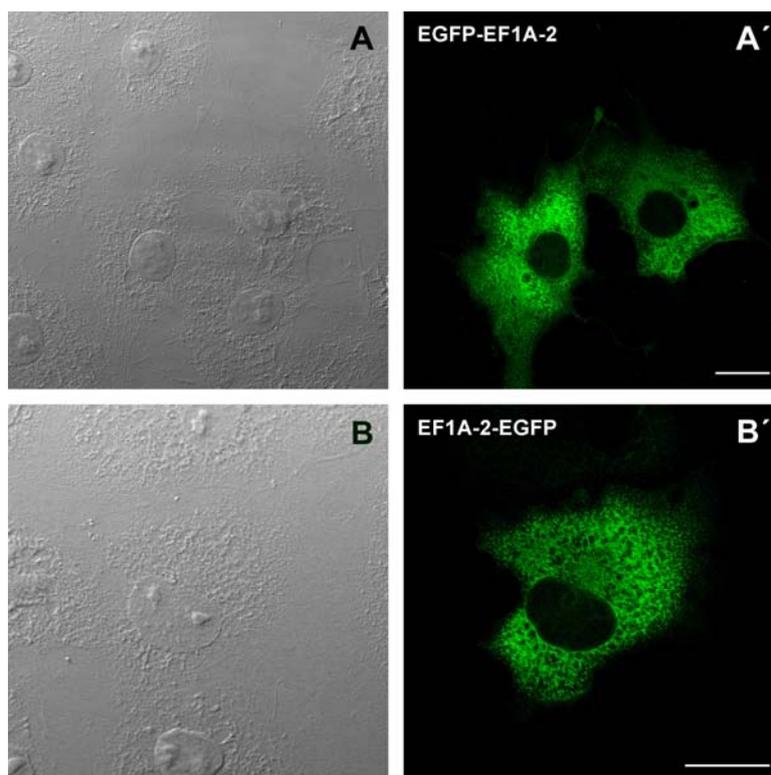


Abbildung 5-31 Verteilung von EGFP-EF1A-2 (A') und EF1A-2-EGFP (B') nach Expression in COS7-Zellen. Die Fusionsproteine sind gleichmäßig im Zytoplasma verteilt. Eichstriche: 20 μ m.

Von 42Sp50 wurden, neben den grün fluoreszierenden, auch rot fluoreszierende Konstrukte in COS7- und A6-Zellen transfiziert. Die Ergebnisse wurden mit dem CLSM ermittelt und sind in Abbildung 5-32 und 5-33 dargestellt. Gezeigt sind auch hier nur die Ergebnisse der Transfektionen in COS7-Zellen, die jedoch identisch zu jenen in A6-Zellen waren.

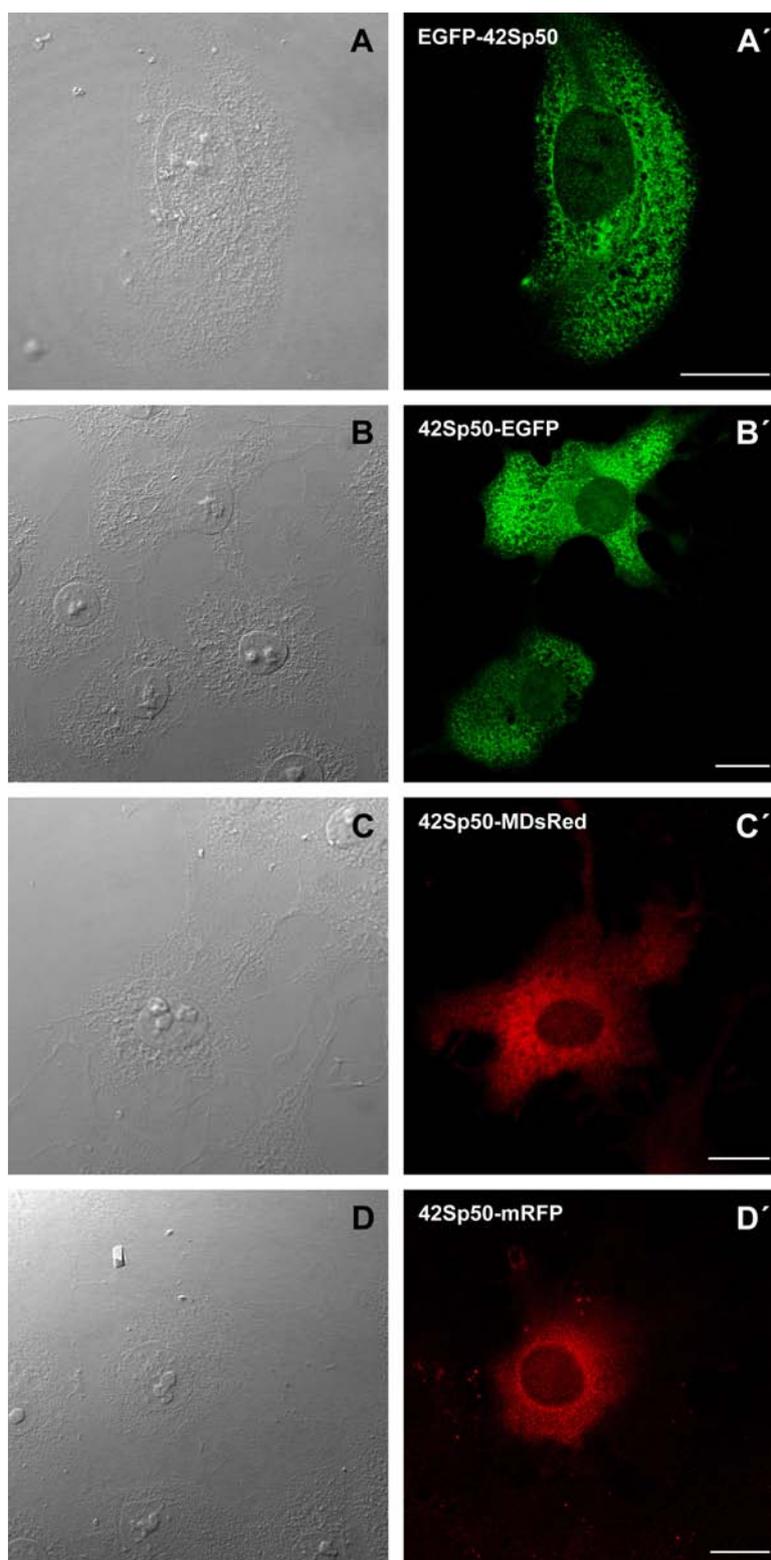


Abbildung 5-32 Verteilung von EGFP-42Sp50 (A'), 42Sp50-EGFP (B'), 42Sp50-MDsRed (C') und 42Sp50-mRFP (D') nach der Transfektion in COS7-Zellen. Alle Fusionsproteine sind gleichmäßig im Zytoplasma verteilt. Die jeweiligen Interferenzkontrastaufnahmen sind auf der linken Seite abgebildet. Eichstriche: 20µm.

Alle fluoreszierenden 42Sp50-Konstrukte waren homogen im Zytoplasma verteilt, wobei im Zellkern eine sehr schwache Nukleoplasmafärbung erkennbar war (Abbildung 5-32). Da alle Fusionsproteine, unabhängig von dem angehängten Fluoreszenzprotein und dessen Orientierung, das gleiche Muster ergaben, ist eine Beeinflussung der 42Sp50-Lokalisation durch das Reporterprotein eher unwahrscheinlich.

In ca. 15% der Fälle konnte in transfizierten Zellen ein schwaches, nukleoläres Fluoreszenzsignal von 42Sp50 beobachtet werden (Abbildung 5-33). Auf diese Beobachtung wird unter 5.10.5 und 5.10.6 näher eingegangen. Die Beobachtungen wurden auch an lebenden Zellen vorgenommen und stimmten mit den hier beschriebenen Ergebnissen überein (keine Abbildungen).

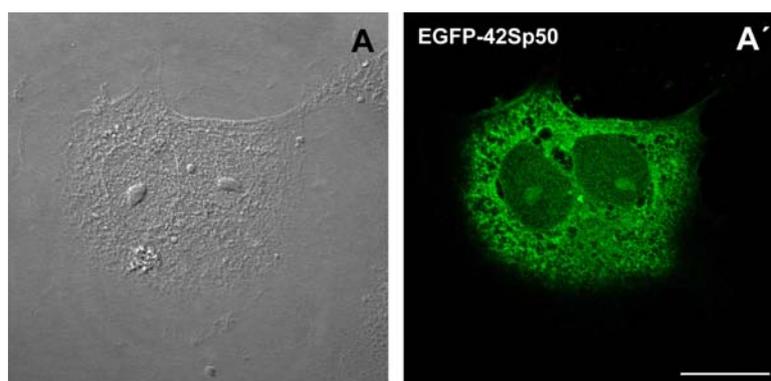


Abbildung 5-33 Schwaches nukleoläres Fluoreszenzsignal von 42Sp50-EGFP, das in einigen Fällen in transfizierten COS7-Zellen beobachtet wurde. Die DIC-Aufnahme ist auf der linken Seite abgebildet. Eichstrich: 20µm.

5.9 Lokalisation der EF1A-Fusionsproteine in prävitellogenen *Xenopus* Oozyten

Für die Expression der EF1A-Fusionsproteine in Oozyten war es nötig, mRNA in vitro herzustellen und diese in das Zytoplasma zu mikroinjizieren. Daher wurden vollständig kodierende Sequenzen der Fusionsproteine aus dem jeweiligen eukaryotischen Expressionsvektor (z.B. pEGFP) in den Bluescript II-Vektor kloniert. Dieser Vektor eignete sich aufgrund seines T7-RNA-Promotors für die in vitro Synthese von mRNA, um diese im Anschluss in Oozyten zu injizieren.

Zunächst wurde die Verteilung jeder EF1A-Isoform untersucht. Dazu wurden lebende, durchsichtige Oozyten unter dem konfokalen Mikroskop beobachtet. Dabei wurde festgestellt, dass alle drei Proteine homogen im Zytoplasma verteilt und weitgehend vom Zellkern ausgeschlossen waren (Abbildung 5-34). Eine Anreicherung der fluoreszierenden Proteine um den Zellkern herum, der die Bildung von Nuage widerspiegeln könnte, wurde in keiner der injizierten Oozyten beobachtet. Weiterhin konnte keine Anreicherung in den Bbs beobachtet werden. Meist stellte diese Struktur sogar eine strikte Ausschlusszone des GFP-Signals dar.

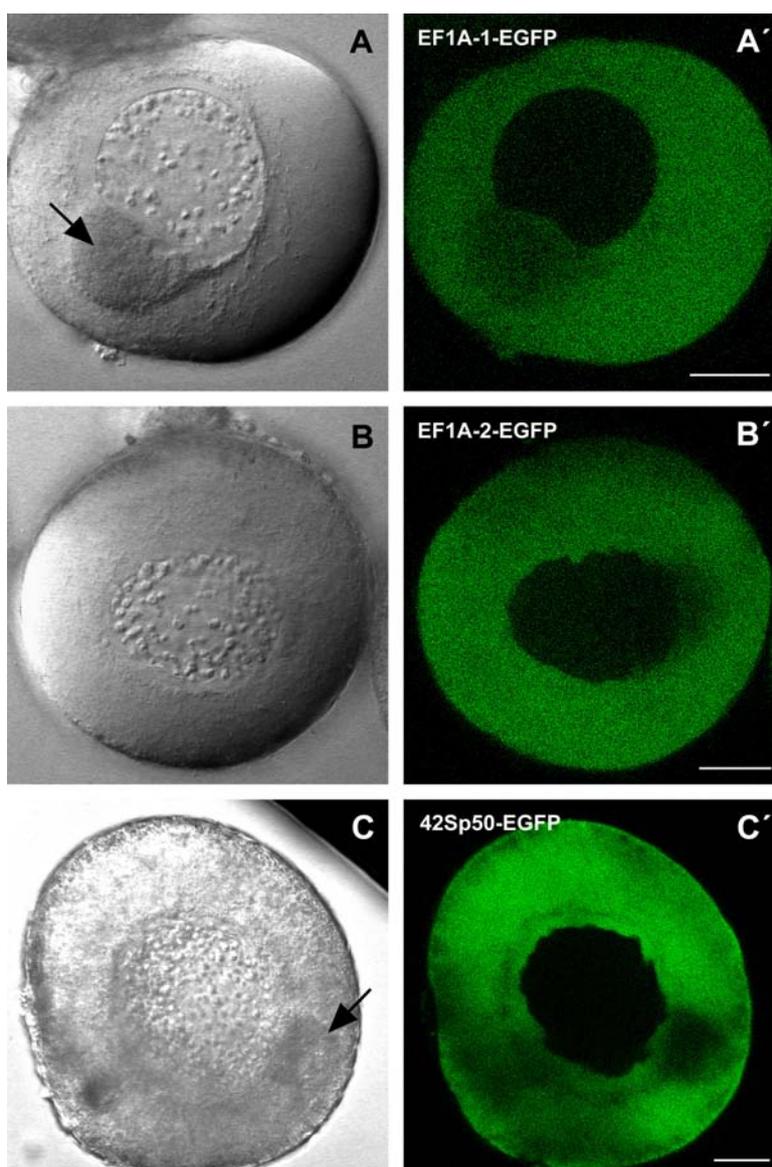


Abbildung 5-34 Expression der EF1A-Isoformen nach der Mikroinjektion von mRNA in lebende, prävitellogene *Xenopus* Oozyten (24 Stunden Inkubation bei 20°C). Alle EGFP-Fusionsproteine sind homogen im gesamten Zytoplasma verteilt und vom Zellkern ausgeschlossen. Der Bb ist nicht markiert (Pfeil in A und C). Die korrespondierenden Interferenzkontrastaufnahmen sind unter (A-C) abgebildet. Eichstriche: 50µm.

5.10 Analyse der in vivo-Interaktionen zwischen den EF1A-Isoformen und 42Sp43

Wie bereits beschrieben, ist das Protein 42Sp50 Bestandteil des 42S RNPs, das in prävitellogenen Oozyten von Amphibien und Knochenfischen zur Speicherung von tRNA und 5S rRNA dient (Malcolm und Sommerville, 1977; Denis et al., 1980). Die zweite Proteinkomponente stellt das TFIIIA-verwandte Zinkfingerprotein 42Sp43 dar (Joho et al., 1990). 42Sp43 bindet an 5S rRNA, wohingegen 42Sp50 tRNA-Moleküle bindet. Das 42S RNP setzt sich aus vier identischen Untereinheiten zusammen, die jeweils aus drei Molekülen tRNA, einem Molekül 5S rRNA, zwei Molekülen 42Sp50 und einem Molekül 42Sp43 bestehen (Abbildung 2-15 und Picard et al., 1980). Der 42S Komplex bzw. dessen Untereinheiten werden durch Interaktionen der beiden Proteinkomponenten zusammengehalten und stabilisiert, was unter anderem anhand von Versuchen mit 42S RNPs von *Triturus cristatus* gezeigt werden konnte (Malcolm und Sommerville, 1977). Es

könnte demnach möglich sein, dass 42Sp50 spezifisch während der Oogenese exprimiert wird, um die RNP-Bildung zu stabilisieren, die für die Speicherung der 5S rRNA sowie der tRNAs essentiell ist. Somit wäre 42Sp50 eine EF1A-Isoform, die zur spezifischen Interaktion mit 42Sp43 zur Speicherung von 5S und tRNAs in Oozyten von Amphibien und Knochenfischen dienen würde.

5.10.1 Herstellung verschiedener Fusionskonstrukte von 42Sp43

Die EST-Sequenz des Klons IMAGp998H198491Q diente als Ausgangssequenz für alle Klonierungen von 42Sp43 und ist unter der Zugangsnummer M32473 bei GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) registriert. Wie bei allen Klonierungen dieser Arbeit, wurde die EST-Sequenz zunächst komplett durchsequenziert und im Anschluss in den pCR®2.1-TOPO® inseriert, der als Ausgangsvektor für alle weiteren Klonierungen diente. Die weiteren Klonierungsschritte erfolgten analog zu den 42Sp50-Konstrukten, die unter 5.7 beschrieben sind. Auch hierbei wurden verschiedene Fluoreszenzproteine an das Wirtsprotein angehängt, um einen möglichen Einfluss auf die Lokalisation des Fusionsproteins innerhalb der Zelle zu erkennen. Die 42Sp43-Fusionskonstrukte, die angefertigt wurden, sind in Tabelle 5-10 aufgelistet.

42Sp43
42Sp43-EGFP
42Sp43-MDsRed
42Sp43-mRFP

Tabelle 5-10 Fusionskonstrukte von 42Sp43. Die Fluoreszenzproteine sind C-terminal an das Protein angehängt und zusätzlich farblich passend unterlegt.

5.10.2 Lokalisation von 42Sp43-Konstrukten in COS7-Zellen

42Sp43 wurde als grün und rot fluoreszierendes Konstrukt in COS7-Zellen exprimiert. Wie in Abbildung 5-35 gezeigt, sind alle Fusionsproteine nahezu vollständig in den Nukleolen angereichert. Die Lokalisation von 42Sp43 in den Nukleolen wird vermutlich durch Bindung an die 5S rRNA verursacht. In Zellen, die 42Sp43 stark überexprimierten, war mitunter ein Signal im Nukleoplasma zu erkennen (keine Abbildung). Eine Bindung von 42Sp43 an zytoplasmatische Ribosomen konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Es war in keinem der Versuche ein Fluoreszenzsignal im Zytoplasma zu beobachten. Dies könnte damit zu erklären sein, dass in Ribosomen integrierte 5S rRNA nicht mit 42Sp43 interagieren kann, da die spezifischen Bindungsstellen durch ribosomale Proteine besetzt sind.

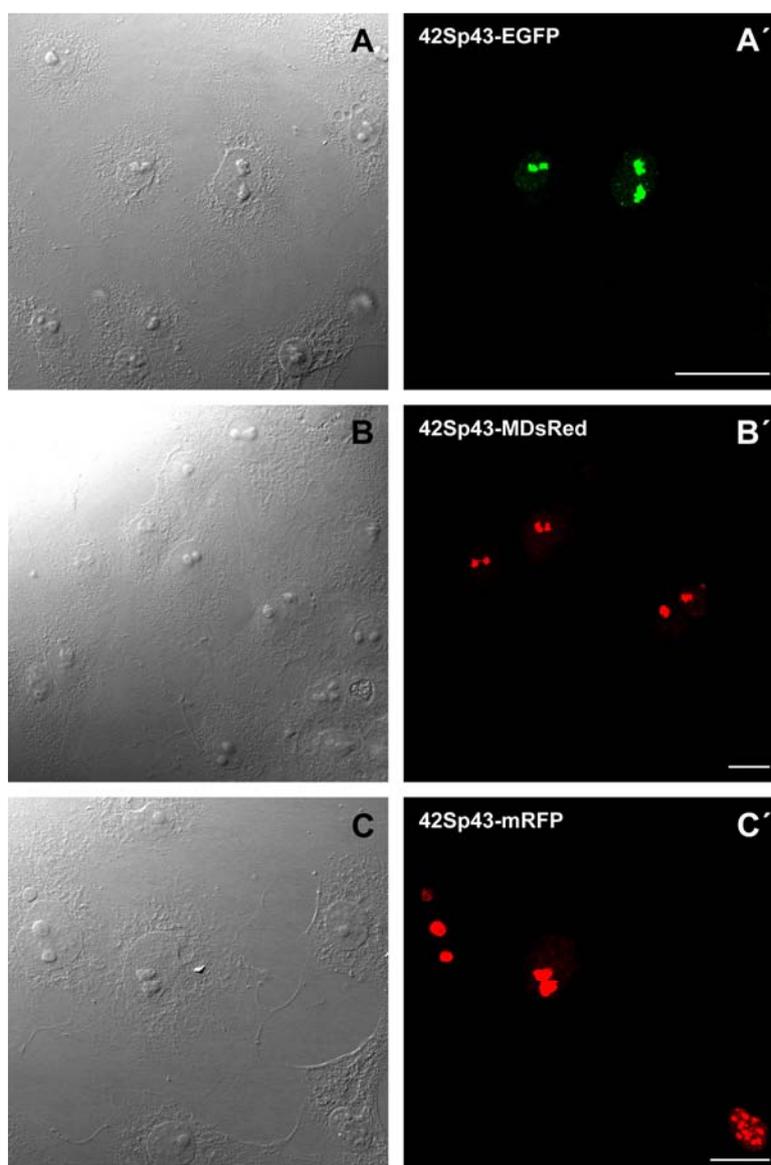


Abbildung 5-35 Verteilung verschiedener 42Sp43-Fusionskonstrukte nach Expression in COS7-Zellen. 42Sp43-EGFP (A'), 42Sp43-MDsRed (B') und 42Sp43-mRFP (C'). Alle Fusionsproteine von 42Sp43 sind in den Nukleolen angereichert, die im Interferenzkontrast (linke Spalte) deutlich erkennbar sind. Eichstrich: 20µm.

Der Antikörper 72B9 (Ewald et al., 1997) markiert Fibrillarin, ein Bestandteil der dichten fibrillären Komponente des Nukleolus. Er wurde für eine immunzytochemische Doppellokalisierung verwendet, um zu verdeutlichen, dass sich 42Sp43 tatsächlich in den Nukleolen anreichert. Die Abbildung 5-36 beweist deutlich, dass 42Sp43 (A'') mit Fibrillarin (A') in den Nukleolen kolokalisiert (A''').

