

# **Funktionelle Rolle von HMGN Proteinen während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis***

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

vorgelegt von

**Ulrich Körner**

aus

Ansbach

Würzburg 2004

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: .....

Gutachter: PD Dr. R. Hock

Gutachter: Prof. Dr. E. Buchner

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Nukleosomales Chromatin</i> .....	1
1.1.1 <i>Supranukleosomales Chromatin</i> .....	3
1.1.2 <i>Kernmatrix und chromosomales Gerüst</i> .....	4
1.2 <i>High mobility group (HMG) Proteine</i> .....	7
1.2.1 <i>Die HMGA-Familie</i> .....	7
1.2.2 <i>Die HMGB-Familie</i> .....	9
1.2.3 <i>Die HMGN-Familie</i> .....	11
1.2.3.1 Funktionelle Domänen der HMGN Proteinen .....	11
1.2.3.2 Interaktion der HMGN Proteine mit dem Chromatin .....	13
1.2.3.3 Verteilung und Mobilität der HMGN Proteine .....	15
1.2.3.4 Biologische Funktionen der HMGN Proteine.....	16
1.2.3.5 Die Rolle von HMGN Proteinen in Differenzierungs- und embryonalen Entwicklungsprozessen.....	18
1.3 <i>XENOPUS LAEVIS ALS MODELLSYSTEM ZUR ANALYSE DER EMBRYONALENTWICKLUNG UND DER ROLLE VON CHROMATIN IN EMBRYONALEN ENTWICKLUNGSPROZESSEN</i> .....	18
1.4 <i>AUFGABENSTELLUNG</i> .....	22
<b>2 MATERIAL</b> .....	<b>23</b>
2.1 <i>BIOLOGISCHES MATERIAL</i> .....	23
2.1.1 <i>Versuchstiere</i> .....	23
2.1.2 <i>Zelllinien</i> .....	23
2.1.3 <i>Primäre Antikörper</i> .....	23
2.1.4 <i>Sekundäre Antikörper</i> .....	24
2.1.5 <i>Bakterienstämme</i> .....	24
2.2 <i>MOLEKULARBIOLOGISCHES MATERIAL</i> .....	25
2.2.1 <i>Plasmidvektoren</i> .....	25
2.2.2 <i>Enzyme</i> .....	26
2.2.3 <i>Oligonukleotide</i> .....	26
2.2.4 <i>Kits</i> .....	27
2.2.5 <i>Proteine</i> .....	27
2.2.6 <i>Chemikalien</i> .....	27
2.2.7 <i>Geräte</i> .....	28
<b>3 METHODEN</b> .....	<b>29</b>
3.1 <i>MIKROBIOLOGISCHE METHODEN</i> .....	29
3.1.1 <i>Flüssigkultur von Bakterien</i> .....	29
3.1.2 <i>Bestimmung der Bakteriendichte einer Flüssigkultur mit Hilfe der optischen Dichte</i> .....	29
3.1.3 <i>Glycerinkultur</i> .....	29
3.1.4 <i>Bakterienkultur auf Agarplatten</i> .....	30
3.1.5 <i>Herstellen kompetenter Bakterien</i> .....	30
3.1.6 <i>Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien</i> .....	31