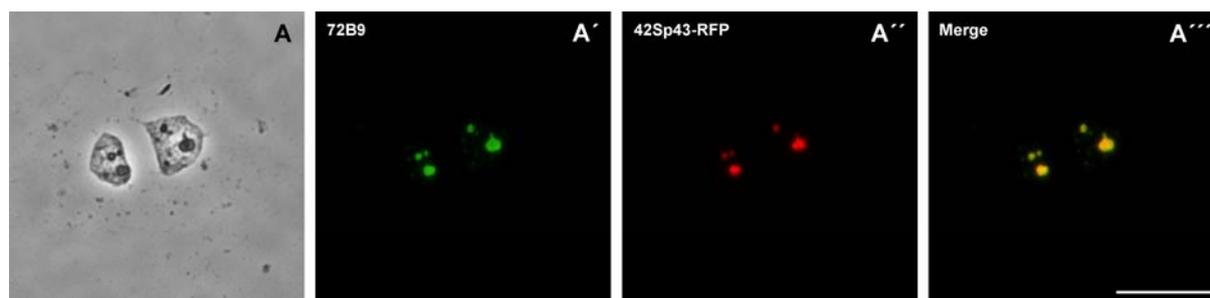


Abbildung 5-36 Kolokalisation von 42Sp43 (A'') und Fibrillarin (A') in den Nucleolen. Fibrillarin wurde durch den Antikörper 72B9 (Ewald et al., 1997) markiert. Die Kolokalisation (gelbes Signal) ist in (A''') dargestellt. Eichstrich: 20µm.

5.10.3 Lokalisation von 42Sp43-Fusionsproteinen in prävitellogenen *Xenopus* Oozyten

Durch mRNA-Injektion wurden fluoreszierende Fusionsproteine von 42Sp43 auch in prävitellogenen *Xenopus* Oozyten exprimiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-37 gezeigt.

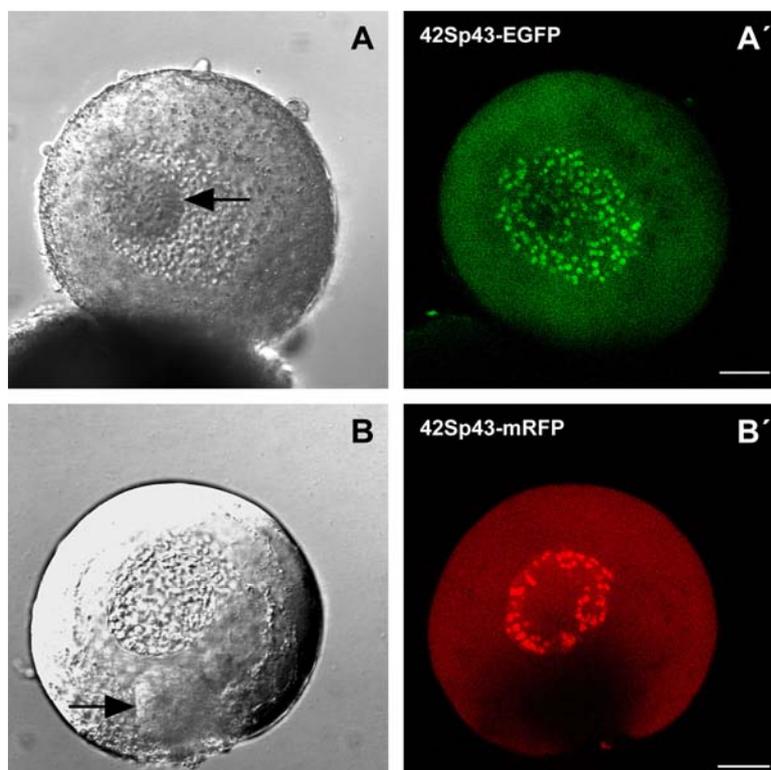


Abbildung 5-37 Expression von zwei unterschiedlich markierten 42Sp43-Fusionsproteinen in lebenden *Xenopus* Oozyten nach Mikroinjektion der entsprechenden mRNAs. Beide Fusionsproteine sind stark in den Nucleolen angereichert, wobei zusätzlich ein schwaches Signal im Nucleoplasma zu erkennen ist (A' und B'). Die DIC-Aufnahmen (linke Spalte) zeigen amplifizierte Nucleolen und die Bbs (Pfeile). Diese sind nicht durch Fluoreszenzsignale markiert (A' und B'). Eichstriche: 50µm.

42Sp43 ist in den amplifizierten Nucleolen angereichert, aber auch uniform in der gesamten Oozyte verteilt (A' und B'). Im Unterschied dazu war in somatischen Zellen keine Verteilung im Zytoplasma zu beobachten gewesen (Abbildung 5-35). Der Bb war negativ (Abbildung 5-37: A' und B', Pfeile in A und B).

5.10.4 Lokalisation von EGFP in prävitellogenen *Xenopus* Oozyten

Als Kontrolle wurde EGFP-mRNA in prävitellogene *Xenopus laevis* Oozyten injiziert. In Abbildung 5-38 ist zu erkennen, dass EGFP homogen im Zytoplasma und im Nukleoplasma verteilt vorliegt. Der Bb und die Nukleolen stellen allerdings eine Ausschlusszone für das Fluoreszenzsignal dar. Anhand dieses Versuchs konnte geschlossen werden, dass die spezifische Verteilung der Fusionsproteine, d.h. Kernausschluss der EF1A-Isoformen und nukleoläre Anreicherung von 42Sp43, die Eigenschaften der Wirtsproteine widerspiegelt und nicht von EGFP beeinflusst wird.

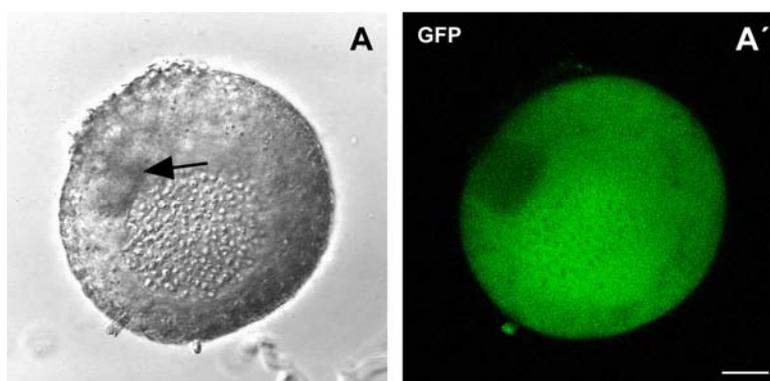


Abbildung 5-38 EGFP-mRNA wurde als Kontrolle in prävitellogene *Xenopus* Oozyten mikroinjiziert. EGFP ist homogen in der gesamten Zelle verteilt. Es kommt zu keiner Anreicherung in den Nukleolen und auch der Bb (Pfeil) ist vom Signal ausgeschlossen. Die Interferenzkontrastaufnahme ist unter (A), die Fluoreszenzaufnahme unter (A') abgebildet. Eichstrich: 50µm.

5.10.5 Koexpression der EF1A-Isoformen mit 42Sp43 in Kulturzellen

Das 42S RNP besteht, wie bereits erwähnt, aus den Proteinbestandteilen 42Sp50 und 42Sp43 (Picard et al., 1980). Über die Interaktionen zwischen den beiden Proteinen ist wenig bekannt, lediglich aus Versuchen mit isolierten 42S RNPs aus *Triturus cristatus* wird vermutet, dass Wechselwirkungen zwischen 42Sp43 und -p50 existieren (Kloetzel, Whitfield and Sommerville, 1981). Um mögliche Interaktionen nachzuweisen, wurden Doppeltransfektionen in COS7- und A6-Zellen durchgeführt.

Die Proteine des 42S RNPs werden in somatischen Zellen nicht exprimiert. Daher drängten sich folgende Fragen auf. Zunächst einmal sollte ermittelt werden, was passieren würde, wenn beide Proteine gleichzeitig in Kulturzellen exprimiert würden. Interagiert 42Sp50, im Gegensatz zu den anderen EF1A-Varianten, spezifisch mit 42Sp43? Hat dies einen Einfluss auf die räumliche Verteilung der Proteine und lassen sich dadurch eventuell sogar Nuage-Strukturen induzieren?

Falls sich eine spezifische Interaktion zwischen 42Sp43 und 42Sp50 bewahrheiten sollte, wäre eine funktionelle Erklärung für die keimzellspezifische Proteinexpression erstmalig möglich.

Als Kontrollen wurden Kulturzellen zunächst mit DNA der Fusionskonstrukte von 42Sp43 und jeweils einer Isoform von EF1A in die Zellen transfiziert. Abgebildet wurden hier ebenfalls nur die Versuche mit COS7-Zellen, die aber mit den Ergebnissen an A6-Zellen übereinstimmen.

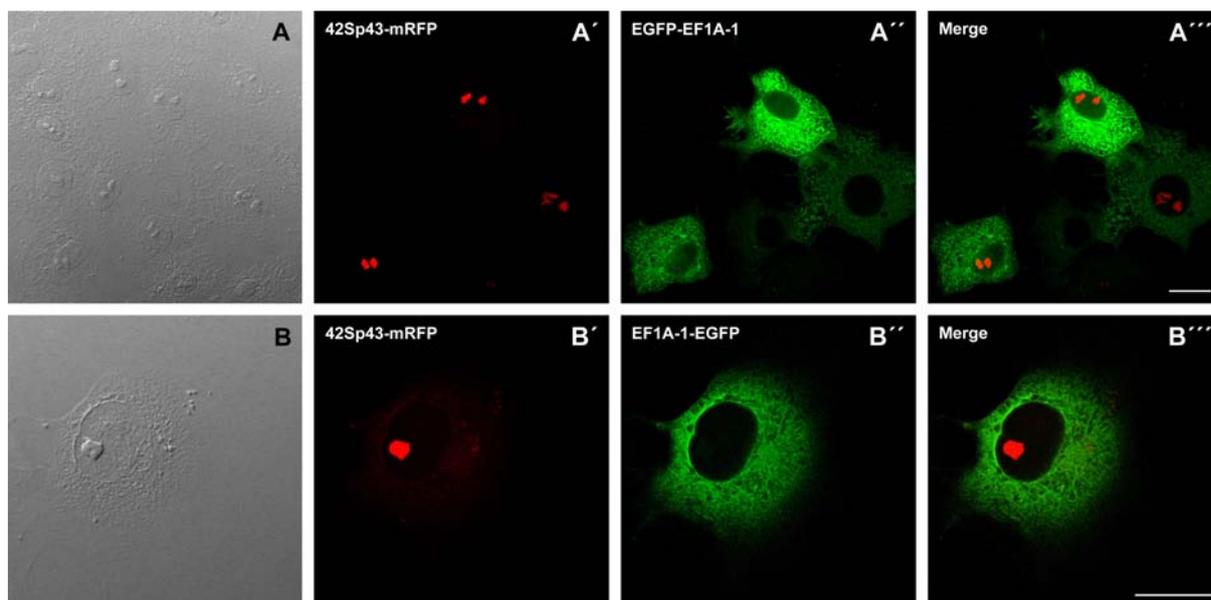


Abbildung 5-39 Expression von 42Sp43 und EF1A als rot und grün fluoreszierende Proteine in COS7-Zellen. EGFP-EF1A-1 (A'') und EF1A-1-EGFP (B'') sind homogen im Zytoplasma verteilt. 42p43-mRFP (A' und B') ist in den Nukleolen lokalisiert. Die korrespondierenden DIC-Aufnahmen der Zellen sind ganz links, die Überlagerungen der Abbildungen (Merge) ganz rechts dargestellt. Eichstriche: 20µm.

Zwischen 42Sp43 und EF1A-1 wurden keine bzw. nur sehr schwache Interaktionen festgestellt. Beide Proteine lokalisierten bei Doppeltransfektionen weitgehend identisch zur Einzeltransfektion. EF1A-1 ist gleichmäßig im Zytoplasma verteilt, während 42Sp43 in den Nukleolen angereichert ist (Abbildung 5-39). Verdeutlicht wurde das Ergebnis durch Überlagerung beider Fluoreszenzsignale, wobei keine Überlappung der Signale (gelber Farbton) zu erkennen ist (Abbildung 5-39, Merge).

Das gleiche Ergebnis wurde bei der Koexpression der Fusionsproteine von 42Sp43 und EF1A-2 erzielt. Auch hier blieb die Lokalisierung beider Proteine, im Vergleich zur getrennten Expression, weitgehend unverändert (Abbildung 5-40). Ein völlig anderes Ergebnis erbrachte jedoch die Doppelexpression von 42Sp43 und 42Sp50.

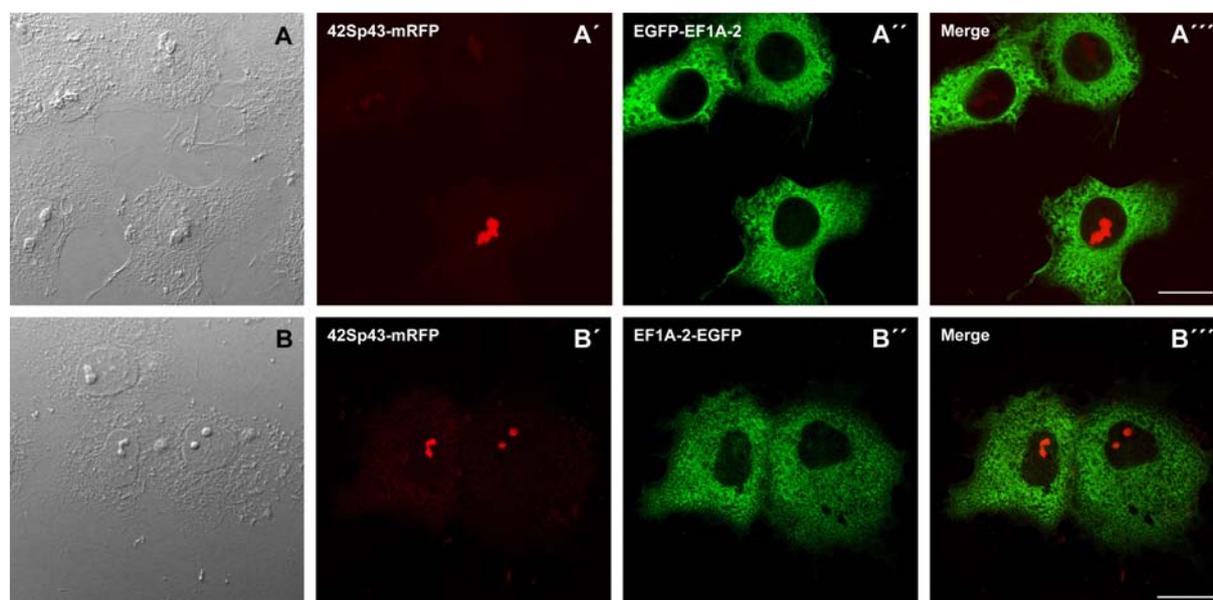


Abbildung 5-40 Expression von 42Sp43 und EF1A-2 als rot und grün fluoreszierende Proteine in COS7-Zellen. EGFP-EF1A-2 (A'') und EF1A-2-EGFP (B'') sind homogen im Zytoplasma verteilt. 42Sp43-mRFP (A' und B') ist in den Nukleolen lokalisiert. Die korrespondierenden Interferenzkontrastaufnahmen der Zellen sind ganz links, die Überlagerungen der Abbildungen (merge) ganz rechts dargestellt. Eichstriche: 20µm.

Die folgende Tabelle 5-11 listet die durchgeführten Doppeltransfektionen auf.

42Sp43	42Sp50	Abbildung
42Sp43-mRFP	EGFP-42Sp50	5-40
42Sp43-mRFP	42Sp50-EGFP	
42Sp43-EGFP	42Sp50-mRFP	5-41
42Sp43-MDsRed	42Sp50-EGFP	
42Sp43-EGFP	42Sp50-MDsRed	

Tabelle 5-11 Koexpression von verschiedenen Fusionskonstrukten von 42Sp43 und 42Sp50 in COS7-Zellen.

Die Ergebnisse der Koexpression von 42Sp43 und 42Sp50 sind in den Abbildungen 5-41 und 5-42 gezeigt. Es kam dabei zu einer deutlichen Umverteilung von 42Sp50 vom Zytoplasma in die Nukleolen, was auf einer Interaktion zwischen den beiden Proteinen beruhen muss (gelbes Signal in 5-41: A''' und B'''). Offenbar wurde 42Sp50 „huckepack“ von 42Sp43 in die Nukleolen transportiert. Es sollte betont werden, dass die Umverteilung in den Nukleolus in diesem Umfang nur bei 42Sp50 und nicht bei den anderen beiden EF1A-Varianten beobachtet wurde.

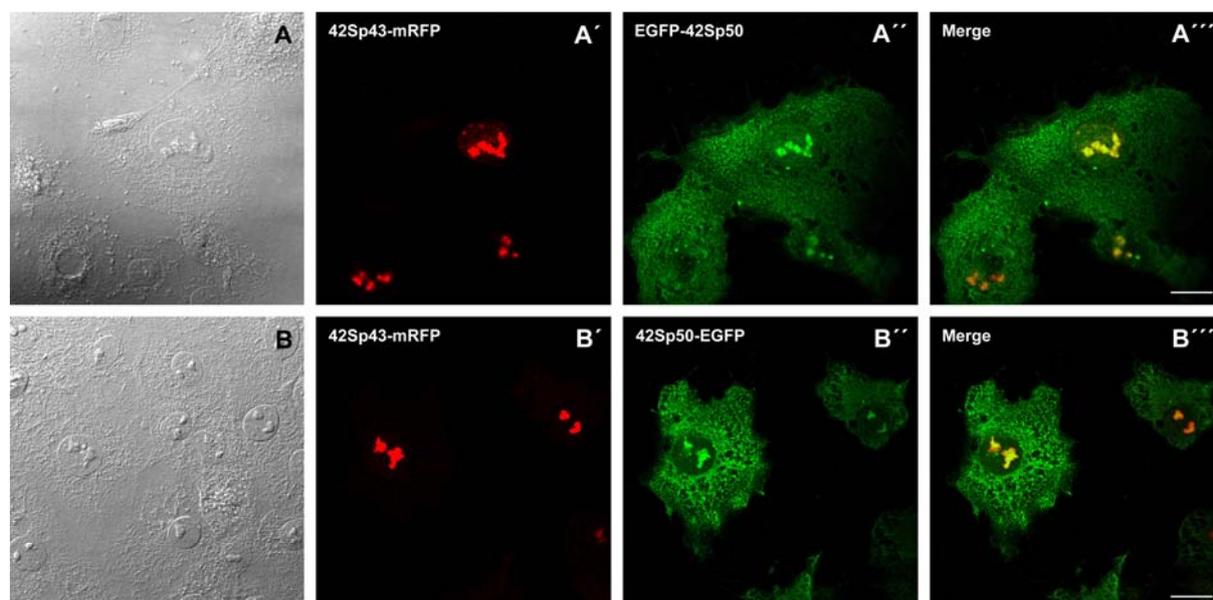


Abbildung 5-41 Umverteilung von 42Sp50 in den Nucleolus durch Koexpression mit 42Sp43 in COS7-Zellen. Die Signale der 42Sp43-Proteine sind unter (A'-B'), die der 42Sp50-Proteine unter (A''-B'') abgebildet. Die entsprechenden DIC-Aufnahmen sind ganz links, die Überlagerung der Abbildungen (Merge) ganz rechts gezeigt. Gelbe Signale stellen Kolokalisation von 42Sp43 mit 42Sp50 dar. Eichstriche: 20 μ m.

Um mögliche Einflüsse des EGFP-Tags auf die Lokalisierung der Proteine bei den Koexpressionsversuchen auszuschließen, wurde das Proteinpaar 42Sp43 und 42Sp50 mit unterschiedlichen fluoreszierenden Tags in COS7-Zellen exprimiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-42 gezeigt. Auch hierbei war immer das gleiche Resultat zu beobachten: 42Sp50 wurde „huckepack“ in den Nucleolus transportiert. Die Parallelversuche mit A6-Zellen zeigten identische Ergebnisse und wurden deshalb nicht abgebildet.

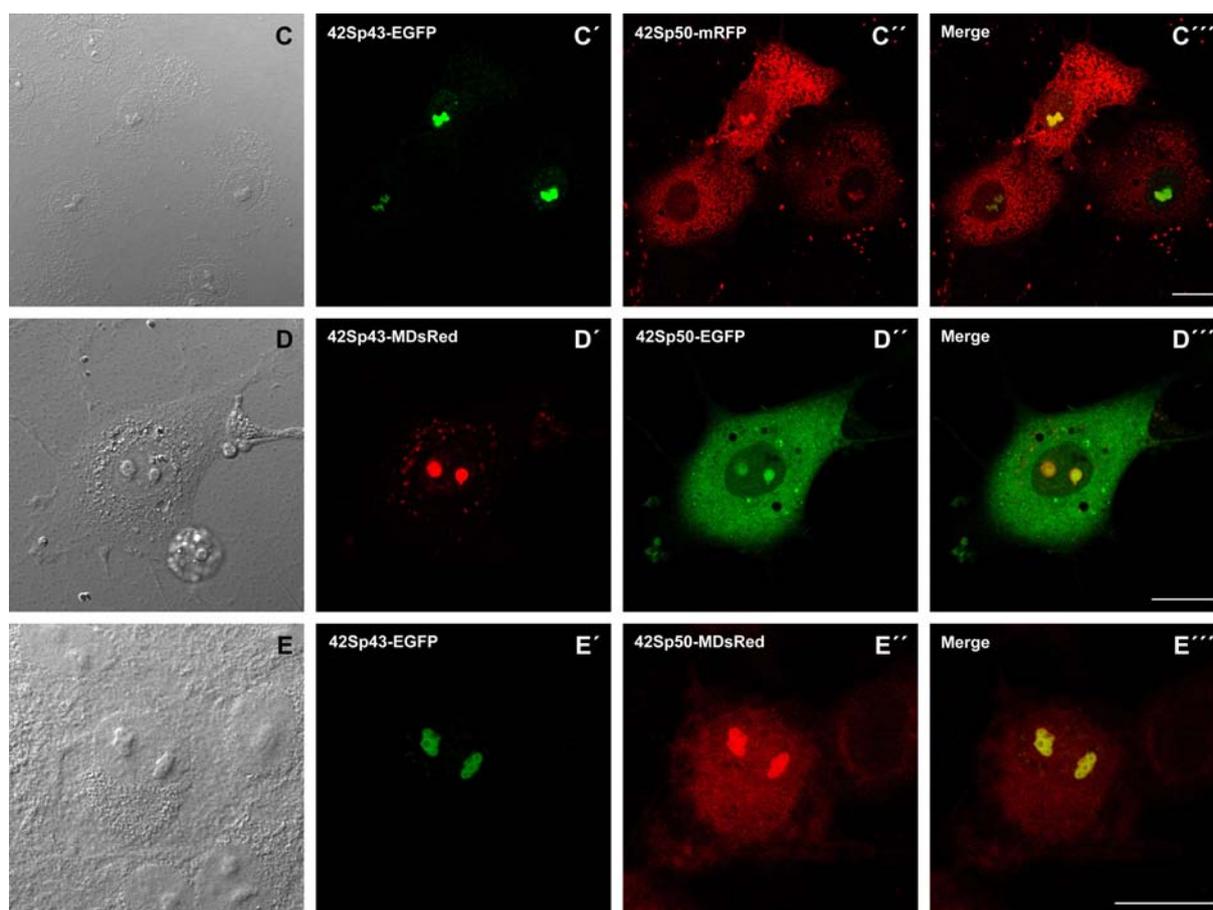


Abbildung 5-42 Umverteilung von 42Sp50 in den Nukleolus durch Koexpression mit 42Sp43 in COS7-Zellen. Die Signale der 42Sp43-Proteine sind unter (C'-E'), die der 42Sp50-Proteine unter (C''-E'') abgebildet. Die entsprechenden Interferenzaufnahmen sind ganz links, die Überlagerung der Abbildungen (Merge) ganz rechts gezeigt. Gelbe Signale stellen Kolokalisation von 42Sp43 mit 42Sp50 dar. Eichstriche: 20 µm.

Als Kontrollexperimente wurden Versuche durchgeführt, bei denen die Fusionsproteine nicht nach DNA-Transfektion, sondern nach Mikroinjektion von *in vitro* hergestellter mRNA exprimiert wurden. Diese mRNAs wurden für die nachfolgenden Expressionsstudien an Oozyten benutzt. Die Ergebnisse waren identisch zu den vorangegangenen Koexpressionsversuchen und sind deshalb hier nicht abgebildet.

5.10.6 Quantitative Auswertung der Koexpressionsversuche

Wie in 5.10.5 beschrieben, kam es vor allem bei der Koexpression von 42Sp50 mit 42Sp43 zu einer Wechselwirkung. Dabei änderte sich die intrazelluläre Verteilung von 42Sp50. Das Protein war in einem großen Teil der Fälle dann nicht nur im Zytoplasma, sondern auch in den Nukleolen lokalisiert (Abbildung 5-41 und 5-42). Ohne den im Nukleolus befindlichen Interaktionspartner 42Sp43 war 42Sp50 weitgehend vom Nukleolus ausgeschlossen.

Um diese Beobachtungen quantitativ auszuwerten, wurden von jedem Ansatz in drei Zellkulturschalen bei ca. 250-280 transfizierten Zellen die Lokalisation der jeweiligen EF1A-Variante in den Nukleolen überprüft. Nur deutliche Fluoreszenzsignale wurden gewertet. Die jeweiligen Versuchsansätze sind in Tabelle 5-12 zur Verdeutlichung aufgelistet.

Einzeltransfektionen	EF1A-1-EGFP	EGFP-EF1A-2	42Sp50-EGFP
Doppeltransfektionen	EF1A-1-EGFP + 42Sp43-mRFP	EGFP-EF1A-2 + 42Sp43-mRFP	42Sp50-EGFP + 42Sp43-mRFP

Tabelle 5-12 Koexpressionsansätze, von denen jeweils 250-280 Zellen in drei Zellkulturschalen ausgewertet wurden. Die Versuche wurden mit COS7-Zellen durchgeführt.

Nach der Auswertung der transfizierten Zellen konnte festgestellt werden, dass die Koexpression einer EF1A-Isoform mit 42Sp43 in allen drei Fällen in einer erhöhten Nukleolus-Lokalisierung der EF1A-Isoform resultierte, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. Es fand also in jedem der Koexpressionsansätze eine Umverteilung von EF1A und damit eine Interaktion mit 42Sp43 statt. Dies war besonders ausgeprägt bei 42Sp50, es kam in diesem Fall zu einer dramatischen Einwanderung in den Nukleolus (Tabelle 5-13 und Abbildung 5-43). Die Umverteilung von EF1A-1 und EF1A-2 war dagegen weit weniger stark ausgeprägt. Zur Verdeutlichung sind die Ergebnisse auch graphisch dargestellt (Abbildung 5-43).

	EF1A-1	EF1A-2	42Sp50
Einzeltransfektion	2.67 ± 1.45	1.67 ± 0.88	14.33 ± 4.91
Doppeltransfektion	12.67 ± 5.24	15.83 ± 1.88	86.67 ± 8.83

Tabelle 5-13 Prozentsatz der Zellen mit einem Signal einer EF1A-Isoform im Nukleolus (nach Einzel- bzw. Doppelsexpression mit 42Sp43 in COS7-Zellen).

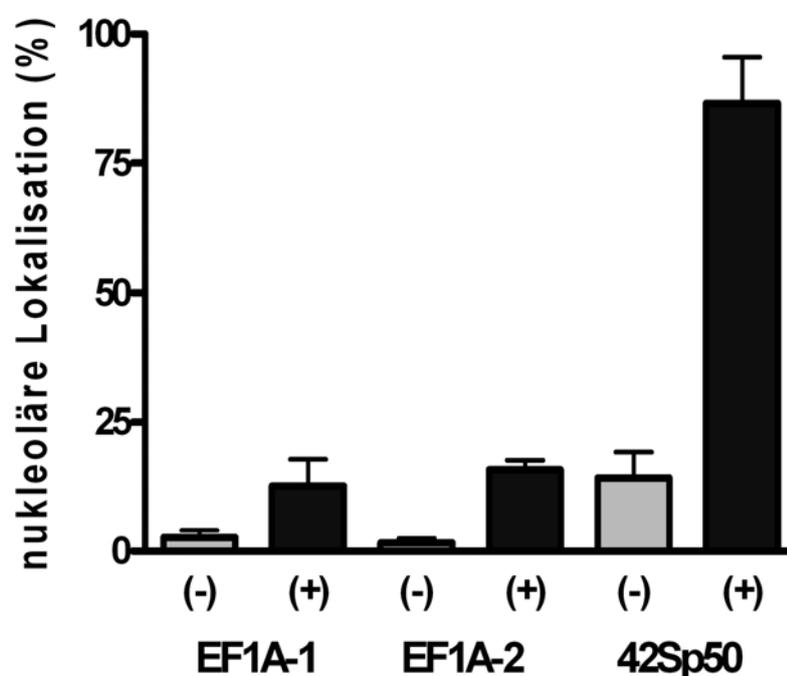


Abbildung 5-43 Nukleoläre Lokalisierung der drei EF1A-Isoformen in COS7-Zellen mit (+) oder ohne (-) Koexpression von 42Sp43. Die exprimierten Fusionsproteinpaare sind in Tabelle 5-11 gezeigt. Die Mittelwerte wurden anhand von jeweils drei Auszählungen (gesamt jeweils ca. 250-280 Zellen) ermittelt.

5.10.7 Koexpression der EF1A-Isoformen mit 42Sp43 in prävitellogenen *Xenopus* Oozyten

Für entsprechende Versuche mit *Xenopus* Oozyten wurde die mRNA jeweils einer EF1A-Variante zusammen mit der mRNA von 42Sp43 in prävitellogene *Xenopus* Oozyten mikroinjiziert. Die mRNA wurde in vitro synthetisiert und kodierte ein rot oder grün fluoreszierendes Fusionsprotein.

Die Ergebnisse der Mikroinjektion von EF1A-1 bzw. -2 mit 42Sp43 sind in Abbildung 5-44 dargestellt. Das rot fluoreszierende 42Sp43 war stark in den amplifizierten Nukleolen angereichert und schwach im gesamten Zytoplasma verteilt (A' und B'), in einem Muster, das der Einzelexpression entsprach (Abbildung 5-35). EF1A-1 und EF1A-2 waren, wie auch bei der Einzelexpression homogen im Zytoplasma verteilt und nicht in den Nukleolen angereichert (A'' und B''). Die Bbs waren vom Fluoreszenzsignal ausgeschlossen (Pfeil in A). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die gleichzeitige Expression von EF1A-1 oder EF1A-2 mit 42Sp43 nicht zu einer erkennbaren topologischen Veränderung der Proteine führte.

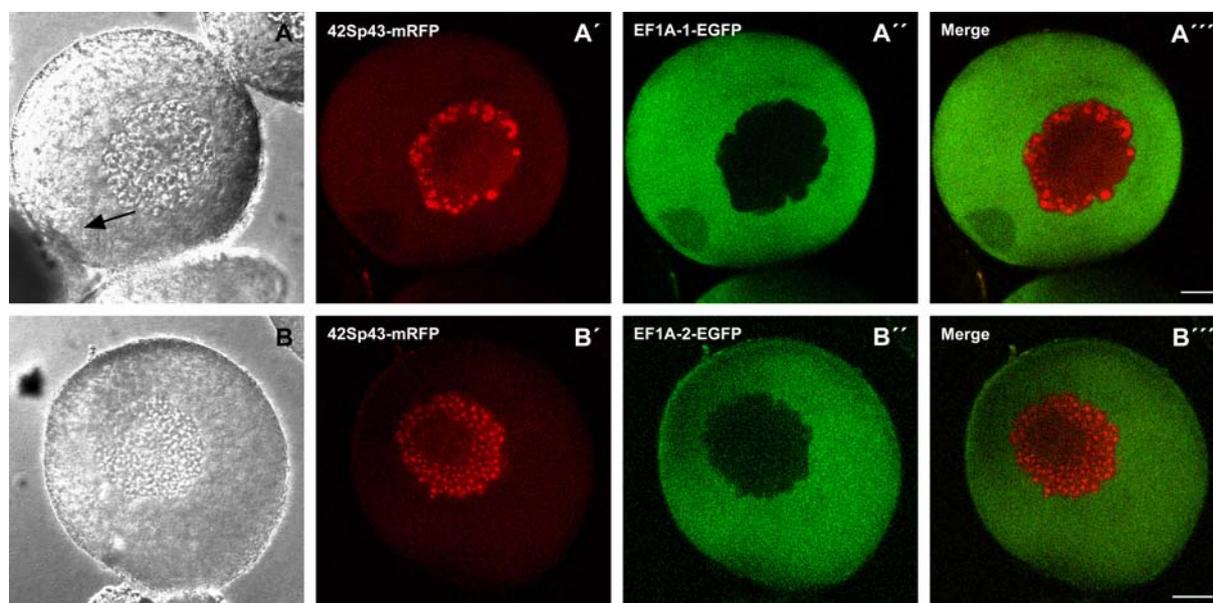


Abbildung 5-44 Doppelexpression von 42Sp43 mit jeweils EF1A-1 bzw. EF1A-2 in prävitellogenen *Xenopus* Oozyten. Die Oozyten wurden nach der mRNA-Injektion 24h inkubiert und im Anschluss in vivo unter dem CSLM untersucht. Es fand keine Umverteilung von EF1A-1-EGFP (A''), EF1A-2-EGFP (B'') und 42Sp43-mRFP gegenüber der Einzelexpression statt. Die EF1A-Varianten sind beide homogen im Zytoplasma verteilt, wobei der Bb nicht markiert ist (Pfeil in A). 42Sp43-mRFP ist hauptsächlich in den amplifizierten Nukleolen angereichert (A' und B'). Die DIC-Aufnahmen sind ganz links (A und B), die Übereinanderlagerung der Abbildungen ganz rechts (Merge, A''' und B''') gezeigt. Eichstriche: 50µm.

Im nächsten Experiment, der Ko-Mikroinjektion von 42Sp43- und 42Sp50-mRNA, ergab sich ein völlig anderes Bild. Es ist deutlich zu erkennen, dass 42Sp43 im Beisein von 42Sp50 nicht länger in den Nukleolen konzentriert ist, sondern sich im zytoplasmatischen Kompartiment anreichert.

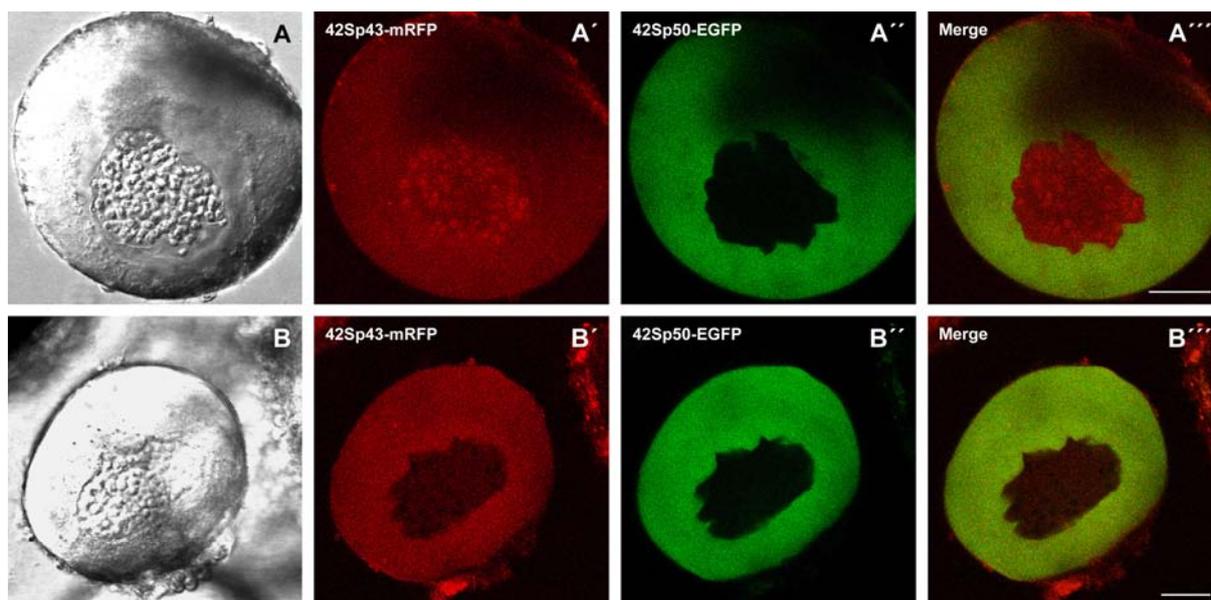


Abbildung 5-45 Koexpression von 42Sp43-mRFP- und 42Sp50-EGFP-mRNA in prävitellogenen *Xenopus* Oozyten. Die Oozyten wurden nach der mRNA-Injektion und Inkubation *in vivo* unter dem CSLM betrachtet. 42Sp50 ist auch hier homogen im Zytoplasma verteilt (A''-B''), wobei der Bb nicht markiert ist. Dagegen fand bei 42Sp43 eine Umverteilung des Proteins statt. Verschiedene Zustände konnten beobachtet werden und sind hier abgebildet. Das Protein ist kaum (A') oder gar nicht mehr in den amplifizierten Nucleolen nachweisbar (B'). Die Übereinanderlagerungen der Aufnahmen sind unter (A'''-B''') abgebildet, die Interferenzkontrastaufnahmen unter (A-B) gezeigt. Eichstriche: 50µm.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich Interaktionen zwischen 42Sp43 und 42Sp50 sowohl in Oozyten als auch in Kulturzellen (5.10.5) nachweisen lassen. In somatischen Zellen findet eine Umverteilung von 42Sp50 vom Zytoplasma in die Nucleolen statt, in Oozyten dagegen beobachtet man eine Umverteilung von 42Sp43 aus den Nucleolen in das Zytoplasma. Die anderen EF1A-Isoformen, EF1A-1 und EF1A-2, bewirken dagegen nur in sehr geringem Maße eine Umverteilung von 42Sp43, was auf fehlende oder relativ schwache Interaktionen hinweist.

6. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Expression und Lokalisierung von 42Sp50 während der *Xenopus* Oogenese untersucht. Dieses Protein ist mit dem Translations-Elongationsfaktor EF1A verwandt, ist aber in der frühen Oogenese an der Ausbildung eines distinkten RNA Partikels beteiligt, das der Speicherung von tRNA und 5S RNA dient. Die Expression der drei EF1A-Isoformen von *Xenopus* wurde auf Protein- und RNA-Ebene während der Oogenese und in somatischen Zellen untersucht. Des Weiteren wurde die zelluläre Verteilung der EF1A-Isoformen durch GFP- und RFP-Fusionsproteine in Kulturzellen und *Xenopus* Oozyten ermittelt und neue Erkenntnisse über in vivo Protein-Interaktionen gewonnen.

6.1 Identifizierung des Antigens von IV'D4 und Charakterisierung von Nuage

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war der institutseigene, monoklonale Antikörper IV'D4. Dieser markierte an Gefrierschnitten von prävitellogenen *Xenopus* Oozyten zytoplasmatische, perinukleäre Strukturen, die licht- und elektronenmikroskopisch als Nuage identifiziert wurden (Kapitel 5.1.1 und 5.1.5). Dabei handelt es sich um perinukleäre, elektronendichte Strukturen, die in Keimzellen vieler Spezies vorkommen, deren Funktion aber bis heute weitgehend unbekannt ist (O'Donnell et al., 2008). Whole-mount Lokalisierung an Oozyten ergaben dagegen ein etwas anderes Verteilungsmuster des Antigens von IV'D4. Es handelt sich offenbar um ein sehr häufiges Protein, welches in hoher Konzentration im gesamten Zytoplasma verteilt vorliegt und um den Zellkern herum angereichert ist (Kapitel 5.1.3). Die Diskrepanz in den Beobachtungen über das Vorkommen und die Lokalisation des Antigens von IV'D4 an Gefrierschnitten bzw. whole-mount Präparaten von prävitellogenen *Xenopus* Oozyten kann folgendermaßen erklärt werden: Durch die Anfertigung von Gefrierschnitten, insbesondere aber während der Antikörper-Inkubation, wurde ein Großteil des löslichen, zytoplasmatischen Antigens ausgewaschen, lediglich an Nuage assoziiertes Protein blieb erhalten und wurde vom Antikörper erkannt. Diese Problematik ist auch von anderen Proteinen bekannt, wie z.B. Nucleoplasmin. Nucleoplasmin ist in vivo im gesamten Nucleoplasma von *Xenopus* Oozytenkernen verteilt, wird aber während der Antikörperinkubation aus Gefrierschnitten ausgewaschen (Krohne und Franke, 1980). Ein solch artifizierender Verlust oder sogar eine Umverteilung eines Proteins lässt sich im Allgemeinen durch eine chemische Fixierung der Schnitte (z.B. mit Formaldehyd) oder durch Fixierung und Einbettung der Oozyten in Paraffin oder Polyesterwachs, gefolgt von Dünnschnitten, vermeiden. Leider stellte sich jedoch heraus, dass der Antikörper IV'D4 unter diesen Bedingungen sein Antigen nicht mehr erkennt. Durch die beschriebenen Versuche konnten bereits drei wichtige Eigenschaften des Antigens von IV'D4 ermittelt werden: Es handelt sich um ein häufiges, zytoplasmatisches Protein von *Xenopus* Oozyten, das größtenteils löslich, aber im perinukleären Bereich mit den Nuage-Strukturen assoziiert ist.