3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	32
3.2.1	<i>RT-PCR</i> .....	32
3.2.1.1	Reverse Transkription .....	32
3.2.1.2	PCR (polymerase chain reaction).....	33
3.2.2	<i>Kolonie-PCR</i> .....	35
3.2.3	<i>Gewinnung von Plasmid-DNA</i> .....	35
3.2.3.1	GTE-System (alkalische Lyse).....	35
3.2.3.2	PEQLAB Plasmid Mini-Präp .....	36
3.2.4	<i>Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen</i> .....	37
3.2.5	<i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (DNA und RNA)</i> .....	37
3.2.6	<i>Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese</i> .....	38
3.2.7	<i>Klonierung von PCR-Fragmenten in den pCR®2.1-Vektor</i> .....	40
3.2.7.1	Klonierung mit dem TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen) .....	40
3.2.7.2	Klonierung mit dem Original TA Cloning® Kit (Invitrogen) .....	41
3.2.8	<i>Klonierung von DNA-Fragmenten in bakterielle Vektoren</i> .....	42
3.2.8.1	Gewinnung des Inserts .....	42
3.2.8.2	Dephosphorylierung des Vektors .....	42
3.2.8.3	Ligation und Transformation.....	42
3.2.8.4	Test der erhaltenen Klone.....	43
3.2.9	<i>Gelextraktion von DNA-Fragmenten (Qiagen)</i> .....	43
3.2.10	<i>Fällung von Nukleinsäuren</i> .....	43
3.2.11	<i>DNA-Sequenzierung</i> .....	44
3.2.12	<i>Präparation von RNA mit TRIfast</i> .....	45
3.2.13	<i>RNA-Gelelektrophorese</i> .....	46
3.2.14	<i>In-vitro-Transkription/Markierung von RNA-Sonden mit Digoxigenin</i> .....	47
3.2.15	<i>Northern Blot (Transfer von RNA auf eine Membran)</i> .....	48
3.2.16	<i>Spezifischer Nachweis einer RNA auf einem Northern Blot</i> .....	49
3.2.17	<i>Detektion über alkalische Phosphatase und NBT/BCIP</i> .....	50
3.2.18	<i>Detektion über Peroxidase und ECL (Enhanced Chemiluminescence)</i> .....	51
3.2.19	<i>Strippen eines Northern Blots</i> .....	52
3.2.20	<i>Isolierung von Zellkernen aus Kulturzellen (A6-Zellen)</i> .....	52
3.2.21	<i>Mengenbestimmung von Zellkernen mit der Neubauer-Kammer</i> .....	53
3.3	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN .....	54
3.3.1	<i>Perchlorsäure (PCA)–Extraktion</i> .....	54
3.3.2	<i>Herstellung und Aufreinigung eines Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteins</i> .....	54
3.3.2.1	Expression des GST-Fusionsproteins in Bakterien.....	54
3.3.2.2	Aufreinigung des Fusionsproteins .....	55
3.3.2.3	Reinigung nach der Batch-Methode: .....	56
3.3.2.4	Bestimmung der Proteinkonzentration über die E <sub>280</sub> .....	57
3.3.3	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli)</i> .....	57
3.3.4	<i>Coomassie-Färbung</i> .....	59
3.3.5	<i>Silberfärbung von Proteingelen</i> .....	60

3.3.6	Trocknen von SDS-Gelen .....	61
3.3.7	Western Blotting (Proteintransfer auf eine Membran).....	61
3.3.8	Spezifischer Proteinnachweis mit Antikörper.....	63
3.3.9	Strippen eines Western Blots.....	64
3.4	MIKROSKOPIE .....	64
3.4.1	Immunlokalisation an transfizierten Zellen.....	64
3.4.2	Fixierung von Zellen.....	64
3.4.3	Antikörperinkubation.....	65
3.4.4	Fluoreszenzmikroskopie.....	66
3.5	ARBEITEN MIT XENOPUS LAEVIS.....	66
3.5.1	Induktion der Ovulation und Gewinnung von Eiern.....	66
3.5.2	Isolierung von <i>Xenopus laevis</i> Hoden.....	66
3.5.3	In vitro Fertilisation .....	66
3.5.4	Embryonenhaltung .....	67
3.5.5	Präparation der Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> und <i>Pleurodeles waltl</i> .....	67
3.5.6	Paraffineinbettung .....	67
3.5.7	Herstellung von Paraffinschnitten .....	68
3.5.8	Micrococcus Nuklease Verdau von Chromatin .....	68
3.5.8.1	Zellkern-Isolation aus embryonalen Zellen ( <i>Xenopus laevis</i> ).....	68
3.5.8.2	Micrococcus Nuklease Verdau .....	69
3.5.8.3	Phenol – Chloroform – Extraktion .....	69
3.5.8.4	Nukleoprotein Gel Assay.....	70
3.5.9	Mikroinjektion.....	71
3.5.9.1	Herstellung von Injektionsnadeln.....	71
3.5.9.2	Mikroinjektion in die Zygote von <i>Xenopus laevis</i> .....	71
3.5.9.3	Mikroinjektion in Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> .....	72
3.5.10	Quetschpräparate von Embryonen .....	72
3.5.11	Calcein Färbung.....	72
3.5.12	Lampenbürstenchromosomenpräparation.....	73
3.5.13	Whole-mount in situ-Hybridisierung von Embryonen.....	73
3.5.13.1	Fixierung der Embryonen.....	74
3.5.13.2	Hybridisierung.....	74
3.5.13.3	Detektion gebundener Digoxigenin-markierten RNA-Sonden .....	75
3.5.14	Animal Cap Assay.....	76
3.5.15	Whole mount TUNEL Assay .....	77
3.5.16	TUNEL-Test an Kulturzellen .....	78
3.5.17	Magnetische Kernresonanz (Nuclear Magnetic Resonance, NMR).....	79
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>83</b>
4.1	ISOLIERUNG VON <i>XENOPUS</i> HMGN1 UND <i>XENOPUS</i> HMGN2 cDNAs .....	83
4.2	HERSTELLUNG POLYKLONALER ANTIKÖRPER GEGEN XHMGN1 UND XHMGN2 PROTEINE.....	84
4.2.1	Überprüfung der Antikörper gegen XHMGN1 und XHMGN2 Proteine .....	84