Immunblots mit Extrakten von prävitellogenen Oozyten zeigten, dass der Antikörper ein ca. 50kD großes Protein erkennt, das auch im Coomassie gefärbten Gel als prominente Bande zu erkennen ist und offenbar in diesem Keimzellstadium von *Xenopus* in großer Menge vorliegt. Das mit dem Elongationsfaktor EF1A verwandte Protein 42Sp50, eine Komponente des 42S RNPs, stellt ein sehr häufiges Protein mit dem „richtigen“ Molekulargewicht dar. Die Proteine des 42S Ribonukleoproteinpartikels, das tRNA und 5S rRNA speichert, machen ca. 20% des Gesamtproteingehalts prävitellogener Oozyten aus (Johnson et al., 1984). Zum Nachweis der Antikörperspezifität wurde deshalb rekombinantes, His-gekoppeltes 42Sp50

hergestellt, aufgereinigt und für Immunblots mit IV'D4 verwendet. Tatsächlich konnte durch diesen Versuch bewiesen werden, dass der Antikörper das Antigen 42Sp50 erkennt (Kapitel 5.3.6). Wichtige Eigenschaften dieses Proteins wurden in der Literatur bereits beschrieben und besagen, dass in der frühen Oogenese 42Sp50 nicht als freies Molekül, sondern stets als Proteinkomponente des 42S RNPs vorliegt (Viel et al., 1990). Es ist in prävitellogenen Oozyten im Zytoplasma verteilt und dissoziiert mit Beginn der Vitellogenese, wenn die gespeicherte 5S rRNA für die Ribosomen-Biogenese benötigt wird (Mattaj et al., 1983; Viel et al., 1990; Johnson und Krieg, 1995). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde daher zunächst angenommen, dass 42Sp50, neben der homogenen Verteilung im Zytoplasma, auch als strukturgebundene Komponente in Nuage vorliegt. Wie weiter unten diskutiert wird, ist der eindeutige Beweis allerdings nicht möglich, da der Antikörper auch die anderen Mitglieder der EF1A-Familie erkennt. Die auffällige Verbindung der Nuage mit den Kernporen (Abbildung 5-6 und 5-7) deutete darauf hin, dass es sich um Strukturen handeln könnte, die mit Kern-Zytoplasma Exportvorgängen durch die Kernporen in Zusammenhang stehen und unmittelbar an der zytoplasmatischen Seite der Kernporen entstehen. Allerdings ließ sich die formale Möglichkeit nicht ausschließen, dass das Nuage-Material in die Oozytenkerne transportiert wird. Dagegen sprachen aber elektronenmikroskopische Beobachtungen, bei denen Nuage entdeckt wurden, die sich in einigem Abstand zur Kernhülle befanden oder mit Mitochondrien assoziiert waren (Abbildung 5-6 und 5-7; Bilinski et al., 2004).

Durch die Behandlung von prävitellogenen *Xenopus* Oozyten mit verschiedenen Zellgiften (Leptomycin B, Actinomycin D und Cycloheximid) wurden entweder die Transkription (AMD), die Translation (CHX) bzw. der CRM1-Kernexportweg (LMB) gehemmt. Dadurch sollten Erkenntnisse über die Entstehung der Nuage-Strukturen gewonnen werden. Es zeigte sich jedoch, dass die Hemmversuche keinen klar erkennbaren Einfluss auf die strukturelle Organisation der Nuage hatten (Kapitel 5.2.1). Allerdings vermittelten EM-Aufnahmen, dass die Nuage nach Hemmung der Proteinbiosynthese durch CHX dichter gepackt vorlagen und den direkten Kontakt mit der zytoplasmatischen Seite der Kernporen verloren hatten (Abbildung 5-13).

Die meisten zellulären Strukturen, wie z.B. das Zytoskelett und viele nukleäre Subkompartimente befinden sich in einem steady-state Zustand, d.h. dass zur Erhaltung der Strukturen ein ständiger Energie- und Material-Austausch stattfindet (Misteli, 2001). Vermutlich handelt es sich bei Nuage ebenfalls um „steady-state-Strukturen“ im Fließgleichgewicht. Die dynamischen Eigenschaften der Nuage könnten z.B. durch FRAP-Experimente untersucht werden. Nach Hemmung der RNA- oder Proteinbiosynthese lösten sich die Nuage aber nicht auf. Ohne die ständige Neusynthese und Bereitstellung von RNA- und Proteinkomponenten werden sie offenbar in einen statischen Zustand versetzt, der vergleichbar ist mit dem sogenannten „Fließbandprinzip“: Solange neues Material geliefert wird, entstehen neue Produkte; wird das Band arretiert, so werden alle Zwischen- und Endprodukte in ihrem momentanen Zustand „eingefroren“.

Es ist derzeit noch unklar, ob die Nuage-Bildung im Zusammenhang mit dem Assembly der 42S RNPs steht. Es ist bisher experimentell nicht belegt, in welchem Zellkompartiment die Synthese des Ribonukleoproteinpartikels stattfindet. Wie später diskutiert, findet das Assembly aber sehr wahrscheinlich im Zytoplasma statt, wofür auch die Tatsache spricht, dass 42Sp50 kein Kernlokalisierungssignal aufweist.

Nuage sind ubiquitäre Strukturen in Keimzellen zahlreicher Spezies (Parvinen, 2005). Sie wurden in Oozyten und Spermatozyten von Insekten, wie z.B. *Drosophila* (Mahowald, 1971), bis hin zum Menschen (Eddy, 1975; Saffman und Lasko, 1999) beschrieben. Das 42S RNP dagegen findet man nur in Oozyten von Amphibien und Fischen (Mazabraud et al., 1975; Denis et al., 1980; Kloetzel et al., 1981; Van den Eynde et al., 1989; Infante et al., 2008).

Falls Assembly bzw. Export von 42S RNPs aus dem Zellkern tatsächlich im Zusammenhang mit der Bildung der Nuage steht, wäre dies nur eine von mehreren Funktionen, die den Nuage zugesprochen werden. Es wird unter anderem vermutet, dass sie eine Vorläuferstruktur der germinal granules darstellen (Bilinski et al., 2004), da sich die Zusammensetzungen und die strukturelle Organisation gleichen. Es konnte anhand von elektronenmikroskopischen Analysen gezeigt werden, dass Nuage auch mit Mitochondrien interagieren (Bilinski et al., 2004). Zusätzlich wurde gezeigt, dass Sm-Proteine ebenfalls Komponenten der Strukturen darstellen. In Nuage von *C. elegans* und in Spermatozyten der Maus konnten auch snRNPs als Bestandteile identifiziert werden (Barbee et al., 2002; Chuma et al., 2003). In *Xenopus* konnten neben den Sm-Proteinen allerdings keine weiteren Komponenten der Spleiß-Maschinerie nachgewiesen werden, weshalb davon ausgegangen wird, dass Sm-Proteine in Nuage eine andere Funktion erfüllen. Die Proteine weisen symmetrische Dimethylargininmotive auf, die beim Assembly der Core-Domäne des Spleißosoms eine entscheidende Rolle spielen (Friesen et al., 2001b). Die Dimethylierung der Proteine wird durch Methyltransferasen vermittelt. Es ist davon auszugehen, dass die Modifikation der Sm-Proteine zu einer erhöhten Bindungsaffinität an SMN-Proteine und damit zu einem schnelleren Einbau in die snRNP Core-Domäne führen (Friesen et al., 2001b). Mittlerweile konnte in *Drosophila* gezeigt werden, dass eine Hemmung der Methyltransferasen und somit eine Reduzierung der sDMA-Motive keinen Einfluss auf die Biogenese der snRNPs hat, aber die Reifung der Oozyten und der Spermien gestört wird. Deshalb wird vermutet, dass Sm-Proteine mit sDMA-Motiven eine wichtige Rolle in der Determinierung der Keimzellen spielen (Gonsalvez et al., 2006). Da auch Nuage mit germinal granules in Verbindung gebracht wurden, die für die Determinierung der Keimzellen essentiell sind, sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob eine Hemmung der Methylierungsprozesse einen Einfluss auf die strukturelle Organisation der Nuage hat. Dazu wurden die Methyltransferasehemmer MTA und Adox verwendet. Diese Inhibitoren hemmen generell die Proteinmethylierung, die in N- bzw. C-Methylierungsreaktionen unterteilt werden. Zahlreiche Aminosäuren können durch ein bis drei Methylreste modifiziert werden. Argininreste können mono- bzw. dimethyliert vorliegen, wobei die Dimethylierung symmetrisch (sDMA) oder asymmetrisch (aDMA) sein kann (Polevoda und Sherman, 2007; Bedford and Clarke, 2009). Die Funktion von EF1A hängt in den unterschiedlichsten Spezies, von der Hefe bis zum Mensch von Mono-, Di- bzw. Trimethylmodifikationen an Lysinresten ab und ist wahrscheinlich sogar entwicklungspezifisch reguliert (Polevoda und Sherman, 2007). Ob die EF1A-Isoform 42Sp50 in *Xenopus* ebenfalls methyliert vorliegt, wurde bis dato noch nicht untersucht. Durch die Experimente mit Adox und MTA wurde erwartet, dass es zu einer sichtbaren Veränderung der strukturellen Organisation der Nuage kommt, falls den Methylmodifikationen eine Funktion im Aufbau der Strukturen zukäme. Tatsächlich wurde eine deutliche Reduzierung des Fluoreszenzsignals von IV'D4 sowie eines anti-Sm-Antikörpers beobachtet (Kapitel 5.2.2). Die elektronenmikroskopischen Analysen konnten das Ergebnis der immunzytochemischen Experimente insofern bestätigen, dass sichtbare strukturelle Veränderungen innerhalb der Nuage zu beobachten waren. Die Inhibitoren sind jedoch zu unspezifisch, zudem ist die Nuage-Zusammensetzung weitgehend unbekannt, weshalb Aussagen über betroffene Nuage-Proteine nicht möglich sind.

6.2 In *Xenopus* existieren drei Isoformen des IV'D4-Antigens

In *Xenopus* wurden drei entwicklungsabhängig regulierte EF1A-Gene beschrieben (Dje et al., 1990; Tafuri und Wolffe, 1993). Laut Literatur ist EF1A-S-mRNA in embryonalen und adulten Zellen vorhanden und kaum existent in Oozyten. EF1A-O-mRNA soll hauptsächlich in männlichen und weiblichen Keimzellen transkribiert werden und ist im Embryo noch bis zum Stadium der Neurulation nachweisbar. Die 42Sp50-mRNA konnte dagegen nur in Oozyten nachgewiesen werden (Abdallah et al., 1991; Dje et al., 1990; Krieg et al., 1989). In der frühen Oogenese wird 42Sp50 translatiert und es kommt zur Bildung des 42S RNPs. In der späteren Oogenese und Embryogenese bis zur Neurulation ist EF1A-O vorhanden, bis schließlich die „normale“ EF1A-S-Form translatiert wird (Mattaj et al., 1987; Dje et al., 1990; Abdallah et al., 1991; Viel et al., 1991; Johnson und Krieg; 1995). Deshalb wurde die Vermutung aufgestellt, dass 42Sp50 und EF1A-O oozytenspezifische Funktionen aufweisen und erst die somatischen Zellen des Embryos nach der Midblastulatransition die EF1A-S-Form einschalten. Die oozytenspezifische Expression von Genfamilien wurde bereits häufig beobachtet, beispielsweise für Histon H1 (Doenecke und Alonso, 1996).

Nachdem 42Sp50 als Antigen von IV'D4 identifiziert wurde, musste im Anschluss folglich herausgefunden werden, ob der Antikörper auch die anderen beiden EF1A-Isoformen erkannte. Für diese Vermutung lagen mehrere Anhaltspunkte vor, da der Antikörper in immunzytochemischen Versuchen nicht nur in Oozyten, sondern auch in Kulturzellen ein homogen im Zytoplasma verteiltes Antigen markierte (Kapitel 5.1.7). Außerdem erkannte der Antikörper im Immunblot von somatischem Gewebe ein Protein bei ca. 50 kDa (Kapitel 5.3.2). Frühere Ergebnisse zeigten, dass EF1A-S ein apparentes Molekulargewicht von 53kD, 42Sp50 dagegen nur ein Gewicht von 48kD aufwies (Mattaj et al., 1987; Deschamps et al., 1991).

In dieser Arbeit konnten die Proteine durch eindimensionale Gelelektrophorese nicht aufgetrennt werden, was an der Verwendung unterschiedlicher Gelsysteme (im Vergleich zu den genannten Autoren) gelegen haben könnte. Außerdem sind die kalkulierten Molekulargewichte beider Isoformen (Tabelle 5-3) nahezu identisch, was eine gelelektrophoretische Auftrennung deutlich erschwerte. Es konnte also anhand der beschriebenen Methode nicht geklärt werden, welche EF1A-Isoformen der Antikörper IV'D4 erkannte. Eine Unterscheidung der drei EF1A-Isoformen war jedoch auch durch 2D-Gelelektrophoresen nicht möglich. Der Grund war das Vorkommen zahlreicher Phosphorylierungsvarianten, die die einzelnen Isoformen sozusagen überdeckten und dadurch eine Zuordnung unmöglich machten. Durch einen Phosphataseverdau der Proben erhoffte man sich die Isoformen, aufgrund unterschiedlicher IEPs, als drei distinkte Flecken darstellen zu können. Eine Identifizierung der einzelnen Proteinvarianten war jedoch ebenfalls nicht möglich, da eine vollständige Dephosphorylierung der Proteine nicht erreicht werden konnte. Wenn auch die Identifizierung der drei Isoformen fehlschlug, so konnten jedoch Kenntnisse über unterschiedliche Phosphorylierungszustände der EF1A-Familie in verschiedenen Geweben und Oozytenstadien gewonnen werden. In jungen Oozyten weisen die Isoformen multiple Phosphorylierungen der potentiellen P-sites (Kapitel 5.5.2) auf. In späteren Oozytenstadien liegen sie in wenigen Phosphorylierungszuständen vor (Abbildung 5-24). Es war anhand der experimentell ermittelten IEPs möglich, die Anzahl der Phosphatreste pro EF1A-Proteinmolekül reifer Oozyten zu bestimmen (Tabelle 5-5). Bei der dort vorhandenen Isoform handelt es sich vermutlich um EF1A-S, da das gleiche Muster auch bei der Analyse des Lebergewebes zu beobachten war (Abbildung 5-24). Dennoch ist nach wie vor keine Aussage darüber möglich, welche Isoform in den Nuage lokalisiert. Auch Literaturangaben zur Expression auf Proteinebene und zur Lokalisation sind widersprüchlich.

EF1A soll laut Mattaj et al. (1987) in allen Oozytenstadien und somatischen *Xenopus* Zellen vorhanden sein. Andere Autoren veröffentlichten, dass EF1A-O die Funktion von 42Sp50 als tRNA bindendes Protein mit Beginn der Vitellogenese übernimmt, und dass EF1A-O wiederum zu Beginn der Embryogenese durch EF1A-S ersetzt wird (Viel et al., 1990). Es wird zumindest für 42Sp50 einheitlich beschrieben, dass es nur in prävitellogenen Oozyten vorhanden ist. Außerdem ist das 42S RNP uniform im Zytoplasma der frühen Oozyten verteilt, wohingegen EF1A in den Balbiani bodies lokalisiert (Mattaj et al., 1987; Viel et al., 1990). Leider wird nicht deutlich erklärt, welche Isoformen die verwendeten Antikörper tatsächlich erkennen, weshalb theoretisch alle drei Isoformen in den Nuage lokalisieren könnten. Dazu müssten sie allerdings mit einem anderen Bestandteil der Nuage interagieren. Und tatsächlich ist bekannt, dass EF1A mit zahlreichen anderen Proteinen, die z.B. in Prozesse wie der Signaltransduktion, der Apoptose und des Zellwachstums involviert sind, in Interaktion treten kann (Mishra et al., 2007; Mansilla et al., 2008). Des Weiteren wurde herausgefunden, dass EF1A an der Regulation des Aktinzytoskeletts beteiligt ist und an Mikrotubuli bindet (Liu et al., 2002; Gross und Kinzy, 2005 und 2007). Somit ist es durchaus vorstellbar, dass eine EF1A-Isoform eine Funktion in den Nuage erfüllt, die nicht mit dem 42S RNP Assembly in Zusammenhang steht. Überraschenderweise wurde vor kurzem berichtet, dass EF1A ein zytoplasmatischer Bestandteil der Kernexportmaschinerie von bestimmten Proteinen ist, die nicht über den üblichen Exportin-1 Weg aus dem Zellkern transportiert werden. Dabei interagiert EF1A mit einem bestimmten Exportsignal (TD-NEM) von Proteinen, wie z.B. dem poly(A)-binding protein (PABP1) von der zytoplasmatischen Seite der Kernhülle aus und stimuliert so als eine Art Vermittler den Export der spezifischen Proteine (Khacho et al., 2008). EF1A spielt zusätzlich noch eine wichtige Rolle beim tRNA-Export. Das Protein wurde als zytoplasmatische Komponente des nukleären Exportweges von aa-tRNAs identifiziert. EF1A soll demnach auf der zytoplasmatischen Seite der Kernporen die Auflösung des aa-tRNA/aa-tRNA-Synthase-Komplexes katalysieren (Großhans et al., 2000; Bohnsack et al., 2002; Calado et al., 2002). Vieles spricht somit dafür, dass EF1A Proteine, die gerade die Kernporen passieren, empfängt und bindet. Es wäre durchaus denkbar, dass dies unter anderem die Entstehung von Nuage-Strukturen darstellt, da davon ausgegangen wird, dass es sich bei Nuage um RNPs handelt. Dennoch ist klar, dass dies nicht die einzige Funktion der Strukturen darstellen kann.

6.3 Analyse der differentiellen Genexpression der EF1A-Familie auf mRNA-Ebene

Die mRNA-Expressionsmuster der drei EF1A-Isoformen wurden schon vor Beginn unserer Analyse ausführlich untersucht. Die Ergebnisse wurden hauptsächlich durch in situ Hybridisierungen bzw. Northern blots ermittelt und sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

	mRNA					
	Oozyten I-III	Oozyten IV-VI	Früher Embryo	Später Embryo	Adult	Testis
EF1A-S	+	+	+	+	+	-
EF1A-O	+	+	+	-	-	+
42Sp50	+	-	-	-	-	+

Tabelle 6-1 Zusammenfassung der Literaturangaben bezüglich des Vorhandenseins von mRNA aller drei *Xenopus* EF1A-Isoformen. Die Daten wurden durch Northern blot bzw. in situ Hybridisierung gewonnen (Mattaj et al., 1987; Dje et al., 1990; Abdallah et al., 1991; Viel et al., 1991; Johnson und Krieg; 1995).

Eine RT-PCR-Analyse des Expressionsmusters der EF1A-Isoformen-mRNA wurde in dieser Arbeit erstmalig durchgeführt. Aufgrund der hohen Sequenzübereinstimmungen bestand die Schwierigkeit zu Anfang darin, die Primerpaare so auszuwählen, dass sie nur an eine der Isoformen binden konnten. Des Weiteren war es wichtig, dass sich die amplifizierten Fragmente in ihrer Länge voneinander unterschieden. Nach gründlicher Recherche und ausführlichen Tests konnten schließlich spezifische Primerpaare für alle drei Isoformen gefunden werden.

Durch die RT-PCR-Analyse konnte gezeigt werden, dass 42Sp50-mRNA tatsächlich in „normalen“ somatischen Zellen fehlt. Die mRNA wird dagegen während der gesamten Oogenese und auch in Hodengewebe (vermutlich in Spermatozyten) exprimiert. Der Nachweis von 42Sp50-mRNA in Embryonen könnte das Vorkommen maternaler Transkripte darstellen, die sich im Laufe der Entwicklung ausdünnen und in adulten, somatischen Gewebe nicht mehr nachweisbar sind. Überraschenderweise wurde festgestellt, dass mRNA auch in Hirngewebe nachweisbar ist. Diese Besonderheit im Expressionsmuster wurde bereits bei anderen Genen festgestellt, die als keimbahn-spezifische Gene identifiziert wurden. Hierbei kann z.B. das *Spnr*-Gen in Maus genannt werden, dessen mRNA nur im Ovar, im Hoden und im Hirn nachgewiesen werden kann (Schumacher et al., 1995).

Genau wie EF1A-S wurde auch EF1A-O-mRNA ubiquitär in allen getesteten somatischen Geweben und Keimzellen nachgewiesen, so dass die Bezeichnung oozytenspezifische Variante (EF1A-O) nicht länger gerechtfertigt war und daher umbenannt wurde.

Der Nachteil der RT-PCR bestand darin, dass eine Quantifizierung der mRNA-Menge im jeweils getesteten Gewebe nicht möglich war. Eine geeignete Methode hierfür wäre eine real-time-PCR-Analyse.

Als Fazit der mRNA-Expressionsanalyse lässt sich feststellen, dass in *Xenopus*, genau wie bei Säugern, zwei somatisch exprimierte EF1A-Isoformen existieren: EF1A-S und EF1A-O. Die Nomenklatur dieser Proteine wurde, aufgrund der hohen Sequenzübereinstimmungen und Ähnlichkeiten im Expressionsmuster, an die Säuger-Nomenklatur angepasst. EF1A-S weist die größten Homologien auf und wurde deshalb in EF1A-1 umbenannt. EF1A-2 zeigt ebenfalls große, wenn auch geringere Identität auf und wurde deshalb als EF1A-2 bezeichnet. Der Name 42Sp50 wurde beibehalten, da diese Isoform bei Säugern nicht nachgewiesen werden konnte. Das entsprechende 42Sp50-Gen wurde bisher nur bei Amphibien und Fischen gefunden. Diese Organismen weisen eine ähnliche Oogenese auf, die sich von der Säuger-Oogenese grundlegend unterscheidet. Bei Säugern werden während der Reifung des Eis keine maternalen Produkte in Form von RNPs gespeichert, was der Grund für das Fehlen eines 42Sp50-ähnlichen Gens sein könnte.

6.4 Expression von EF1A-Fusionsproteinen in Kulturzellen und Oozyten

Die Expression der *Xenopus* EF1A-Isoformen in Kulturzellen wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals durchgeführt. Es zeigte sich, dass alle drei Proteine homogen im Zytoplasma verteilt vorliegen. In wenigen Fällen wurde beobachtet, dass 42Sp50 zu einem gewissen Teil im Nukleolus angereichert war, worauf später näher eingegangen wird (Kapitel 6.6). 42Sp50 stellt kein endogenes Protein somatischer Kulturzellen dar und wurde in der Arbeit dort erstmalig als Fusionsprotein exprimiert. Diese Isoform wird nicht endogen in somatischen Kulturzellen exprimiert. Das Protein lokalisiert aufgrund der großen Sequenzähnlichkeit nahezu identisch wie die beiden anderen EF1A-Varianten. Die Lokalisationen von EF1A-1 und EF1A-2 stimmten mit den veröffentlichten Ergebnissen in Kulturzellen verschiedener Spezies überein, wonach EF1A homogen im Zytoplasma verteilt und nicht im Nukleoplasma nachweisbar ist (Kjaer et al., 2001; Bohnsack et al., 2002).

Die Expression der drei *Xenopus* EF1A-Isoformen in prävitellogenen Oozyten wurde ebenfalls erstmalig durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass jede Isoform homogen im Zytoplasma verteilt vorlag und der Lokalisation in Kulturzellen entsprach. Durch die Expression der EF1A-Isoformen in lebenden *Xenopus* Oozyten sollte die Frage geklärt werden, welches der drei Proteine eine Komponente der Nuage darstellt. Diese Frage konnte jedoch nicht beantwortet werden, da die Nuage-Strukturen in den injizierten Oozyten nicht erkennbar waren. Vermutlich war das zytoplasmatische GFP-Signal der EF1A-Fusionsproteine in den injizierten Oozyten so hoch, dass das Nuage-Signal an der Kernhülle überdeckt wurde. Durch das Experiment erhoffte man sich auch mehr Aufschluss über den Ort des 42S RNP Assemblys zu erhalten. Falls 42Sp50 als Komponente von Nuage identifiziert worden wäre, hätte dies ein Anhaltspunkt dafür sein können, dass das Assembly von 42S RNPs mit der Formation von Nuage-Strukturen in Oozyten einhergeht. Dabei wären zwei Möglichkeiten denkbar gewesen: 42Sp50 könnte an frisch exportierte tRNAs binden und dabei mit anderen Komponenten unter Bildung von 42S RNPs interagieren, was die Bildung der Nuage-Strukturen widerspiegeln würde. Es konnte bereits gezeigt werden, dass EF1A beim Export von tRNAs über den Exp-5-Weg eine Rolle auf der zytoplasmatischen Seite der Kernhülle spielt (Kapitel 6.2; Großhans et al., 2000; Bohnsack et al., 2002; Calado et al., 2002). Eine ähnliche Funktion für eEF1A wurde außerdem erst kürzlich von Khacho et al. (2008) vorgeschlagen, wo vermutet wird, dass eEF1A in Säuger-Kulturzellen eine Rolle beim „Empfang“ von bestimmten Proteinen spielt, kurz nachdem sie die Kernpore passiert haben. Wie bereits erwähnt, konnte nicht herausgefunden werden, wo das Assembly der 42S RNPs in *Xenopus* Oozyten stattfindet.

Da 42Sp43 ebenfalls ein wichtiger Bestandteil des 42S RNPs ist, wurde auch die Lokalisierung dieses Proteins untersucht (nächstes Kapitel).

6.5 Expression von 42Sp43 in Kulturzellen und Oozyten

Wie bereits erwähnt, handelt es sich dabei um ein oozytenspezifisches Protein, dessen Sequenz eine divergierte Form des Transkriptionsfaktors IIIA darstellt. Anders als TFIIIA, bindet es jedoch nicht an 5S rDNA, sondern ausschließlich an 5S rRNA, die dadurch vor dem Abbau geschützt ist und im Zytoplasma der Oozyten gespeichert wird. 42Sp43 liegt nicht frei in der Oozyte vor, sondern ist ein Bestandteil des zytoplasmatischen 42S RNPs (Joho et al., 1990).

Durch die Expression von 42Sp43 konnte erstmals gezeigt werden, dass das Protein in somatischen Zellen und Oozyten in den Nukleolen akkumuliert. Außerdem konnte in Oozyten eine diffuse Anreicherung von 42Sp43 im Zytoplasma beobachtet werden. Die nukleoläre Akkumulation von 42Sp43 wurde dadurch erklärt, dass das Protein ein NLS aufweist und außerdem 5S rRNA bindet. Diese rRNA ist für die Ribosomen-Biogenese in den Nukleolen konzentriert (Bogdanov et al., 1995; Boisvert et al., 2007).

Die Tatsache, dass es in somatischen Zellen zu einer nahezu quantitativen Akkumulation von 42Sp43 in den Nukleolen kommt, wurde damit erklärt, dass 42Sp43 nicht Bestandteil fertiger zytoplasmatischer Ribosomen ist. Deshalb bindet es an 5S rRNA, die sich noch nicht in fertigen Ribosomen befindet und daher in den Nukleolen vorliegt. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die 5S rRNA durch die Interaktion mit dem oozytenspezifischen 42Sp43 nicht in die Ribosomen eingebaut werden kann. Denkbar wäre auch, dass 42Sp43 zunächst an 5S rRNA im Nukleolus bindet, aber während des Einbaus in die Ribosomen durch ein anderes, 5S rRNA bindendes Protein (evtl. L5), entfernt wird. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass 42Sp43 nicht an 5S rRNA, sondern an andere Nukleoluskomponenten binden könnte.

In Oozyten ist das gleiche Nukleolussignal von 42Sp43 zu beobachten, wofür vermutlich die gleichen Erklärungen wie in somatischen Zellen gelten. Eine Besonderheit in *Xenopus* Oozyten ist die Tatsache, dass im frühen Stadium der Oogenese große Mengen an 5S rRNA synthetisiert und in RNPs im Zytoplasma gespeichert werden (Mairy und Denis, 1971). Hier bindet 42Sp43 an 5S rRNA, die im Zytoplasma gespeichert wird, was eine Erklärung dafür sein könnte, warum in Oozyten ein zytoplasmatisches Signal von 42Sp43 zu beobachten ist. Die Expressionsexperimente von 42Sp43 und 42Sp50 in *Xenopus* Oozyten zeigten auf, dass beide Proteine im Zytoplasma kolokalisieren. Somit erscheint es wahrscheinlich, dass das Assembly der 42S RNPs in Oozyten im Zytoplasma stattfindet.

6.6 Nachweis der in vivo Interaktionen zwischen den beiden Proteinkomponenten der 42S Ribonukleoproteinpartikel

Das 42S RNP setzt sich, wie schon erwähnt, aus vier identischen Untereinheiten zusammen. Jede Untereinheit besteht wiederum aus drei Molekülen tRNA, einem Molekül 5S rRNA, zwei Molekülen des 50 kDa Proteins 42Sp50 (Thesaurin a) und einem Molekül des 40kDa Proteins 42Sp43 (Thesaurin b) (Picard et al., 1980). Da in den Partikeln die EF1A-Isoform 42Sp50, nicht aber die beiden anderen Formen EF1A-1 bzw. EF1A-2 vorkommen, muss es eine spezifische Interaktion zwischen 42Sp43 und 42Sp50 geben. Um diese Interaktionen sichtbar zu machen, wurden 42Sp43 und 42Sp50 als Fusionsproteine (GFP und RFP) in somatischen Kulturzellen und Oozyten koexprimiert. Diese Experimente wurden durchgeführt, um zu beobachten, ob es durch die Koexpression zu einer topologischen Umverteilung einer der Partner innerhalb der Zelle käme. Tatsächlich war dies der Fall,

womit erstmalig eine Möglichkeit gefunden wurde, die in vivo Interaktionen zwischen 42Sp43 und 42Sp50 zu analysieren.

In somatischen Zellen kam es zu einer Umverteilung von 42Sp50. Das weitgehend zytoplasmatische Protein akkumuliert bei einer Koexpression mit 42Sp43 in den Nukleolen. Diese Beobachtung überraschte, da bekannt war, dass EF1A-Proteine normalerweise rasch aus dem Nukleoplasma entfernt werden und nur zytoplasmatisch vorliegen (Bohnsack et al. und Calado et al., 2002). Bei 42Sp43 und 42Sp50 handelt es sich allerdings um Proteine, die nicht in somatischen Kulturzellen vorkommen. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass 42Sp50 das Nukleolus-spezifische Protein 42Sp43 bindet und sozusagen „huckepack“ in den Zellkern bzw. Nukleolus importiert wird. Alternativ dazu könnte eine geringe, nicht sichtbare Menge an 42Sp50 Molekülen immer im Kern vorliegen und durch die Interaktion mit einem endogenen Bindungspartner in den Nukleolen immobilisiert werden. Diese Hypothese würde zusätzlich das Nukleolussignal erklären, das auch in einer gewissen Anzahl von Zellen zu beobachten war, die nur 42Sp50-Fusionsprotein exprimierten. 42Sp43 stellt aufgrund des gemeinsamen Vorkommens im 42S RNPs wahrscheinlich einen starken Bindungspartner da. Deswegen kommt es bei Koexpression von 42Sp50 und 42Sp43 in Kulturzellen zu einer starken Interaktion der beiden Proteine und 42Sp50 akkumuliert im Nukleolus. Ähnliches wurde für EF1A und dessen Bindungspartner ZPR1 in Säugerzellen beobachtet. Hier wurde gezeigt, dass ZPR1 in mitotischen Säugerzellen im Zellkern vorliegt. Das Protein interagiert mit EF1A im Zytoplasma und importiert es „huckepack“ in das Nukleoplasma. Das sonst ausschließlich zytoplasmatisch vorkommende EF1A konnte dort im Nukleus nachgewiesen werden (Gangwani et al., 1998).

Nachdem Interaktionen zwischen 42Sp43 und 42Sp50 nachgewiesen werden konnten, stellte sich die interessante Frage, ob die Koexpression der beiden Proteine die Bildung von 42S RNPs induzierte. Diese Vermutung konnte durch licht- und elektronenmikroskopische Analysen nicht geklärt werden, weshalb weitere Experimente nötig sind, um die Fragestellung zu beantworten.

Die Proteininteraktion zwischen 42Sp43 und 42Sp50 konnte auch in prävitellogenen *Xenopus* Oozyten erstmals nachgewiesen werden. Wurde 42Sp50 mit 42Sp43 koexprimiert, so wurde 42Sp43 im Zytoplasma angereichert und größtenteils von den Nukleolen ausgeschlossen. Dieses Ergebnis unterschied sich deutlich von den Beobachtungen in somatischen Zellen und es wurden verschiedene Gründe zur Erklärung in Erwägung gezogen. Am Wahrscheinlichsten erscheint die Möglichkeit, dass sich 42Sp43 bereits im Zytoplasma zusammen mit 42Sp50 und RNA Komponenten zu funktionellen 42S RNPs zusammensetzt. Da die Proteine und die 5S rRNA des 42S RNPs oozytenspezifische Moleküle darstellen, wäre es denkbar, dass dieser Vorgang nur in Oozyten und nicht in somatischen Zellen stattfindet, weshalb 42Sp43 den Bindungspartner 42Sp50 nur in Kulturzellen in den Kern koimportiert. Es wäre zum anderen aber auch denkbar, dass die Koexpression das Assembly von 42S RNPs auf der zytoplasmatischen Seite der Kernporen verstärkt, wodurch die Menge an 42Sp43 in den amplifizierten Nukleolen verringert wird. Die Koexpressionen von EF1A-1 bzw. EF1A-2 mit 42Sp43 in prävitellogenen Oozyten dienen als Kontrollexperimente. Es waren hierbei nur geringe Protein-Interaktionen zu beobachten, da es kaum zu einer Umverteilung kam.

Die drei *Xenopus* Isoformen weisen hohe Übereinstimmungen ihrer Aminosäuresequenzen und ihrer Konformationen auf. Dennoch muss es zwischen den somatischen Formen EF1A-1 bzw. EF1A-2 und 42Sp50 Bereiche geben, die sich funktionell voneinander unterscheiden. Diese Bereiche in der Aminosäuresequenz von 42Sp50 sind für die spezifische Interaktion mit 42Sp43 verantwortlich. Um diese zu identifizieren sind weiterführende Experimente nötig.

Eine Möglichkeit wäre, spezifische 42Sp50-Sequenzen zu mutieren oder deletieren und die Interaktion dieser modifizierten Proteine mit den bereits beschriebenen zu vergleichen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Arbeit ein in vivo Modellsystem beschrieben ist, mit dem Interaktionen zwischen den beteiligten Proteinen durch Kern-Zytoplasma-Umverteilungen direkt sichtbar gemacht werden können.

7. Literaturverzeichnis

- Abdallah et al.** (1991). Germ cell-specific expression of a gene encoding eukaryotic translation elongation factor 1 alpha (eEF-1 alpha) and generation of eEF-1 alpha retropseudogenes in *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**: 9277-9281.
- Achsel et al.** (1999). A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'-end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation *in vitro*. *EMBO J.* **18**: 5789-5802.
- Achsel et al.** (2001). The Sm domain is an ancient RNA-binding motif with oligo(U) specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**: 3685-3689.
- Adams et al.** (1992). Differential expression of translation-associated genes in benign and malignant human breast tumours. *Br. J. Cancer*. **65**: 65-71.
- Alarcon V.B. and Elinson R.P.** (2001). RNA anchoring in the vegetal cortex of the *Xenopus* oocyte. *J. Cell Sci.* **114**: 1731-1741.
- Allen et al.** (2003). Identification and characterization of the Xlsirt cis-acting RNA localization element. *Differentiation*. **71**: 311-321.
- Allison et al.** (1991). RNA-protein interactions of stored 5S rRNA with TFIIIA and ribosomal protein L5 during *Xenopus* oogenesis. *Dev. Biol.* **144**: 129-144.
- Allison et al.** (1993). Structural requirements of 5S rRNA for nuclear transport, 7S ribonucleoprotein particle assembly, and 60S ribosomal subunit assembly in *Xenopus* oocytes. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 6819-6831.
- Allison et al.** (1995). Differential Binding of Oocyte-Type and Somatic-Type 5S rRNA to TFIIIA and Ribosomal Protein L5 in *Xenopus* Oocytes: Specialization for Storage versus Mobilization. *Dev. Biol.* **168**: 284-295.
- Al-Mukhtar K.A.K. and Webb A.C.** (1971). An ultrastructural study of primordial germ cells, oogonia and early oocytes in *Xenopus laevis*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **26**: 195-217.
- Anand et al.** (2002). Protein elongation factor EEF1A2 is a putative oncogene in ovarian cancer. *Nat. Genet.* **31**: 301-305.
- Anderson P. and Kedersha N.** (2006). RNA granules. *J. Cell Biol.* **172**: 803-808.
- Ann et al.** (1991). Isolation and characterization of the rat chromosomal gene for a polypeptide (pS1) antigenically related to statin. *J. Biol. Chem.* **266**: 10429-10437.
- Ann et al.** (1992). Characterization of the statin-like S1 and rat elongation factor 1 alpha as two distinctly expressed messages in rat. *J. Biol. Chem.* **267**: 699-702.
- Anne J. and Mechler B.M.** (2005). Valois, a component of the nuage and pole plasm, is involved in assembly of these structures, and binds to Tudor and the methyltransferase Capsuleen. *Development*. **132**: 2167-2177.
- Arkov et al.** (2006). The role of Tudor domains in germline development and polar granule architecture. *Development*. **133**: 4053-4062.
- Barbee et al.** (2002). A novel function for the Sm proteins in germ granule localization during *C. elegans* embryogenesis. *Curr. Biol.* **12**: 1502-1506.
- Bardsley et al.** (1993). Distribution of tudor protein in the *Drosophila* embryo suggests separation of functions based on site of localization. *Development*. **119**: 207-219.
- Bass et al.** (1994). Binding properties of newly identified *Xenopus* proteins containing ds-RNA binding motifs. *Curr. Biol.* **4**: 301-314.
- Bedford M.T. and Richard S.** (2005). Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol. Cell.* **18**(3): 263-72.
- Bedford M.T. and Clarke S.G.** (2009). Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and Why. *Mol. Cell.* **33**: 1-13.
- Beggs J.D.** (2005). LSm proteins and RNA processing. *Biochem. Soc. Trans.* **33**: 433-438.
- Benda C.** (1891). Neue Mitteilungen über die Entwicklung der Genitaldrüsen und die Metamorphose der Samenzellen (Histogenese der Spermatozoen). Verhandlungen der Berliner Physiologischen Gesellschaft. *Arch. Anat. Physiol.* **1891**: 549-552.
- Betley et al.** (2002). A ubiquitous and conserved signal for RNA localization in chordates. *Curr. Biol.* **12**: 1756-1761.

- Betley et al.** (2004). Kinesin II mediates Vg1 mRNA transport in *Xenopus* oocytes. *Curr. Biol.* **14**: 219-224.
- Biggiogera et al.** (1990). Immunoelectron microscopical visualization of ribonucleoproteins in the chromatoid body of mouse spermatids. *Mol. Reprod. Dev.* **26**: 150-158.
- Bilinski, et al.** (2004). Sm proteins, the constituents of the spliceosome, are components of nuage and mitochondrial cement in *Xenopus* oocytes. *Exp Cell Res.* **299(1)**:171-8.
- Billett F.S. and Adam E.** (1976). The structure of the mitochondrial cloud of *Xenopus laevis* oocytes. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **36**: 697-710.
- Billett F.S. and Adam E.** (2004). The structure of the mitochondrial cloud of *Xenopus laevis* oocytes. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **36**: 697-710.
- Birsoy et al.** (2006). Vg1 is an essential signalling molecule in *Xenopus* development. *Development.* **133**: 15-20.
- Blom N., Gammeltoft S. and Brunak S.** Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* **294(5)**: 1351-1362.
- Bogdanov et al.** (1995). Structure and function of 5S rRNA in the ribosome. *Biochem. Cell Biol.* **73(11-12)**: 869-76.
- Bohnsack et al.,** (2002). Exp5 exports eEF1A via tRNA from nuclei and synergizes with other transport pathways to confine translation to the cytoplasm. *Embo J.* **21(22)**: 6205-6215.
- Boisvert et al.** (2002). Symmetrical dimethylarginine methylation is required for the localization of SMN in Cajal bodies and pre-mRNA splicing. *J. Cell Biol.* **159(6)**: 957-69.
- Boisvert et al.** (2005). Protein interfaces in signaling regulated by arginine methylation. *Sci. STKE.* **2005(271)**: re2.
- Boisvert et al.** (2007). The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8(7)**: 574-85.
- Bourne et al.** (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cellular functions. *Nature.* **348**: 125-132.
- Bourne et al.** (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature.* **349**: 117-127.
- Bouveret et al.** (2000). A Sm-like protein complex that participates in mRNA degradation. *EMBO J.* **19**: 1661-1671.
- Brahms et al.** (2000). The C-terminal RG dipeptide repeats of the spliceosomal Sm proteins D1 and D3 contain symmetrical dimethylarginines, which form a major B-cell epitope for anti-Sm autoantibodies. *J. Biol. Chem.* **275**: 17122-17129.
- Brahms et al.** (2001). Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSM4, and their interaction with the SMN protein. *RNA.* **7**: 1531-1542.
- Brands et al.** (1986). The primary structure of the alpha subunit of human elongation factor 1. Structural aspects of guanine-nucleotide-binding sites. *Eur. J. Biochem.* **155**: 167-171.
- Brody, J.R. and Kern, S.E.** (2004). History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. *Anal. Biochem.* **333 (1)**: 1-13.
- Browne G.J. and Proud C.G.** (2002). Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* **269**: 5360-5368.
- Bubunenko et al.** (2002). A consensus RNA signal that directs germ layer determinants to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Dev. Biol.* **248**: 82-92.
- Buhler et al.** (1999). Essential role for the tudor domain of SMN in spliceosomal U snRNP assembly: implications for spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **8**: 2351-2357.
- Calado et al.** (2002). Exportin-5-mediated nuclear export of eukaryotic elongation factor 1A and tRNA. *EMBO J.* **21(22)**: 6216-6224.
- Carneiro et al.** (1999). The eEF1A gene family is differentially expressed in maize endosperm. *Plant Mol. Biol.* **41**: 801-813.
- Cavallius J. and Meverick W.C.** (1992). Nucleotide sequence of rabbit elongation factor-1 alpha cDNA. *Nucleic Acids Res.* **20**: 1422.
- Chan et al.** (1999). fatvg encodes a new localized RNA that uses a 25-nucleotide element (FVLE1) to localize to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Development.* **126**: 4943-4953.
- Chan et al.** (2001). The vegetally localized mRNA fatvg is associated with the germ plasm in the early embryo and is later expressed in the fat body. *Mech. Dev.* **100**: 137-140.