4.2.1.1	Herstellung und Aufreinigung der Gluthation-S-Transferase-Fusionsproteine XHMGN1 und XHMGN2.....	85
4.2.1.2	Überprüfung der Antikörper gegen XHMGN1 und XHMGN2 im Western Blot.....	86
4.2.1.3	Überprüfung der Antikörper gegen XHMGN1 und XHMGN2 Protein in der Immunfluoreszenz.....	86
4.3	DIE EXPRESSION VON XHMGN1 UND XHMGN2 WÄHREND DER OOGENESE UND DER EMBRYONALENTWICKLUNG VON <i>XENOPUS LAEVIS</i> .....	88
4.3.1	<i>Expression von XHMGN1 und XHMGN2 während der Oogenese</i> .....	88
4.3.1.1	Analyse der XHMGN-Expression auf mRNA-Ebene durch RT-PCR.....	88
4.3.1.2	Analyse der XHMGN-Expression auf mRNA-Ebene im Northern Blot.....	89
4.3.1.3	Analyse der XHMGN-Expression auf Proteinebene im Western Blot.....	89
4.3.1.4	Subzelluläre Verteilung von HMGN1 und HMGN2 Proteinen in <i>Xenopus</i> -Oozyten.....	90
4.3.2	<i>Expression von HMGN1 und HMGN2 während der frühen Embryonalentwicklung von Xenopus laevis</i> .....	93
4.3.2.1	Analyse der XHMGN-Expression auf mRNA-Ebene durch RT-PCR.....	93
4.3.2.2	Analyse der XHMGN-Expression auf mRNA-Ebene im Northern Blot.....	94
4.3.2.3	Expressionsanalyse der XHMGN Proteine während der frühen Embryogenese.....	94
4.3.2.3.1	Analyse der XHMGN-Expression im Western Blot.....	95
4.3.2.4	Gewebsspezifische Expression von XHMGN1 und XHMGN2.....	96
4.3.2.4.1	Immunfluoreszenz Mikroskopie an Paraffinschnitten.....	96
4.3.2.4.2	Analyse der XHMGN-Expression durch Whole-mount in situ-Hybridisierung.....	97
4.3.2.5	Analyse der gewebsspezifischen Expression mittels RT-PCR.....	98
4.4	MANIPULATION DER HMGN-PROTEINMENGEN WÄHREND DER FRÜHEN EMBRYONALENTWICKLUNG.....	99
4.4.1	<i>Injektion rekombinanter Proteine</i> .....	100
4.4.2	<i>Stabilität der injizierten Proteine im Embryo</i> .....	100
4.4.3	<i>Analyse der Phänotypen vor der Midblastula Transition nach Injektion von rekombinantem HMGN Protein</i> .....	101
4.4.4	<i>Konsequenzen der HMGN-Injektion für die Embryonalentwicklung nach der Midblastula Transition</i> .....	102
4.4.4.1	Analyse der Phänotypen nach Injektion von rekombinantem HMGN Protein.....	102
4.4.4.2	Histologische Analyse der HMGN-injizierten Embryonen.....	104
4.4.4.3	Expression eines mesodermalen Markergens ( <i>XMyoD</i> ) in HMGN-injizierten Embryonen.....	105
4.4.4.4	Whole-mount TUNEL-Assay von HMGN-injizierten Embryonen.....	106
4.4.4.5	Calcein-Färbung zur Analyse der Knochenbildung bei HMGN-injizierten Embryonen.....	109
4.4.4.6	Analyse der embryonalen Morphologie mittels Magnetresonanz-Mikroskopie.....	110
4.4.5	<i>„Knock-down“-Experimente mit Morpholino-Oligonukleotiden</i> .....	114
4.4.5.1	Injektion von Morpholino-Oligonukleotiden in die Zygote von <i>Xenopus laevis</i> .....	114
4.4.5.2	Überprüfung der Wirksamkeit der Morpholino-Injektionen durch Western Blot Analyse.....	116
4.4.5.3	Phänotyp-Analyse von XHMGN2 „knock-down“ Embryonen vor der Midblastula Transition.....	116
4.4.5.4	Phänotyp-Analyse von XHMGN2 „knock-down“ Embryonen nach der Midblastula Transition.....	117
4.4.5.5	Spezifität der Morpholino-induzierten Missbildungen – „Rescue“ Experimente.....	118
4.4.5.6	Calcein-Färbung zur Analyse der Knochenbildung von MO-N2 injizierten Embryonen.....	119
4.4.5.7	Phänotyp-Analyse von XHMGN2 knock-down Embryonen mittels Magnetresonanz-Mikroskopie.....	120

4.5	ANALYSE DER MOLEKULAREN URSACHEN DER HMGN-ABHÄNGIGEN EMBRYONALDEFEKTE.....	121
4.5.1	<i>Globale Veränderungen des Chromatins ?</i> .....	122
4.5.1.1	Lichtmikroskopische Analyse nach Überexpression von XHMGN2-EGFP Fusionsproteinen in embryonalen Zellen.....	123
4.5.1.2	Nukleoprotein-Assay .....	124
4.5.1.3	Micrococcus Nuklease Verdau von embryonalem Chromatin nach Manipulation der HMGN Proteinmengen.....	125
4.6	MÖGLICHE EINFLÜSSE AUF DIE EXPRESSION SPEZIFISCHER GENE.....	126
4.6.1	<i>Einfluss der HMGN Proteine auf die Expression mesodermaler Gene im „animal cap assay“</i> .....	127
4.6.2	<i>Die HMGN-Expression korreliert mit dem Verlust der mesodermalen Kompetenz</i> .....	131
4.6.3	<i>Haben HMGN Proteine Einfluss auf den Beginn der Midblastula Transition ?</i> .....	132
4.6.4	<i>Einfluss von HMGN Proteinen auf den Expressionsbeginn spezifischer Gene während der Midblastula Transition</i> .....	133
4.6.5	<i>Einfluss von HMGN Proteinen auf den Expressionsbeginn entwicklungssteuernder Schaltergene während der Midblastula Transition</i> .....	134
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>137</b>
5.1	HMGN PROTEINE SIND HOCH KONSERVIERT VON <i>XENOPUS</i> ZUM MENSCHEN .....	137
5.2	HMGN PROTEINE ZEIGEN EINE ÜBERRASCHENDE VERTEILUNG IN OOZYTEN.....	138
5.3	DIE EXPRESSION VON HMGN PROTEINEN IN EMBRYONEN IST ZEITLICH UND RÄUMLICH REGULIERT	140
5.4	DIE ZELLULÄRE HMGN-KONZENTRATION IST KRITISCH FÜR DIE EMBRYONALENTWICKLUNG.....	141
5.5	DIE HMGN PROTEINMENGE BEEINFLUSST DIE EXPRESSION ENTWICKLUNGSSTEUERNDER GENE...	145
5.6	AUSBLICK .....	150
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>152</b>
	<b>SUMMARY</b> .....	<b>153</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>154</b>
	<b>ANHANG</b> .....	<b>165</b>
	I. OLIGONUKLEOTIDE .....	165
	II.ABKÜRZUNGEN.....	169
	<b>PUBLIKATIONSLISTE</b> .....	<b>171</b>
	<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG</b> .....	<b>172</b>
	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>173</b>
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>174</b>

# 1. Einleitung

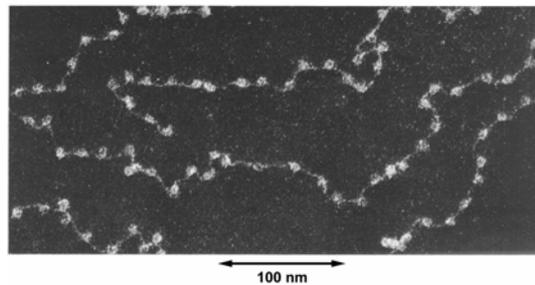
Im Zellkern von Eukaryonten ist die DNA stets mit Proteinen assoziiert. Dieser DNA-Proteinkomplex wird als Chromatin bezeichnet und besteht im Wesentlichen aus DNA und Histonen, die zusammen die Grundeinheit des Chromatins, das Nukleosom, aufbauen. Beim Aufbau des supranukleosomalen Chromatins sind neben den H1 Histonen auch Nicht-Histon Proteine wie zum Beispiel die HMG (High Mobility Group) Proteine, HP1 (Heterochromatin Protein 1) oder auch Topoisomerasen beteiligt. Wie kürzlich gezeigt wurde, sind gerade die am Aufbau des supranukleosomalen Chromatins beteiligten Proteine nur transient und dynamisch mit dem Chromatin assoziiert und verleihen so dem supranukleosomalen Chromatin eine hohe Flexibilität (Misteli et al., 2000; Christensen et al., 2002; Hock et al., 1998a; Lührs et al., 2002; Catez et al., 2003). Manche Änderungen der Chromatin-Organisation sind global und können mit dem Lichtmikroskop beobachtet werden, wie zum Beispiel die Kondensierung und Dekondensierung des Chromatins vor und nach der Mitose. Dem gegenüber stehen lokale Veränderungen der Chromatin-Organisation, die bei der Regulation der Genaktivität, bei der Replikation und bei DNA-Reparatur-Prozessen auf nukleosomaler oder auch supranukleosomaler Ebene beteiligt sind (van Holde, 1988; Wolffe und Kurumizaka, 1998).