- Chang et al.** (2004). Localization of RNAs to the mitochondrial cloud in *Xenopus* oocytes by entrapment and association with endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell.* **15**: 4669-4681.
- Chari et al.** (2008). An assembly chaperone collaborates with the SMN complex to generate spliceosomal SnRNPs. *Cell.* **135(3)**: 497-509.
- Chen et al.** (2000). Rapid up-regulation of peptide elongation factor EF-1 α protein levels is an immediate early event during oxidative stress-induced apoptosis. *Exp. Cell Res.* **259**: 140-148.
- Choo et al.** (2005). Evidence for common machinery utilized by the early and late RNA localization pathways in *Xenopus* oocytes. *Dev. Biol.* **278**: 103-117.
- Chuma et al.** (2003). Mouse Tudor Repeat-1 (MTR-1) is a novel component of chromaoid bodies/nuage in male germ cells and forms a complex with snRNPs. *Mech. Dev.* **120**: 979-990.
- Chung, C.T., Niemela, S. L. and Miller, R. H.** (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**: 2172-5.
- Claußen M., Horvay K. and Pieler T.** (2004). Evidence for overlapping, but not identical, protein machineries operating in vegetal RNA localization along early and late pathways in *Xenopus* oocytes. *Development.* **131**: 4263-4273.
- Coggins L.W.** (1973). An ultrastructural and radioautographic study of early oogenesis in the toad *Xenopus laevis*. *J. Cell Sci.* **12**: 71-93.
- Corpet F.** (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* **16(22)**: 10881-10890.
- Coté J. and Richard S.** (2005). Tudor Domains Bind Symmetrical Dimethylated Arginines. *J. Biol. Chem.* **280**: 28476-28483.
- Cox R.T. and Spradling A.C.** (2003). A Balbiani body and the fusome mediate mitochondrial inheritance during *Drosophila* oogenesis. *Development.* **130**: 1579-1590.
- Czolowska R.** (1969). Observations on the origin of the "germinal cytoplasm" in *Xenopus laevis*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **22**: 229-251.
- Danilchik M.V. and Gerhart J.C.** (1987). Differentiation of the animal/vegetal axis in *Xenopus laevis* oocytes. I. Polarized intracellular translocation of platelets establishes the yolk gradient. *Dev. Biol.* **122**: 101-112.
- Daoust R. and Clermont Y.** (1955). Distribution of nucleic acids in germ cells during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *American Journal of Anatomy.* **96**: 255-283.
- Deschamps et al.** (1991). Two forms of elongation factor 1 α (EF1A O and 42Sp50), present in oocytes, but absent in somatic cells of *Xenopus laevis*. *J. Cell Biol.* **114(6)**: 1109-11.
- Denis H. and Le Maire M.** (1983). Thesaurisomes, a novel kind of nucleoprotein particles. *Subcell. Biochem.* **9**: 263-297.
- Denis H. and Wegnez M.** (1977). Biochemical research on oogenesis. Oocytes of *Xenopus laevis* synthesize but do not accumulate 5S rRNA of somatic type. *Dev. Biol.* **58**: 212-217.
- Denis et al.** (1980). Biochemical research on oogenesis. The storage particles of the teleost fish *Tinca tinca*. *Dev. Biol.* **77**: 218-223.
- De Smedt et al.** (2000). The Balbiani body: asymmetrie in the mammalian oocyte. *Genesis.* **26**: 208-212.
- Deshler et al.** (1997). Localization of *Xenopus* Vg1 mRNA by vera protein and the endoplasmic reticulum. *Science.* **276**: 1128-1131.
- Deshler et al.** (1998). A highly conserved RNA-binding protein for cytoplasmic mRNA localization in vertebrates. *Curr. Biol.* **8**: 489-496.
- Dever et al.** (1987). GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 1814-1818.
- D'Herde et al.** (1995). Homology between mitochondriogenesis in the avian and amphibian oocyte. *Reprod. Nutr. Dev.* **35**: 305-311.
- De Robertis E. M. and Sasai, Y.** (1996). A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. *Nature.* **380**: 37-40.
- De Sa, R. O. and Hillis, D. M.** (1990). Phylogenetic relationships of the pipid frogs *Xenopus* and *Silurana*: an integration of ribosomal DNA and morphology. *Mol Biol Evol.* **7**: 365-76.

- De Smedt et al.** (2000). The Balbiani body: asymmetry in the mammalian oocyte. *Genesis*. **26**: 208-212.
- Dixon K.E.** (1994). Evolutionary aspects of primordial germ cell formation. *Ciba Found. Symp.* **182**: 92-120.
- Dje et al.** (1990). Three genes under different developmental control encode elongation factor 1-alpha in *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Res.* **18**: 3489-3493.
- Doenecke D. and Alonso A.** (1996). Organization and expression of the developmentally regulated H1(0) gene in vertebrates. *Int. J. Dev. Biol.* **40(1)**: 395-401.
- Doyle et al.** (2002). The distribution of RNA polymerase II largest subunit (RPB1) in the *Xenopus* germinal vesicle. *J. Struct. Biol.* **140(1-3)**: 154-66.
- Drew et al.** (1995). Cloning and expression analysis of a human cDNA homologous to *Xenopus* TFIIIA. *Gene*. **159**: 215-218.
- Duesberg J.** (1908). Les divisions des spermatocytes chez les rat (mus *decumanas* Pall., varietee *albinos*). *Arch. Zellforsch.* **1**: 399-449.
- Dumont, J. N.** (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). *J. Morphol.* **136**: 153-180.
- Durso N.A. and Cyr R.J.** (1994). A calmodulin-sensitive interaction between microtubules and a higher plant homolog of elongation factor-1 alpha. *Plant Cell*. **6**: 893-905.
- Duttaroy et al.** (1998). Apoptosis rate can be accelerated or decelerated by overexpression or reduction of the level of elongation factor-1 alpha. *Exp. Cell Res.* **238**: 168-176.
- Eddy E.M.** (1975). Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *Int. Rev. Cytol.* **43**: 229-280.
- Edmonds et al.** (1996). Elongation factor-1 alpha is an overexpressed actin binding protein in metastatic rat mammary adenocarcinoma. *J. Cell. Sci.* **109**: 2705-2714.
- Ejiri S.** (2002). Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**: 1-21.
- Ephrussi A. and Lehmann R.** (1992). Induction of germ cell formation by *oskar*. *Nature*. **358**: 387-392.
- ExpPASy**: [http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html]
- Fawcett et al.** (1970). Observations on the fine structure and relationship of the chromatoid body in mammalian spermatogenesis. *Biol. Reprod.* **2**: 129-153.
- Findley et al.** (2003). Maelstrom a *Drosophila* spindle-class gene, encodes a protein that colocalizes with Vasa and RDE1/AGO1 homolog, Aubergine, in nuage. *Development*. **130**: 859-871.
- Fischer A.** (1899). Fixirung, Färbung und Bau des Protoplasmas. *Fischer, Jena*.
- Fischer U. and Luhrmann R.** (1990). An essential signaling role for the m³G cap in the transport of U1 snRNPs to the nucleus. *Science*. **249**: 786-790.
- Fischer et al.** (1997). The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNPs biogenesis. *Cell*. **90**: 1023-1029.
- Forristall et al.** (1995). Patterns of localization and cytoskeletal association of two vegetally localized RNAs, Vg1 and Xcat-2. *Development*. **121**: 201-208.
- Friesen et al.** (2001a). The methylosome, a 20S complex containing JBP1 and pICln, produces dimethylarginine-modified Sm proteins. *Mol. Cell Biol.* **21(24)**: 8289-8300.
- Friesen et al.** (2001b). SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets. *Mol. Cell*. **7**: 1111-1117.
- Fujiwara et al.** (1994). Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila* vasa and its specific expression in germ cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**: 12258-12262.
- Gall et al.** (1999). Assembly of the Nuclear Transcription and Processing Machinery: Cajal Bodies (Coiled Bodies) and Transcriptosomes. *Mol. Biol. Cell*. **10**: 4385-4402.
- Gao et al.** (1997). Structure and transcription of the gene for translation elongation factor 1 subunit alpha of zebrafish (*Danio rerio*). *Biochim. Biophys. Acta*. **1350**: 1-5.
- Gangwani et al.** (1998). Interaction of ZPR1 with Translation Elongation Factor-1 α in Proliferating Cells. *J. Cell Biol.* **143(6)**: 1471-1484.
- Gard D.** (1991). Organization, nucleation and acetylation of microtubules in *Xenopus laevis* oocytes. a study by confocal immunofluorescence microscopy. *Dev. Biol.* **143**: 346-362.

- Gary J.D. and Clarke S.** (1998). RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **61**: 65-131.
- Gilbert S. F.** (2003). *Developmental Biology* (Seventh Edition).
- Ginsberg et al.** (1984). Xenopus 5S gene transcription factor, TFIIIA: characterization of a cDNA clone and measurement of RNA levels throughout development. *Cell.* **39**: 479-489.
- Gonsalvez et al.** (2006). The Sm-Protein Methyltransferase, Dart5, Is Essential for Germ-Cell Specification and Maintenance. *Curr. Biol.* **16**: 1077-1089.
- Grant et al.** (1992). Differential screening of a human pancreatic adenocarcinoma lambda gt11 expression library has identified increased transcription of elongation factor EF-1 alpha in tumour cells. *Int. J. Cancer.* **50**: 740-745.
- Graydon et al.** (2006). The Sm-Protein Methyltransferase, Dart5, Is Essential for Germ-Cell Specification and Maintenance. *Curr. Biol.* **16**: 1077-1089.
- Gross S.R. and Kinzy T.G.** (2005). Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12(9)**: 772-8.
- Gross S.R. and Kinzy T.G.** (2007). Improper organization of the actin cytoskeleton affects protein synthesis and initiation. *Mol. Cell Biol.* **27(5)**: 1974-89.
- Großhans et al.** (2000). Review: Transport of tRNA out of the Nucleus-Direct Channelling to the Ribosome? *J. Struct. Biol.* **129**: 288-294.
- Guraya S.S.** (1979). Recent advances in the morphology, cytochemistry, and function of Balbiani's vitelline body in animal oocytes. *Int. Rev. Cytol.* **59**: 249-321.
- Gurdon J. B.** (1991). Nuclear transplantation in *Xenopus*. *Methods Cell Biol.* **36**: 299-309.
- Han et al.** (1995). Testis-Brain RNA-Binding Protein, a Testicular Translational Regulatory RNA-Binding Protein, Is Present in the Brain and Binds to the 3'-Untranslated Regions of Transported Brain mRNAs. *Biol. Reprod.* **53(3)**: 707-17.
- Hanas et al.** (2002). cDNA cloning, DNA binding and evolution of mammalian transcription factor IIIA. *Gene.* **282**: 43-52.
- Hausen P. and Riebesell M.** (1991). The early development of *Xenopus laevis*. Springer-Verlag, Heidelberg-New York.
- Heasman et al.** (1984). The mitochondrial cloud of *Xenopus* oocytes. The source of germinal granule material. *Dev. Biol.* **105**: 458-469.
- Hebert et al.** (2002). Coilin methylation regulates nuclear body formation. *Dev. Cell.* **3**: 329-337.
- Hirsch, N., Zimmerman, L. B. and Grainger, R. M.** (2002). *Xenopus*, the next generation: X. tropicalis genetics and genomics. *Dev Dyn.* **225**: 422-33.
- Hock et al.** (2006). Expression of HMGA2 variants during oogenesis and early embryogenesis of *Xenopus laevis*. *Eur. J. Cell. Biol.* **85(6)**: 519-28.
- Honda B.M. and Roeder R.G.** (1980). Association of a 5S gene transcription factor with 5S RNA and altered levels of the factor during cell differentiation. *Cell.* **22**: 119-126.
- Housten D.W. and King M.L.** (2000a). Germ plasm and molecular determinants of germ cell fate. *Curr. Top. Dev. Biol.* **50**: 155-181.
- Housten D.W. and King M.L.** (2000b). A critical role for Xdazl, a germ-plasm-localized RNA, in the differentiation of primordial germ cells in *Xenopus*. *Development.* **127**: 447-456.
- Houston et al.** (1998). A *Xenopus* DAZ-like gene encodes an RNA component of germ plasm and is functional homologue of *Drosophila* boule. *Development.* **125**: 171-180.
- Hovemann et al.** (1988). Two genes encode related cytoplasmic elongation factors 1 alpha (EF-1 alpha) in *Drosophila melanogaster* with continuous and stage specific expression. *Nucleic Acids Res.* **16**: 3175-3194.
- Hudson C. and Woodland H.R.** (1998). Xpat, a gene expressed specifically in germ plasm and primordial germ cells of *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* **73**: 190-198.
- Hughes, M. K. and Hughes, A. L.** (1993). Evolution of duplicate genes in a tetraploid animal, *Xenopus laevis*. *Mol Biol Evol.* **10**: 1360-9.
- Iida T. and Kobayashi S.** (1998). Essential role of mitochondrially encoded large rRNA for germ-line formation in *Drosophila* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 11274-11278.
- Ikenishi et al.** (1996). Spatio-temporal distribution of the protein of *Xenopus* vasa homologue (*Xenopus* vasa-like gene, XVLG1) in embryos. *Develop. Growth Differ.* **38**: 527-535.

- Ikenishi et al.** (1998). Germ plasm in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and *Xenopus*. *Develop. Growth Differ.* **40**: 1-10.
- Infante et al.** (2008). Molecular characterization and expression analysis of five different elongation factor 1 alpha genes in the flatfish *Senegalese sole* (*Solea senegalensis* Kaup): Differential gene expression and thyroid hormones dependence during metamorphosis. *BMC Mol. Biol.* **9**: 19.
- Jeffery C.J.** (1999). Moonlighting proteins. *Trends Biotechnol. Sci.* **24**: 8-11.
- Johnson et al.** (1984). Distribution and utilization of 5 S-RNA-binding proteins during the development of *Xenopus* oocytes. *Eur. J. Biochem.* **144**: 503-508.
- Johnstone O. and Lasko P.** (2001). Translational regulation and RNA localization in *Drosophila* oocytes and embryos. *Annu. Rev. Genet.* **35**: 365-406.
- Joho et al.** (1990). A finger protein structurally similar to TFIIIA that binds exclusively to 5S RNA in *Xenopus*. *Cell.* **61**: 293-300.
- Joseph E.M. and Melton D.A.** (1998). Mutant Vg1 ligands disrupt endoderm and mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Development.* **125**: 2677-2685.
- Kahns et al.** (1998). The elongation factor 1A-2 isoform from rabbit: cloning of the cDNA and characterization of the protein. *Nucleic Acids Res.* **26**: 1884-1890.
- Kalt, M. R.** (1973). Ultrastructural observations on the germ line of *Xenopus laevis*. *Z. Zellforsch.* **188**: 41-62.
- Kalt M.R. and Pinney H.E. and Graves K.** (1975). Inhibitor Induced Alterations of Chromatoid Bodies in Male Germ Line Cells of *Xenopus laevis*. *Cell Tiss. Res.* **161(2)**: 193-210.
- Kashikawa et al.** (2001). Mitochondrial small ribosomal RNA is a component of germinal granules in *Xenopus* embryos. *Mech. Dev.* **101**: 71-77.
- Kato M.V.** (1999). The mechanisms of death of an erythroleukemic cell line by p53: involvement of the microtubule and mitochondria. *Leuk. Lymphoma.* **33**: 181-186.
- Kato et al.** (1997). Upregulation of the elongation factor-1 alpha gene by p53 in association with death of an erythroleukemic cell line. *Blood.* **90**: 1373-1378.
- Kaur K. and Ruben L.** (1994). Protein translation elongation factor-1 alpha from *Trypanosoma brucei* binds calmodulin. *J. Biol. Chem.* **269**: 23045-23050.
- Kerr J. B. and Dixon, D.E.** (1974). An ultrastructural study of germ plasm in spermatogenesis of *Xenopus laevis*. *J. Embryol. exp. Morph.* **82**: 573-592.
- Khacho et al.** (2008). eEF1A Is a Novel Component of the Mammalian Nuclear Protein Export Machinery. *Mol. Biol. Cell.* **19**: 5296-5308.
- Khalyfa et al.** (2001). Characterizing of elongation factor-1A (eEF1A-1) and eEF1A-2/S1 protein expression in normal and wasted mice. *J. Biol. Chem.* **276**: 22915-22922.
- Kim et al.** (1999) The SH2-SH2-SH3 domain of phospholipase C-gamma 1 directly binds to translational elongation factor-1-alpha. *Mol. Cells.* **9**: 631-637.
- King M. L.** (1995). mRNA localization during frog oogenesis. In *Localized RNAs* (Lipshitz, H.D., ed). pp. 137-148, R.G. Landes, Austin, TX, USA.
- King et al.** (1999). *Xcat2* RNA is a translationally sequestered germ plasm component in *Xenopus*. *Mech. Dev.* **84(1-2)**: 75-88.
- King et al.** (2005). Putting RNAs in the right place at the right time: RNA localization in the frog oocyte. *Biol. Cell.* **97**: 19-33.
- Kinoshita et al.** (1999). cDNA cloning of polypeptide chain elongation factor 1 α from medaka *Oryzias latipes*. **65**: 133-137.
- Klein et al.** (2002). Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NIH *Xenopus* initiative. *Dev. Dyn.* **225(4)**: 384-91.
- Kloc M. and Etkin L.D.** (1994). Delocalization of Vg1 mRNA from the vegetal cortex in *Xenopus* oocytes after destruction of Xlirt RNA. *Science.* **265**: 1101-1103.
- Kloc M. and Etkin L.D.** (1995). Two distinct pathways for the localization of RNAs at the vegetal cortex in *Xenopus* oocytes. *Development.* **121**: 287-297.
- Kloc M. and Etkin L.D.** (1998). Apparent continuity between the messenger transport organizer and late RNA-localization pathways during oogenesis in *Xenopus*. *Mech. Dev.* **73**: 95-106.
- Kloc M. and Etkin L.D.** (2005). RNA localization mechanisms in oocytes. *J. Cell Sci.* **118**: 269-282.

- Kloc et al.** (1993). Translocation of repetitive RNA sequences with the germ plasm in *Xenopus* oocytes. *Science*. **262**: 1712-1714.
- Kloc et al.** (1996). Elaboration of the messenger transport organizer pathway for localization of RNA to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. **180(1)**: 119-30.
- Kloc et al.** (2000). The targeting of *Xcat2* mRNA to the germinal granules depends on *cis-acting* germinal granule localization element within the 3'UTR. *Dev. Biol.* **217**: 221-229.
- Kloc et al.** (2001a). RNA localization and germ cell determination in *Xenopus*. *Int. Rev. Cytol.* **203**: 63-91.
- Kloc et al.** (2001b). Mitochondrial ribosomal RNA in the germinal granules in *Xenopus* embryos-revisited. *Differentiation*. **67**: 80-83.
- Kloc et al.** (2002a). Mechanisms of RNA localization. *Cell*. **108**: 533-544.
- Kloc et al.** (2002b). Three-dimensional ultrastructural analysis of RNA distribution within germinal granules of *Xenopus*. *Dev. Biol.* **241**: 79-93.
- Kloc et al.** (2004a). The Balbiani Body and Germ Cell Determinants: 150 Years Later. *Curr. Top. Dev. Biol.* **59**: 1-36.
- Kloc et al.** (2004b). Formation, architecture and polarity of female germline cyst in *Xenopus*. *Dev. Biol.* **266**: 43-61.
- Kloetzel, P.-M., Whitfield, W. and Sommerville, J.** (1981). Analysis and reconstruction of an RNP particle which stores 5S RNA and tRNA in amphibian oocytes. *Nucl. Acids Res.* **9(3)**: 605-21.
- Knaut et al.** (2000). Zebrafish vasa RNA but not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification. *J. Cell Biol.* **149(4)**: 875-88.
- Knudsen et al.** (1993). Tissue-dependent variation in the expression of elongation factor-1 alpha isoforms: isolation and characterization of a cDNA encoding a novel variant of human elongation-factor 1 alpha. *Eur. J. Biochem.* **215**: 549-554.
- Kobayashi et al.** (1993). Presence of mitochondrial large ribosomal RNA outside mitochondria in germ plasm of *Drosophila melanogaster*. *Science*. **260**: 1521-1524.
- Kobayashi et al.** (1998). Localization of mitochondrial large ribosomal RNA in germ plasm of *Xenopus* embryos. *Curr. Biol.* **8**: 1117-1120.
- Kotaja et al.** (2006). The chromatoid body of male germ cells: similarity with P-bodies and presence of Dicer and microRNA components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**: 2647-2652.
- Kouzarides T.** (2002). Histone methylation in transcriptional control. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12(2)**: 198-209.
- Krieg et al.** (1989). The mRNA encoding elongation factor 1-alpha (EF-1 alpha) is a major transcript at the midblastula transition in *Xenopus*. *Dev. Biol.* **133**: 93-100.
- Krimer D.B. and Esponda P.** (1980). Presence of polysaccharides and proteins in the chromatoid body of mouse spermatids. *Cell Biology International Reports*. **4**: 265-270.
- Krohne, G. and Franke, W. W.** (1980). Immunological identification and localization of predominant nuclear protein of the amphibian oocyte nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77(2)**: 1034-1038.
- Krohne, G. and Franke, W. W.** (1983). Proteins of pore complex-lamina structures from nuclei and nuclear membranes. *Meth. Enzymol.* **96**: 597-608.
- Kubarenko et al.** (2005). GTPases of translational apparatus. *Mol. Biol.* **39**: 746-761.
- Kyhse-Anderson J.** (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffertank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose. *J Biochem Biophys.* **10**: 203-209.
- Lamond A.I. and Spector D.L.** (2003). Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4(8)**: 605-12.
- Lee et al.** (1992). Tissue-specific expression in mammalian brain, heart, and muscles of S1, a member of the elongation factor-1 alpha gene family. *J. Biol. Chem.* **267**: 24064-24068.
- Lee et al.** (1993). Differential expression of S1 and elongation factor-1 alpha during rat development. *J. Biol. Chem.* **268**: 24453-24459.
- Lee et al.** (1994). Cloning of human and mouse brain cDNAs coding for S1, the second member of the mammalian elongation factor-1 alpha gene family: analysis of a possible evolutionary pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**: 1371-1377.
- Lee et al.** (2005). PRMT7, a New Protein Arginine Methyltransferase That Synthesizes Symmetric Dimethylarginine. *J. Biol. Chem.* **280**: 3656-3664.

- Lehmann R. and Nüsslein-Volhard C.** (1991). The maternal gene *nanos* has a central role in pattern formation of the *Drosophila* embryo. *Development*. **112**: 679-691.
- Le Maire M. and Denis H.** (1987). Biochemical research on oogenesis. Binding of tRNA to the nucleoprotein particles of *Xenopus laevis* previtellogenic oocytes. *J. Biol. Chem.* **262**: 654-659.
- Lenhossek M.** (1898). Untersuchungen über Spermatogenese. *Arch. Mikroskop. Anat.* **51**: 215-318.
- Li, B., Pilcher, K. Y., Wyman, T. E. and Machida, C. A.** (1997). Rapid preparation and identification of insertcontaining recombinant plasmid DNA. *Biotechniques*. **23**: 603-6, 608.
- Liang et al.** (1994). Localization of vasa protein to the *Drosophila* pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities. *Development*. **120(5)**: 1201-11.
- Liu et al.** (1997). The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated proteins SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNPs. *Cell*. **90**: 1013-1021.
- Liu et al.** (2002). Interactions of Elongation Factor 1A with F-Actin and β -Actin-mRNA: Implications for Anchoring mRNA in Cell Protrusions. *Mol. Biol. Cell*. **13**: 579-592.
- Lu X.A. and Werner D.** (1989). The complete cDNA sequence of mouse elongation factor 1 alpha (EF 1 alpha) mRNA. *Nucleic Acids Res.* **17**: 442.
- Lund et al.** (1996). Assignment of human elongation factor 1 alpha genes: EEF1A maps to chromosome 6q14 and EEF1A2 to 20q13.3. *Genomics*. **36**: 359-361.
- MacArthur et al.** (1999). Xcat2 RNA is a translationally sequestered germ plasm component in *Xenopus*. *Mech. Dev.* **84**: 75-88.
- Madsen et al.** (1990). Retropseudogenes constitute the major part of the human elongation factor 1 alpha gene family. *Nucleic Acids Res.* **18**: 1513-1516.
- Mahowald A.P.** (1971). Origin and continuity of polar granules. In *origin and Continuity of Cell Organelles*. (ed. J. Reichert and H. Ursprung), pp. **159-169**. New York: Springer-Verlag.
- Mahowald A.P.** (2001). Assembly of the *Drosophila* germ plasm. *Int. Rev. Cytol.* **203**: 187-213.
- Marchler-Bauer A. and Bryant S.H.** (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucl. Acids Res.* **32(W)**: 327-331.
- Marchler-Bauer et al.** (2005). CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucl. Acids Res.* **33(D)**: 192-196.
- Marchler-Bauer et al.** (2007). CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucl. Acids Res.* **35(D)**: 237-240.
- Marlow F. L. and Mullins M.C.** (2008). Bucky ball functions in Balbiani body assembly and animal-vegetal polarity in the oocyte and follicle layer in zebrafish. *Dev. Biol.* **321**: 40-50.
- Mairy M. and Denis H.** (1971) Recherches biochimiques sur l'oogenèse. Synthèse et accumulation du RNA pendant l'oogenèse du crapaud sud-africain *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **24**: 143-165.
- Mairy M. and Denis H.** (1972). Biochemical studies on oogenesis. 2. Ribosome assembly during the development of oocytes in *Xenopus laevis*. *Eur. J. Biochem.* **25**: 534-543.
- Mais et al.** (2002). On the formation of amplified nucleoli during early *Xenopus* oogenesis. *J. Struct. Biol.* **140**: 214-226.
- Malcolm D.B. and Sommerville J.** The structure of nuclear ribonucleoprotein of amphibian oocytes. *J. Cell Sci.* **24**: 143-165.
- Mansilla et al.** (2008). Translation Elongation Factor eEF1A Binds to a Novel Myosin Binding Protein-C-Like Protein. *J. Cell. Biochem.* **105**: 847-858.
- Marchler-Bauer et al.** (2007), CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res.* **35(D)**237-240.
- Marinos E. and Billett F.S.** (1981). Mitochondrial number, cytochrome oxidase and succinic dehydrogenase activity in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **62**: 395-409.
- Matova N. and Cooley L.** (2001). Comparative Aspects of Animal Oogenesis. *Dev. Biol.* **231(2)**: 291-320.
- Massenet et al.** (2002). The SMN complex is associated with snRNPs throughout their cytoplasmic assembly pathway. *Mol. Cell Biol.* **22(18)**:6533-41.
- Mattaj et al.** (1983). Nuclear exclusion of transcription factor IIIA and the 42s particle transfer RNA-binding protein in *Xenopus* oocytes: a possible mechanism for gene control? *J. Cell Biol.* **97(4)**: 1261-5.

- Mattaj I.W. and De Robertis E.M.** (1985). Nuclear segregation of U2 snRNA requires binding of specific snRNP proteins. *Cell*. **40**: 111-118.
- Mattaj et al.** (1987). 42S p48--the most abundant protein in previtellogenic *Xenopus* oocytes--resembles elongation factor 1 alpha structurally and functionally. *EMBO J.* **6**: 2409-2413.
- Mattaj I.W.** (1988). *Structure and Function of Major and Minor Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles* (ed. Birnstiel, M.) 100-114(Springer-Verlag, Berlin/New York).
- Mathieu et al.** (2003). Identification and characterization of transcription factor IIIA and ribosomal protein L5 from *Arabidopsis thaliana*. *Nucl. Acid Res.* **31(9)**: 2424-2433.
- Mazabraud et al.** (1975). Biochemical research on oogenesis: RNA accumulation in the oocytes of teleosts. *Dev. Biol.* **44(2)**: 326-332.
- McBride A.E. and Silver P.A.** (2001). State of the arg: Protein methylation at arginine comes of age. *Cell*. **106**: 5-8.
- Meister G., Eggert C. and Fischer U.** (2002). SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story. *Trend Cell Biol.* **12(10)**: 472-478.
- Meister G. and Fischer U.** (2002). Assisted RNP assembly: SMN and PRMT5 complexes cooperate in the formation of spliceosomal UsnRNPs. *EMBO J.* **21(21)**: 5853-5863.
- Meister et al.** (2001). A multiprotein complex mediates the ATP-dependent assembly of spliceosomal U snRNPs. *Nat. Cell Biol.* **3(11)**:945-9.
- Melton.** (1987). Translocation of a localized maternal mRNA to the vegetal pole of *Xenopus* oocytes. *Nature*. **328**: 80-82.
- Mercellin et al.** (1990).
- Mignotte et al.** (1987). Segregation of mitochondria in the cytoplasm of *Xenopus* vitellogenic oocytes. *Biol. Cell.* **60**: 97-102.
- Mikami et al.** (2002). Technical improvement to 2D-PAGE of Rice Organelle Membrane Proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66(5)**: 1170-1173.
- Minella et al.,** (1996). Major intracellular localization of Elongation Factor-1. *Cell. Mol. Biol.* **42(6)**: 805-810.
- Mishra et al.** (2007). Structural insights into the interaction of the evolutionarily conserved ZPR1 domain tandem with eukaryotic EF1A, receptors, and SMN complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104(35)**: 13930-5.
- Misteli T.** (2001). The concept of self-organization in cellular architecture. *J. Cell Biol.* **155(2)**: 181-185.
- Moldave K.** (1985). Eukaryotic protein synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 1109-1149.
- Moore J.E.S.** (1893). Mammalian spermatogenesis. *Anat. Anz.* **8**: 683-688.
- Moore J.E.S.** (1894). Some points in the spermatogenesis of Mammalia. *Intern. Monatsschr. Anat. Physiol.* **11**: 129.
- Mosquera et al.** (1993). A mRNA localized to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes encodes a protein with nanos-like zinc finger. *Development.* **117**: 377-386.
- Moussa et al.** (1994). The immunolocalization of small nuclear ribonucleoprotein particles in testicular cells during the cycle of the seminiferous epithelium of the adult rat. *Cell Tissue Res.* **278**: 363-378.
- MultAlin:** [<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>]
- Murray et al.** (1996). Bundling of Actin Filaments by Elongation Factor 1 α Inhibits Polymerization at Filament Ends. *J. Cell Biol.* **135(5)**: 1309-1321.
- Nagao et al.** (2008). Analysis of the molecular dynamics of medaka nuage proteins by fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence recovery after photobleaching. *FEBS Journal.* **275**: 341-349.
- Najbauer J. and Aswad D.W.** (2001). Diversity of methyl acceptor proteins in rat pheochromocytoma (PC12) cells revealed after treatment with adenosine dialdehyde. *J. Biol. Chem.* **265**: 12717-12721.
- NetPhos 2.0 Server:** [<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>]
- Neumann de Vegvar H.E. and Dahlberg J.E.** (1990). Nucleocytoplasmic transport and processing of small nuclear RNA precursors. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 3365-3375.
- Newport J. and Kirschner M.** (1982). A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: II. Control of the onset of transcription. *Cell.* **30**: 687-696.

- Newton et al.** (1993). N-cadherin mediates Sertoli cell-spermatogenic cell adhesion. *Dev. Dynam.* **197**: 1-13.
- Nieuwkoop P. D. and Faber, J.** (1975). Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). *North- Holland Publ. Comp., Amsterdam*.
- Nieuwkoop P.D.** (1969). The formation of mesoderm in urodelean amphibians. I. Induction by the endoderm. *Roux's Arch. Entw.Mech. Org.* **162**: 341-373.
- O'Donnell et al.** (2008). A Descent into the Nuage: The Maelstrom of Transposon Control. *Dev. Cell.* **15**: 179-181.
- O'Farrell P. H.** (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021.
- O'Farrell, P. H. and Ivarie, R. D.** (1979). The glucocorticoid domain of response: measurement of pleiotropic cellular responses by two-dimensional gel electrophoresis. *Monogr Endocrinol.* **12**: 189-201.
- Olmo, E. and Morescalchi, A.** (1978). Genome and cell sizes in frogs: A comparison with salamanders. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS).* **34**: 44 - 46.
- Pan et al.** (2005). RNF17, a component of the mammalian germ cell nuage, is essential for spermiogenesis. *Development.* **132**: 4029-4039.
- Pannese et al.** (2000). Xotx1 maternal transcripts are vegetally localized in *Xenopus laevis* oocytes. *Mech. Dev.* **90**: 111-114.
- Parvinen M. and Parvinen L.M.** (1979). Active movements of the chromatoid body. A possible transport mechanism for haploid gene products. *J. Cell Biol.* **80**: 621-628.
- Parvinen M.** (2005). The chromatoid body in spermatogenesis. *Int. J. Andr.* **28**: 189-201.
- Paushkin et al.** (2002). The SMN complex, an assemblysome of ribonucleoproteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14(3)**:305-12.
- Pelham H.R.B. and Brown D.D.** (1980). A specific transcription factor that can bind either the 5S RNA gene or 5S RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**: 4170-4174.
- Pellizzoni et al.** (2002). Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly. *Science.* **298(5599)**:1775-9.
- Pepling et al.** (2007). Mouse oocytes within germ cell cysts and primordial follicles contain a Balbiani body. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**: 187-192.
- Picard B. and Wegnez M.** (1979). Isolation of a 7S particle from *Xenopus laevis* oocytes: A 5S rRNA-protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 241-245.
- Picard B., Le Maire M., Wegnez M., and Denis H.** (1980). Biochemical Research on Oogenesis. Composition of the 42-S Storage Particles of *Xenopus laevis* Oocytes. *Eur. J. Biochem.* **109(2)**: 359-68.
- Pitt et al.** (2000). P granules in the germ cells of *Caenorhabditis elegans* adults are associated with clusters of nuclear pores and contain RNA. *Dev. Biol.* **219**: 315-333.
- Polevoda B. and Sherman F.** (2007). Methylation of proteins involved in translation. *Mol. Microbiol.* **65(3)**: 590-606.
- Qin et al.** (2003). Effects of Chinese Domestic Polychlorinated Biphenyls (PCBs) on Gonadal Differentiation in *Xenopus laevis*. *Environ. Health Perspect.* **111(4)**: 553-556.
- Rasar M.A. and Hammes S.R.** (2006). The Physiology of the *Xenopus laevis* Ovary. *Meth. Mol. Biol.* **322**: 17-30.
- Raz E.** (2000). The function and regulation of vasa-like genes in germ cell development. *Genome Biol.* **1**: 1017.1-1017.6.
- Regaud Cl.** (1910). Etudes sur la structure des tubes semineferes et sur la spermatogenese chez les mammiferes. *Arch. Anat. Microscop. Morphol. Exptl.* **11**: 291-431.
- Russel L. and Frank B.** (1978). Ultrastructural characterization of nuage in spermatocytes of the rat testis. *Anat. Rec.* **190**: 79-97.
- Saffman L.L. and Lasko P.** (1999). Germline development in vertebrates and invertebrates. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**: 1141-1163.
- Savage R.M. and Danilchik M.V.** (1993). Dynamics of germ plasm localization and its inhibition by ultraviolet irradiation in early cleavage *Xenopus* embryos. *Dev. Biol.* **157(2)**: 371-82.

- Schumacher et al.** (1995). Spnr, a Murin RNA-binding Protein That Is Localized to Cytoplasmic Microtubules. *J. Cell Biol.* **129**: 1023-1032.
- Selenko et al.** (2001). SMN tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 27-31.
- Seraphin B.** (1995). Sm and Sm-like proteins belong to a large family: identification of proteins of the U6 as well as the U1, U2, U4 and U5 snRNPs. *EMBO J.* **14**: 2089-2098.
- Seto et al.** (1999). *Saccharomyces cerevisiae* telomerase is an Sm small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature.* **401**: 177-180.
- Shain, D. H., Neuman, T. and Zuber, M. X.** (1997). Embryonic expression and evolution of duplicated Eprotein genes in *Xenopus laevis*: parallels with ancestral E-protein genes. *Genetics.* **146**: 345-53.
- Shiina et al.** (1994). Microtubule severing by elongation factor 1 alpha. *Science.* **266**: 282-285.
- Shinomiya et al.** (2000). The *vasa*-like gene, *olvas*, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev. Growth. Differ.* **42**: 317-326.
- Shirasawa et al.** (1992). Nucleotide sequence of rat elongation factor-1 alpha cDNA. *Nucleic Acids Res.* **20**: 909.
- Smith et al.** (1991). Oogenesis and Oocyte Isolation. *Methods Cell Biol.* **36**: 45-60.
- Snee M.J. and MacDonald P.M.** (2004). Live imaging of nuage and polar granules: Evidence against a precursor-product relationship and a novel role for Oskar in stabilization of polar granule components. *J. Cell Sci.* **117**: 2109-2120.
- Soderstrom K.O. and Parvinen M.** (1976). Incorporation of (³H)uridine by the chromatoid body during rat spermatogenesis. *J. Cell Biol.* **70**: 239-246.
- St. Johnston et al.** (1992). A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 10979-10983.
- Strausberg et al.** (2002). Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99(26)**: 16899-16903.
- Tafari S.R. and Wolffe A.P.** (1993). Dual roles for transcription and translation factors in the RNA storage particles of *Xenopus* oocytes. *Trends Cell Biol.* **3(3)**: 94-8.
- Tan E.M. und Kunkel H.G.** (1966). Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* **96**: 464-471.
- Taylor M.A. and Smith L.D.** (1985). Quantitative changes in protein synthesis during oogenesis in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **110**: 230-237.
- Tharun S. and Parker R.** (2001). Targeting an mRNA for decapping: displacement of translation factors and association of the LSm1p-7p complex on deadenylated yeast mRNAs. *Mol. Cell.* **8**: 1075-1083.
- Tharun et al.** (2000). Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay. *Nature.* **404**: 515-518.
- Thomas J.O. and Kornberg R.D.** (1975). An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proc Natl Acad Sci USA.* **72**: 2626-2630.
- Tomlinson et al.** (2005). Translation elongation factor eEF1A2 is a potential oncoprotein that is overexpressed in two-thirds of breast tumours. *BMC Cancer.* **5**: 113.
- Tourte et al.** (1981). Organization and replication activity of the mitochondrial mass of oogonia and previtellogenic oocytes in *Xenopus laevis*. *Dev. Growth Differ.* **23**: 9-21.
- Tourte et al.** (1984). Heterogenous distribution and replication activity of mitochondria in *Xenopus laevis* oocytes. *Eur. J. Cell Biol.* **34**: 171-178.
- Uetsuki et al.** (1989). Isolation and characterization of the human chromosomal gene for polypeptide chain elongation factor-1 alpha. *J. Biol. Chem.* **264**: 5791-5798.
- Van den Eynde et al.** (1989). Biochemical research on oogenesis: RNA accumulation in the oocytes of the newt *Pleurodeles waltl*. *Dev.* **106(1)**: 11-6.
- Ventela et al.** (2003). Intercellular organelle traffic through cytoplasmic bridges in early spermatids of the rat: mechanisms of haploid gene product sharing. *Mol. Biol. Cell.* **14**: 2768-2780.
- Viel et al.** (1990). Elongation Factor 1 α (EF-1 α) Is Concentrated in the Balbiani Body and Accumulates Coordinately with the Ribosomes during Oogenesis of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **141**: 270-278.

- Viel et al.** (1991). Structural and Functional Properties of Thesaurin a (42Sp50), the Major Protein of the 42S Particles Present in *Xenopus laevis* Previtellogenic Oocytes. *J. Biol. Chem.* **266(16)**: 10392-10399.
- von Ebner V.** (1899). Über die Theilung der Spermatozyten bei den Säugethieren. *Sitzungsberichte d. K. Akad. Wiss., math.-naturw. Cl. Abt.3.* **108**: 429.
- Wegnez M. and Denis H.** Biochemical research on oogenesis. Transfer RNA is fully charged in the 42-S storage particles of *Xenopus laevis* oocytes. *Eur. J. Biochem.* **98**: 67-75.
- Wharton R.P. and Struhl G.** (1991). RNA regulatory elements mediate control of *Drosophila* body pattern by posterior morphogen nanos. *Cell.* **67**: 955-967.
- Will C.L. and Luhrmann R.** (2001). Spliceosomal U snRNP biogenesis, structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**: 290-301.
- Wolpert L.** (1999). Entwicklungsbiologie (1. Auflage).
- Yang W. and Boss W.F.** (1994). Regulation of phosphatidylinositol 4-kinase by the protein activator PIK-A49. Activation requires phosphorylation of PIK-A49. *J. Biol. Chem.* **269**: 3852-3857.
- Yang et al.** (1990). Identification of an actin-binding protein from *Dictyostelium* as elongation factor 1A. *Nature.* **347**: 494-496.
- Yisraeli et al.** (1990). A two-step model for the localization of maternal mRNA in *Xenopus* oocytes: involvement of microtubules and microfilaments in the translocation and anchoring of Vg1 RNA. *Development.* **108**: 289-298.
- Yoon Y.R. and Mowry K.L.** (2004). *Xenopus* Staufin is a component of a ribonucleoprotein complex containing Vg1 RNA and kinesin. *Development.* **131**: 3035-3045.
- Zearfoss et al.** (2004). Hermes is a localized factor regulating cleavage of vegetal blastomeres in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **267**: 60-71.
- Zhang et al.** (2001). A biochemical function for the Sm complex. *Mol. Cell.* **7**: 319-329.
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L. and Miller W.** (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* **7(1-2)**:203-14.
- Zhou Y. and King M.L.** (1996). RNA transport to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Dev. Biol.* **179**: 173-183.