## 1.1 Nukleosomales Chromatin

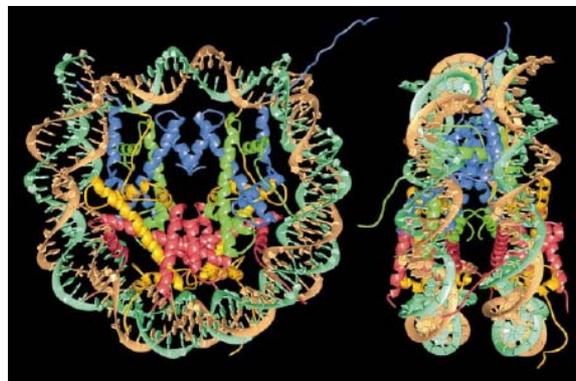
Fast die Hälfte der Chromatinproteine sind kleine basische Proteine mit einer molekularen Masse von 11 bis 21 kDa, die sogenannten Histone. Ihr hoher Anteil an positiven Aminosäuren (Arginin und Lysin) tritt mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA in Wechselwirkung. Die „Core Histone“ H2A, H2B, H3 und H4 stellen die Elementbausteine der Nukleosomen dar. Je zwei dieser Histone bauen zusammen die Grundeinheit des Chromatins, das Nukleosom, auf. Dabei wird das Oktamer aus diesen nukleosomalen Histonen von  $1\frac{3}{4}$  Windungen der DNA (146 bp) umwickelt (Wolffe, 1992) und bildet einen zylindrischen Kern von 11 nm Durchmesser und 6 nm Höhe. Die Nukleosomen sind in regelmäßigen Abständen auf der DNA angeordnet und untereinander durch freie DNA („linker DNA“) verbunden. Unter dem Elektronenmikroskop stellt sich diese lineare Struktur als Perlenketten-Anordnung dar (Olins und Olins, 1974; Abb. 1). Röntgenstruktur-Analysen kristallisierter Nukleosomen erreichten eine Auflösung von 2,8 Angström und konnten so den Nukleosom-Komplex auf atomarer Ebene beschreiben. Es zeigte sich, dass sich die DNA um das Histonoktamer windet und dass die Histonenden nicht an der Bindung der DNA beteiligt sind, sondern mit anderen Proteinen interagieren (Luger et. al., 1997; Abb. 2). Die Position der Nukleosomen entlang der DNA kann von der DNA-Sequenz, von Histonvarianten oder von posttranslationalen Modifikationen abhängig sein (Bradbury, 1992). Alle Histonproteine

haben eine ähnliche Struktur mit einer globulären Domäne und flexiblen Amino- und meist auch Carboxylenden. Die C-terminalen Enden der Histone sind für die Wechselwirkung untereinander bzw. mit der DNA verantwortlich. An den N-terminalen Enden, die aus der Oberfläche des Nukleosoms herausragen, können posttranslationale Modifikationen, wie zum Beispiel Methylierung, Phosphorylierung, Azetylierung und Ubiquitinierung stattfinden. Die Azetylierung von Lysinresten der „core“ Histone beispielsweise verändert die Chromatinstruktur und führt zur Destabilisierung des Nukleosoms, was folglich zu einer Aktivierung des Chromatins führt. Methylierung dagegen wird von Proteinen wie HP1 (Heterochromatinprotein1) erkannt und führt zu einer Chromatininaktivierung (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001), kann aber auch, wie kürzlich gezeigt, mit Genaktivierung in Verbindung stehen (Schneider et al., 2004). Offensichtlich können die Modifikationen der „Core Histone“ wie ein Code von anderen interagierenden Proteinen gelesen werden. Diese Hypothese wurde von D. Allis als „Histon-Code-Hypothese“ zusammengefasst (Strahl und Allis, 2000).

Neben Modifikationen können bestimmte ATPasen enthaltende Proteinkomplexe wie SWI/SNF (switch/sucrose non-fermenting), CHRAC (chromatin accessibility complex) und NURF (nucleosome remodeling factor) unter ATP-Verbrauch die nukleosomale Anordnung auflösen und somit DNA abhängige Vorgänge zusätzlich unterstützen (zusammengefasst in Wolffe et al., 2000).



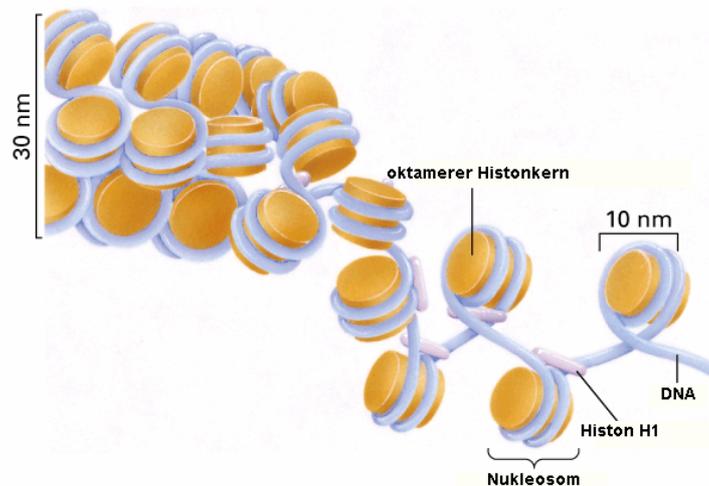
**Abb.1:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von Chromatin (Olins und Olins, 1974). Gezeigt ist die perlenartige Anordnung der Nukleosomen



**Abb.2:** Röntgenstruktur-Analyse eines kristallisierten Nukleosoms. Die 146bp DNA (braun, türkis), Histon H3 (blau), Histon H4 (grün), Histon H2A (gelb) und Histon H2B (rot) sind farblich gekennzeichnet. Zu beachten sind die Histon-Enden, die aus dem Nukleosom herausragen (aus Luger et. al., 1997).

### 1.1.1 Supranukleosomales Chromatin

Der Chromatinorganisation in Nukleosomen folgt eine übergeordnete Chromatinstruktur, durch die die DNA dichter verpackt wird. Bei dieser Verdichtung des 11 nm Chromatins zur 30 nm Fibrille spielen die Linker Histone (Histon H1 und dessen Varianten) eine wesentliche Rolle (siehe Abb. 3). Die exakte Organisation der Nukleosomen in der 30 nm Struktur ist noch immer unklar. Im Solenoid-Modell von Finch und Klug (1976) sind die Nukleosomen helikal mit sechs Nukleosomen pro Solenoid Windung angeordnet (siehe Abb. 3 und 4). Untersuchungen, die eine Lokalisierung von Histone H1 im Inneren der 30 nm Fibrille zeigte, würden das Solenoid-Modell unterstützen (Graziano et al., 1994).



**Abb.3:** Solenoid-Modell der 30 nm-Fibrille aus kondensiertem Chromatin in Seitenansicht. Der oktamer Histonkern ist orange dargestellt. Jedes Nukleosom ist mit einem Histon H1 Molekül assoziiert. Die „11nm Fibrille“ spiralisiert sich in diesem Modell zu einer Solenoidstruktur mit einem Durchmesser von 30 nm. (aus Molekulare Zellbiologie, 2001, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg/Berlin).

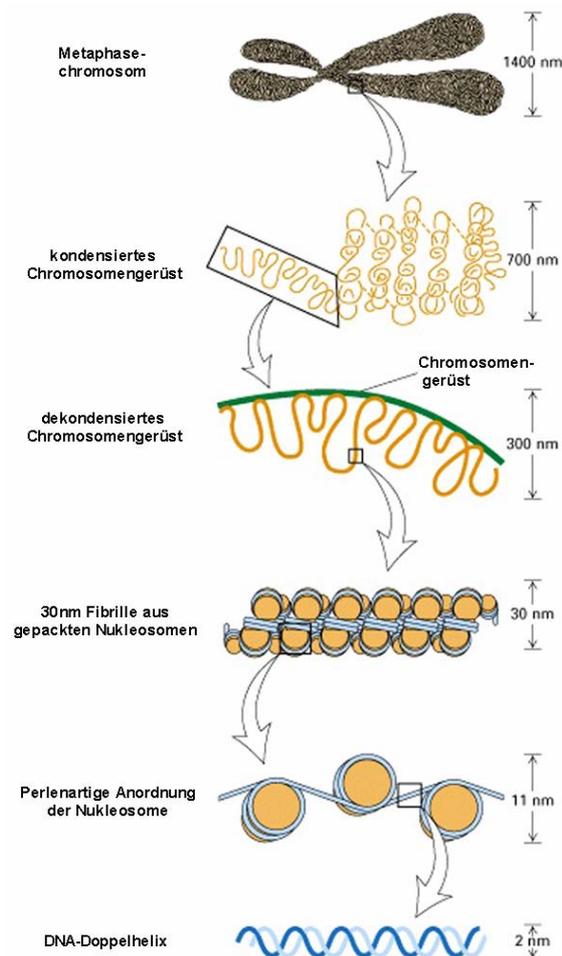
Ein alternatives Modell beschreibt eine asymmetrische, dreidimensionale Zickzack Anordnung der Nukleosomen und der Linker DNA (Woodcock et al., 1993; Horowitz et al., 1994). In diesem Modell wären die Nukleosomen nicht benachbart und die Linker DNA nicht gewunden wie im Solenoid-Modell. Damit wäre die Chromatinstruktur wesentlich unregelmäßiger und komplexer als zunächst angenommen (Wolffe et al., 2000). Untersuchungen von Zhou et al. (1998) zeigten eine asymmetrische Bindung des Histon H1 auf der Außenseite der DNA-Superhelix, was wiederum für das asymmetrische „Zickzack-Modell“ sprechen würde. Andere ziehen ein Modell der „Superbeads“ mit einer diskontinuierlichen globulären Organisation der Nukleosomen vor (Zentgraf et al., 1981). Die Zusammenlagerung der Nukleosomen in der 30 nm Fibrille soll durch Bindung von Histon H1 an die Linker DNA und an Histon H2A erfolgen (Boulikas et al., 1980). Die Frage aber, wo genau Histon H1 in der 30 nm Fibrille lokalisiert und welches Modell damit wahrscheinlicher ist, bleibt zur Diskussion offen.