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1:	Männlicher und weiblicher <i>Xenopus laevis</i>	6
Abb. 2-2:	Einteilung der Embryogenese	7
Abb. 2-3:	Histologische Schnitte eines <i>Xenopus</i> Hodens	8
Abb. 2-4:	Spermatogenese von <i>Xenopus laevis</i>	8
Abb. 2-5:	Ovarlappen von <i>Xenopus laevis</i>	9
Abb. 2-6:	Schematische Darstellung der Oogenese von <i>Xenopus laevis</i>	10
Abb. 2-7:	Die Oozytenstadien von <i>Xenopus laevis</i>	11
Abb. 2-8:	DIC-Aufnahme einer prävitellogenen <i>Xenopus</i> Oozyte mit dem Bb	13
Abb. 2-9:	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Bbs	14
Abb. 2-10:	Dreidimensionale Rekonstruktion eines Bbs	15
Abb. 2-11:	Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Nuage	18
Abb. 2-12:	Modell zur Entstehung von Germinal Granules	19
Abb. 2-13:	Elektronenmikroskopische Aufnahme einer <i>Xenopus</i> Spermatozyte mit CB	20
Abb. 2-14:	Biogenese der spleißosomalen U snRNPs	22
Abb. 2-15:	Das 42S Ribonukleoproteinpartikel	26
Abb. 2-16:	Schematische Darstellung des 7S bzw. 42S RNPs	26
Abb. 3-1:	Vektorinformation des Plasmidvektors pmRFP-N3	32
Abb. 3-2:	Vektorinformation des pQC-His Vektors von Prof. Zentgraf	32
Abb. 4-1:	Verwendete DNA-Größenmarker	45
Abb. 4-2:	Protein-Größenmarker für die SDS-PAGE	56
Abb. 4-3:	Schematischer Aufbau eines Westernblots	63
Abb. 5-1:	Indirekte Immunfluoreszenzaufnahmen (IV'D4) prävitellogener <i>Xenopus</i> Oozyten am konventionellen Fluoreszenzmikroskop	78
Abb 5-2:	Indirekte Immunfluoreszenzaufnahmen (Nup62) prävitellogener <i>Xenopus</i> Oozyten am konventionellen Fluoreszenzmikroskop	79
Abb. 5-3:	Schnitt durch eine in Polyesterwachs eingebettete prävitellogene Oozyte	81
Abb. 5-4:	Whole-mount Immunlokalisation des Antikörpers IV'D4 an einer prävitellogenen <i>Xenopus</i> Oozyte	81
Abb. 5-5:	Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme einer prävitellogenen <i>Xenopus</i> Oozyte	81
Abb. 5-6:	Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Kernhüllenregion von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	82
Abb. 5-7:	Vergrößerung eines Ausschnitts der Kernhülle einer <i>Xenopus</i> Oozyte	82
Abb. 5-8:	Immunlokalisation auf EM-Ebene mit IV'D4 auf <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	83
Abb. 5-9:	Inkubation von IV'D4 an Gefrierschnitten von <i>Xenopus laevis</i> Hoden	84
Abb. 5-10:	Immunfluoreszenz an XTC-Zellen mit IV'D4	85
Abb. 5-11:	Inkubation von Y12 an Gefrierschnitten von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	86
Abb. 5-12:	Immungoldlokalisation mit Y12 an <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	87
Abb. 5-13:	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von prävitellogem <i>Xenopus</i> Ovar, das mit Actinomycin D (A), Cycloheximid bzw. Leptomycin B inkubiert wurde	89
Abb. 5-14:	Immunfluoreszenz mit IV'D4 an Gefrierschnitten von <i>Xenopus laevis</i> Ovar, das mit den Methyltransferasehemmern Adox bzw. MTA inkubiert wurde	91
Abb. 5-15:	Indirekte Immunfluoreszenz mit Y12 an Gefrierschnitten von <i>Xenopus laevis</i> Ovar, das mit Adox bzw. MTA inkubiert wurde	92
Abb. 5-16:	Elektronenmikroskopische Aufnahme der Kernhüllenregion von <i>Xenopus</i> Oozyten, die mit den Methyltransferase-Hemmern MTA bzw. Adox inkubiert wurden	93
Abb. 5-17:	Coomassie-Gel von prävitellogem <i>Xenopus</i> Oozytenextrakt und Immunblot mit Antikörper IV'D4	94
Abb. 5-18:	Immunblot mit Antikörper IV'D4 unter Verwendung von Extrakten verschiedener Oozytenstadien	94
Abb. 5-19:	Vergleichender Immunblot mit verschiedenen Oozytenextrakten	95
Abb. 5-20:	Immunblots verschiedener Oozytenstadien, Organe und Gewebe eines adulten <i>Xenopus laevis</i>	96
Abb. 5-21:	Immunpräzipitation mit IV'D4 und anti-EF1A unter Verwendung von Oozytenextrakt	97
Abb. 5-22:	Überprüfung der Spezifität der Antikörper IV'D4 und anti-EF1A durch Vergleich mit einem anti-His Antikörper	98
Abb. 5-23:	2D-Gelelektrophorese (NEPHGE) und anschließender Immunblot mit anti-EF1A von Stadium I Oozyten von <i>Xenopus</i>	99
Abb. 5-24:	2D-Gelelektrophorese (isoelektrischen Fokussierung: IEF)	100

Abb. 5-25:	Nukleotidsequenzen von EF1A-S, EF1A-O und 42Sp50	102
Abb. 5-26:	Aminosäuresequenz der EF1A-Isoformen (EF1A-S, EF1A-O und 42Sp50) von <i>Xenopus laevis</i>	103
Abb. 5-27:	Proteindomänen der EF1A-Isoformen	106
Abb. 5-28:	Graphische Erklärung zur Synthese der spezifischen DNA-Fragmente	108
Abb. 5-29:	mRNA-Expression der <i>Xenopus laevis</i> EF1A-Genfamilie	109
Abb. 5-30:	Verteilung von EGFP-EF1A-1 und EF1A-1-EGFP nach Expression in COS7-Zellen	111
Abb. 5-31:	Verteilung von EGFP-EF1A-2 und EF1A-2-EGFP nach Expression in COS7-Zellen	112
Abb. 5-32:	Verteilung von EGFP-42Sp50, 42Sp50-EGFP, 42Sp50-MDsRed und 42Sp50-mRFP nach der Transfektion in COS7-Zellen	113
Abb. 5-33:	Schwaches nukleoläres Fluoreszenzsignal von 42Sp50-EGFP in transfizierten COS7-Zellen beobachtet wurde	114
Abb. 5-34:	Expression der EF1A-Isoformen nach der Mikroinjektion von mRNA in lebende, prävitellogene <i>Xenopus</i> Oozyten	115
Abb. 5-35:	Verteilung verschiedener 42Sp43-Fusionskonstrukte nach Expression in COS7-Zellen	117
Abb. 5-36:	Kolokalisation von 42Sp43 und Fibrillarin in den Nukleolen	118
Abb. 5-37:	Expression von zwei unterschiedlich markierten 42Sp43-Fusionsproteinen in lebenden <i>Xenopus</i> Oozyten nach Mikroinjektion der entsprechenden mRNAs	118
Abb. 5-38:	EGFP-mRNA wurde als Kontrolle in prävitellogene <i>Xenopus</i> Oozyten mikroinjiziert	119
Abb. 5-39:	Expression von 42Sp43 und EF1A als rot und grün fluoreszierende Proteine in COS7-Zellen	120
Abb. 5-40:	Expression von 42Sp43 und EF1A-2 als rot und grün fluoreszierende Proteine in COS7-Zellen	121
Abb. 5-41:	Umverteilung von 42Sp50 in den Nukleolus durch Koexpression mit 42Sp43 in COS7-Zellen	122
Abb. 5-42:	Umverteilung von 42Sp50 in den Nukleolus durch Koexpression mit 42Sp43 in COS7-Zellen	123
Abb. 5-43:	Auswertung der nukleolären Lokalisierung der drei EF1A-Isoformen in COS7-Zellen	124
Abb. 5-44:	Doppelexpression von 42Sp43 mit jeweils EF1A-1 bzw. EF1A-2 in prävitellogenen <i>Xenopus</i> Oozyten	125
Abb. 5-45:	Koexpression von 42Sp43-mRFP- und 42Sp50-EGFP-mRNA in prävitellogenen <i>Xenopus</i> Oozyten	126

9. Anhang

9.1 Primerliste

Bezeichnung	Sequenz	Zielgen
BC04+07pQEHWf (EcoRI)	5'-GAA TTC ATG GGA AAG GAA AAG ACT CAC ATC-3'	EF1A-1pQE8/N3
BC04pQEHWr (HindIII)	5'-AAG CTT TTC GTT TTC GCG GCT TTC-3'	EF1A-1pQE8
BC04GFPn3r (KpnI)	5'-GGT ACC TTC GTT TTC GCG GCT TTC-3'	EF1A-1GFPN3
BC04EGFPc1f (HindIII)	5'-AAG CTT ATG GGA AAG GAA AAG ACT CAC ATC-3'	EF1A-1GFPC3
BC04EGFPc3r (EcoRI)	5'-GAA TTC TTC GTT TTC GCG GCT TTC-3'	EF1A-1GFPC3
BC07_pQE8_n2_c2 (EcoRI)	5'-GAA TTC ATG GGA AAG GAA AAG ATT CAC ATT-3'	EF1A-2pQE8/N3/C2
BC07pQEHWr (BamHI)	5'-GGA TCC TTT CTT TCC AGC TTT CAC AGC AGA-3'	EF1A-2pQE8/N3/C2
42Sp505'BamHI	5'-GGA TCC ATG ACT GAC AAG GCT CCT CAA AAG-3'	42Sp50
42Sp503'HindIII-tga	5'-AAG CTT CTT CAC CAA CAC TGG TTT TTG GAC-3'	42Sp50
5':pos732:t->g;734:t->a	5'-TCC AGT GCG GCC GGC AAA TAA GCC TTT GAG GC-3'	42Sp50
3':pos732:t->g;734:t->a	5'-GCC TCA AAG GCT TAT TTG CCG GCC GCA CTG GA-3'	42Sp50
42Sp435'BamHI	5'-GGA TCC ATG AAG AAT GTT GGT GAG ACT GGG-3'	42Sp43
42Sp433'HindIII-tga	5'-AAG CTT GGC GGA TTT TTC CGC TTT-3'	42Sp43
bc04_3f	5'-GCC TGG GTC TTG GAC AAA CTG-3'	EF1A-1
bc04_4f	5'-GAT TCC ACT GAA CCA CCA TAC AGC-3'	EF1A-1
bc04_5f	5'-GGT CGT GTG GAG ACT GGT GTC-3'	EF1A-1
bc04_6f	5'-CAG ATT GGT GCT GGA TAT GCC-3'	EF1A-1
bc04_7f	5'-GAA TAT TTC CAG AAT ATC TTG C-3'	EF1A-1
bc04_3r	5'-CAG TTT GTC CAA GAC CCA GGC-3'	EF1A-1
bc04_4r	5'-GCT GTA TGG TGG TTC AGT GGA ATC-3'	EF1A-1
bc04_5r	5'-GAC ACC AGT CTC CAC ACG ACC-3'	EF1A-1

bc04_6r	5'-GGC ATA TCC AGC ACC AAT CTG-3'	EF1A-1
bc04_7r	5'-GCA AGA TAT TCT GGA AAT ATT-3'	EF1A-1
bc07_3f	5'-GCG GAG ATG GGT AAA GGC TCC-3'	EF1A-2
bc07_4f	5'-CAC CCT AGG TGT CAA GCA GC-3'	EF1A-2
bc07_5f	5'-CAC TGC CAA GCC TCT ACG G-3'	EF1A-2
bc07_6f	5'-ACC GCA CAG GTG ATC ATA CTC-3'	EF1A-2
bc07_7f	5'-GTT GGA GTA ATC AAA GGT GTG GAC-3'	EF1A-2
bc07_3r	5'-GGA GCC TTT ACC CAT CTC CGC-3'	EF1A-2
bc07_4r	5'-GCT GCT TGA CAC CTA GGG TG-3'	EF1A-2
bc07_5r	5'-CCG TAG AGG CTT GGC AGT G-3'	EF1A-2
bc07_6r	5'-GAG TAT GAT CAC CTG TGC GGT-3'	EF1A-2
bc07_7r	5'-GTC CAC ACC TTT GAT TAC TCC AAC-3'	EF1A-2
42Sp50-pos924-seq3	5'-TTC AAC ATC GGA TTC AAT GTC AAG-3'	42Sp50
42Sp50-pos1206-seq4	5'-GCC ATC ATA ACC CTG AAG CC-3'	42Sp50
42Sp43-pos306-seq1	5'-GCC GTA CCC CTT AAG TGC TTT-3'	42Sp43
42Sp43-pos606-seq2	5'-GCC AGT GCT CTG CGG AGG- 3'	42Sp43
42Sp43-pos900-seq3	5'-CGC ACA CCT GTA GTA GAA GAG GAC T-3'	42Sp43
BC04F	5'-ATC TCG CCC AAC CGA TAA GC-3'	EF1A-1
BC04R	5'-TTG GTC AAG TTG CCT CCC ATT-3'	EF1A-1
BC07F	5'-TGC CAG TGG TGT AAC TCT GCT AG-3'	EF1A-2
BC07R	5'-AGT TTA CAG GAC ACC AAG ATT AAA C-3'	EF1A-2
Z19F	5'-AGT CCC TGT GGG CAA GAT AGA A-3'	42Sp50
Z19R	5'-TCA CTG TCA TGT AAA ACT GTC ACA AC-3'	42Sp50
HA2f	5'-ATG AGC TCA AGG GAA GGA GCC CGC-3'	HMGA2

HA2r	5´-GTC CAA GAG GGC GTC CAA GG-3´	HMGA2
5SrRNA-5´	5´-CAA GAA TTC GCC TAC GGC CAC ACC-3´	5SrRNA
5SrRNA-3´	5´-ACC AAG TGT CGT AGG CTT GGA TCC ATT-3´	5SrRNA

9.2 Abkürzungen

%	Prozent
®	Registered
°C	Grad Celcius
A	Ampère
Å	Angström
aa-tRNA	Aminoacetylierte tRNA
Abb.	Abbildung
aDMA	Asymmetrical dimethylated arginines
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Bb	Balbians body
bp	Basenpaar
BSA	Bovines (Rinder-) Serum-Albumin
bzw.	Beziehungsweise
C-(-terminal,-Terminus)	Carboxy-(terminal,-Terminus)
Ca.	Circa
CB	Chromatoid body
cDNA	Complementary DNA
cds	Coding sequence
cfu	Colony forming unit
CIAP	Calf intestine alkalische Phosphatase
CLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
d.h.	Das heisst
Da	Dalton
dATP	Desoxy-Adenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosin-Triphosphat
ddNTP	Didesoxy-Nukleosid-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxy-Guanosin-Triphosphat
DIC	Differential Interference Contrast ≡ Nomarski-Interferenz
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
ds	Double stranded, doppelsträngig
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Thmindin-Triphosphat
E. coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamid-Tetraacetat
eEF	Eukaryotischer Elongationsfaktor
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum

et al.	Et altera (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FA	Formaldehyd
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
GFP	Green fluorescent protein
GFM	Granulao-fibrillar material
h	Stunde
H ₂ O _{bidest.}	Doppelt destilliertes Wasser
HCl	Salzsäure
HCG	Humanes Choriongonadotropin
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazin-1-Ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase [= „horse radish peroxidase“]
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
IF	Immunfluoreszenz bzw. Intermediärfilament
IgG	Immunglobulin Klasse G
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
Kan	Kanamycin
kb, kbp	Kilobasenpaar
kDa, kD	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria Bertami
LEs	Localization elements
LiCl	Lithiumchlorid
LSm	Like-Sm-proteins
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
M	Molar [= Mol pro Liter]
m	Meter
mA	Milliampère
mAk	monoklonaler Antikörper
MBP	Myelin basic protein
MBS	Modified Barth solution
MC	Mitochondrial Cloud
MCS	Multiple cloning site
MetOH	Methanol
mg	Milligramm
MG	Relative Molekularmasse
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MMR	Marc's modified Ringer Lösung
mol	Stoffmenge [1 Mol = 6,022 · 10 ²³ [Teilchen]]
mRNA	Messenger RNA
MTR-1	Mouse-Tudor-Repeat-gene1
mV	Millivolt

N-(-terminal,-Terminus)	Amino-(-terminal, -Terminus)
NaCl	Kochsalz
NEPHGE	Nichtgleichgewichts-pH Gradienten Gelelektrophorese
NF	Embryonalstadium-Einteilung nach Nieuwkoop & Faber (1975)
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisations-Signal
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NPC	Kernporenkomplex
OD	Optische Dichte
ONM	Äußere Kernmembran
p.a.	Per analyse (für die Analyse)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PGC	Primordial Germ Cell
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
pH	Potentia hydrogenii
PRMT	Protein arginine methyltransferase
mRFP	Monomeres Red fluorescent protein
rER	Raues Endoplasmatisches Retikulum
RFP	Red fluorescent protein
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale RNA
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	Umdrehungen pro Minuten
RT	Raumtemperatur bzw. Reverse Transkription / Reverse Trranskriptase
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion
S	Svedberg-Einheit (Sedimentations-Konstante)
s, sek	Sekunde
SAP	Shrimp alkalische Phosphatase
sDMA	Symmetrical dimethylated arginines
SDS	Natriumdodecylsulfat
SL	Stammlösung
SMN	Survival of motor neuron protein
snRNP	Small nuclear ribonucleoproteins
sog.	so genannt
ss	single stranded, einzelsträngig
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	TBS + Tween® 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tet	Tetracyclin
Tm	Schmelztemperatur
TR	Texas Red
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
tRNA	transfer RNA
TSR	Template suppression reagent
TSS	Transformation and storage solution

™	Trademark
U	Unit
u.a.	unter anderem
ÜNK	Übernacht-Kultur
UTR	Untranslated region
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
WB	Western Blot
WT	Wildtyp, wildtypisch
X-Gal	Brom-4-Chlor-3-Indol- β -D-Galaktopyranosid
xg	Erdbeschleunigung ($\sim 9,81 \text{ m s}^{-2}$)
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Publikationen

Schneider H., Dabauvalle M.-C., Wilken N., Scheer U. (2009)

Visualizing protein interactions involved in the formation of the 42S RNP storage particle of *Xenopus* oocytes. *Biol. Cell.* submitted.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Hannah Schneider
 Geburtsdatum: 26.09.1978
 Geburtsort: Würzburg
 Familienstand: ledig

Schulbildung:

1985-1989: Grundschule Steinbachtal Würzburg
 1989-1998: Friedrich-Koenig-Gymnasium Würzburg
 Juni 1998: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

WS 1998/99-SS 2004 Biologiestudium an der Bayerischen Julius Maximilians Universität Würzburg
 WS 2001/2002 Studium an der Universitat de Barcelona (Facultat de Biologia), Spanien

Studienschwerpunkte:

Zell- und Entwicklungsbiologie
 Biochemie
 Humangenetik

2003-2004 Diplomarbeit in der Abteilung für Elektronenmikroskopie am Biozentrum der Bayerischen Julius Maximilians Universität Würzburg bei Prof. Dr. M.-C. Dabauvalle

Thema: „Untersuchung der oozytenspezifischen Variante des Proteins TFIIIA von *Xenopus laevis*.“

Promotion:

2004-2009 Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie
 Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ulrich Scheer

Thema: „Untersuchung der drei Isoformen des Elongationsfaktors 1A von *Xenopus laevis*: 42Sp50 versus EF1A-1 / EF1A-2.“

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Ulrich Scheer für die Vergabe dieses interessanten Themas und vor allem für die sehr gute und intensive Betreuung während meiner Arbeit bedanken.

Das zweite Dankeschön gilt Prof. Dr. Marie-Christine Dabauvalle für die gute Betreuung und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in ihrem Labor.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Christoph Winkler für die Übernahme der Zweitkorrektur und bei Prof. Dr. Utz Fischer für die Stellvertretung als Zweitprüfer bedanken.

Dem Graduiertenkolleg „Molecular basis of organ development in vertebrates“ (GK1048) danke ich für die Förderung und finanzielle Unterstützung.

Herrn Prof. H. Zentgraf und seinen MitarbeiterInnen danke ich für die mehrmaligen Versuche einen Antikörper gegen Nuage herzustellen.

Ich möchte mich bei allen Laborkollegen für die gute Zusammenarbeit und für das sehr schöne Arbeitsklima bedanken. Hier sind vor allem meine Mitstreiter Rike, Sibbi, Christian und Frank zu nennen, die den Laboralltag kreativ und unvergesslich gestalteten. Es hat viel Spaß gemacht mit Euch!

Sehr herzlich möchte ich mich bei Claudia und Norbert bedanken. Sie waren DIE Unterstützung des RT-PCR-Projekts und große Hilfen bei vielen Klonierungen. Außerdem hatte Norbert bei technischen und computertechnischen Fragen und Problemen immer die Lösung parat.

Natürlich gilt auch ein besonderes Dankeschön an das technische Personal der Zell- und Entwicklungsbiologie sowie der Elektronenmikroskopie. Bei Kathrin, Claudia, Silke, Reinhild, Tanja, Johanna, Eva-Maria, Elisabeth, Natalia, Sylwia, Anneliese, Claudia G, Daniela und Mark. Dank Eurer Hilfe liefen Sequenzierungen, die Zellkultur, die Bestellungen, das Spülen und viele Versuche immer problemlos und zuverlässig ab.

Danke auch an Tim, Manfred, Ricardo, Robert und Herrn Krohne für produktive Gespräche und viele nützliche Tipps und Ratschläge. Und nicht zu vergessen ist natürlich Uli, die gute Seele und Managerin des Lehrstuhls.

Und danke an alle Mitarbeiter, die ich unbeabsichtigt nicht namentlich erwähnt habe. Die Zusammenarbeit und das Arbeitsklima waren stets angenehm und gut.

Das größte Dankeschön gehört meiner Familie, meinen Geschwistern und insbesondere meinen Eltern!!! Ohne Eure moralische und finanzielle Unterstützung wäre das Alles nicht möglich gewesen. Ich weiß es zu schätzen!

Hannes - ich bin dankbar, dass es dich gibt und dass wir gemeinsam durch Dick und Dünn gehen können!

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Weiterhin habe ich noch keinen Promotionsversuch unternommen oder diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Neben dem akademischen Grad „Diplom-Biologin Univ.“ habe ich keinen weiteren akademischen Grad erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

.....
Hannah Schneider