Innerhalb der Eukaryonten sind die nukleosomalen Histone hoch konserviert. Dagegen gibt es von den „linker“ Histonen selbst innerhalb einer Spezies zahlreiche Varianten (z.B. sechs Subtypen in Säugerzellen bzw. fünf Subtypen in Xenopuszellen). Die jeweiligen Subtypen verändern die Chromatinstruktur auf der Ebene der 30 nm Fibrille und führen so zu einer Anpassung an zell- und entwicklungsspezifische Erfordernisse. Zusätzlich wird Histon H1 vielfältig posttranslational modifiziert, beispielsweise durch Phosphorylierungen, Azetylierungen, Ribosylierungen und Ubiquitinierungen. Diese Modifizierungen der Histon H1 Proteine könnten eine Rolle beim Aufbau der 30 nm Fibrille und der höher geordneten Kondensierungsstufen spielen. Direkt vor einer Mitose wird das Histon H1 hyperphosphoryliert. Da es zu dieser Zeit auch zur Chromosomenkondensation kommt, wird vermutet, dass die Hyperphosphorylierung des Histon H1 zur Kompaktierung des Chromatins beiträgt (Zusammenfassung von Bradbury, 1992). Histon H1 stabilisiert durch seine Bindung an die Linker DNA und an das Nukleosom nicht nur die Chromatin Fibrille, sondern verhindert ebenso die Aktivität der Histonazetyltransferasen (Herrera et al., 2000). Andere chromosomale Nicht-Histon Proteine, wie zum Beispiel die Topoisomerase II und die HMG (High Mobility Group) Proteine fügen dem nukleosomalen Chromatin eine zusätzliche funktionelle und strukturelle Komplexität hinzu, die einerseits genügend Stabilität für das Chromatin gewährleisten muss, andererseits aber flexibel veränderbar sein sollte, um das Chromatin effizient für die an ihm ablaufenden Prozesse modellieren zu können. Diese Proteine, wie auch Histon H1, sind mobile Proteine, die nur transient an das Chromatin binden. Durch diese Dynamik der Chromatinproteine gewinnt die übergeordnete Chromatinstruktur eine lokale und globale Flexibilität (Misteli et al., 2000; Christensen et al., 2002; Hock et al., 1998a; Lührs et al., 2002; Catez et al., 2003).

### **1.1.2 Kernmatrix und chromosomales Gerüst**

Die Kernmatrix definiert die Gestalt des Zellkerns und ist strukturelle Grundlage für Prozesse wie DNA-Replikation, Transkription und DNA-Reparatur (Pienta et al., 1991). Die Vorstellung ist, dass die chromosomale Struktur bzw. die Kernstruktur durch ein Netzwerk an Proteinen gebildet und stabilisiert wird. Nach Extraktion löslicher Chromosomen- oder Kernkomponenten, Extraktion von Histonen und Verdau der DNA bleibt ein Proteinnetzwerk zurück, das entweder als Chromosomengerüst (Scaffold; bei Extraktion von Chromosomen) oder als Kernmatrix (bei Extraktion von Interphasenzellen) bezeichnet wurde (Berezney und Coffey, 1977; Adolphs et al., 1977; Paulson und Laemmli, 1977). Vermutet wird, dass sich die 30 nm Fibrille in schleifenartige Domänen mit einer durchschnittlichen Größe von 50 – 300 kb faltet. Diese Schleifen sollen durch Bindung von AT-reichen DNA-Abschnitten an die Kernmatrix gebildet werden. Diese spezifischen DNA-Abschnitte wurden als SARs (scaffold attachment regions; Mirkovitch et al., 1984; Gasser und Laemmli, 1986) bzw. MARs (matrix

attachment regions; Gasser und Laemmli, 1987; von Kries et al., 1991) bezeichnet. Nicht-Histon-Proteine sollen die Schleifen zusätzlich an ihrer Basis zusammenhalten. In einem Modell sollen die benachbarten Schleifen dann durch Protein-Protein oder Protein-DNA Wechselwirkungen ein stabiles Netzwerk entlang der Chromosomenachse bilden (Gasser und Laemmli, 1987; Earnshaw, 1988). Die Anheftung der DNA in Schleifen an die Kernmatrix verursacht eine ca. 700fache Kompaktierung (Pienta et al., 1991; siehe Abb. 4). Zusätzlich wird aber vermutet, dass durch die Bildung der DNA-Schleifen unabhängige, topologisch zusammengefasste Chromatineinheiten entstehen, welche die Transmission der Topologie von einer Chromatindomäne zur nächsten verhindert. Die DNA-abhängigen Prozesse, wie zum Beispiel Transkription und Replikation, wären nach dieser Vorstellung für jede Domäne unabhängig und isoliert von den Nachbardomänen (Fernandes und Catapano, 1995).



**Abb.4:** Modell für die Verpackung des Chromatins und des Chromosomengerüsts in Metaphasenchromosomen (aus Molekulare Zellbiologie, 2001, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin).

Als Bestandteile der Kernmatrix wurden zahlreiche Proteine beschrieben, wie beispielsweise Transkriptionsfaktoren (Myb, Myc, Ap1, Sp1 u.a.), DNA-bindende Proteine (Topoisomerase II, Histon H1, HMGA, HMGB, HMG-D, Lamin B1, SAF-A (scaffold attachment factor A), ARBP (attachment region binding protein), Enzyme (DNA-Polymerasen, Histon Azetylasen, Histon Deazetylasen) und Filamentproteine wie Aktin (zusammengefasst von Boulikas et al., 1995). Die Typ II Topoisomerase, von der es zwei Isoformen gibt (Topoisomerase II  $\alpha$  und  $\beta$ ), wird als ein Hauptbestandteil der Kernmatrix betrachtet (Earnshaw et al. 1985, Gasser und Laemmli, 1986). Topoisomerase II (170-180 kD) erzeugt DNA-Doppelstrangbrüche und entwindet so superhelikale Torsionen. Diese Strangbrüche werden nach der Rotation wieder ligiert. Das Enzym katalysiert diese Reaktion als Homodimer unter ATP-Verbrauch.

Wie kürzlich herausgefunden wurde, ist die Topoisomerase II ein mobiles Protein (Christensen et al., 2001). Durch die Technik des Photobleaching wurde zudem gezeigt, dass nur wenige Komponenten des Nukleus immobil sind, wie zum Beispiel die nukleosomalen Histone (Phair und Misteli, 2000) oder strukturelle Komponenten der Kernlamina (Moir et al., 2000). Die meisten anderen nukleären Proteine bewegen sich schnell durch den Zellkern, wie beispielsweise Histon H1, Topoisomerase II, HMGN Proteine (Misteli, 2000; Christensen et al., 2001; Hock et al., 1998a; Lührs et al., 2002; Catez et al., 2003) oder HMGA Proteine (Harrer et al., 2004; zur Publikation angenommen). Diese Erkenntnis stellt aber die starre Form der Kernmatrix in Frage und es ist zu vermuten, dass man sich die Kernmatrix als eine dynamische, sich ständig verändernde Struktur vorstellen muss.

Im Interphasenkern lassen sich zwei Arten von Chromatin unterscheiden: Das transkriptionell inaktive und hoch kondensierte Heterochromatin und das weniger kondensierte und überwiegend transkriptionell aktive Euchromatin (Heitz, 1929). Konstitutives Heterochromatin sind zum Beispiel die Telomerregionen und die Zentromerregionen, die aus tandemartig angeordneten hochrepetitiven Sequenzabschnitten bestehen. Das inaktivierte X-Chromosom bei weiblichen Säugern wird ebenfalls als Heterochromatin bezeichnet, welches aber als fakultatives Heterochromatin bezeichnet wird, weil es auch euchromatisch sein kann (Übersicht Wolffe, 1992). Das „Positionseffekt Variegation (PEV) System“ wurde in *Drosophila melanogaster* beschrieben und zeigte, dass Gene, welche durch chromosomale Rearrangements oder Transposition in die Nähe von heterochromatisierten Bereichen gebracht werden, fakultativ heterochromatisiert werden können und damit inaktiviert werden (Schotta et al., 2003). Ein weiteres wichtiges Protein des Chromatins ist das Heterochromatinprotein 1 (HP1). Es wurde als erstes Heterochromatinprotein aus *Drosophila melanogaster* isoliert (James und Elgin, 1986) und ist evolutionär von der Hefe (Swi6-Protein) bis zum Menschen (M31) konserviert (Wang et al., 2000). HP1 weist zwei konservierte Domänen auf. Die N-terminale Chromo-Domäne (chromatin organization

modifer; Paro und Hogness, 1991) und die C-terminale über eine flexible Linker-Region verbundene Chromo-Shadow-Domäne (Aasland und Stewart, 1995). Durch eine Hetero- bzw. Homodimerisierung entstehen Flächen für weitere Interaktionen, so dass es scheint, dass HP1 eine Funktion als flexibles Linker-Modul im Heterochromatin ausübt (Eissenberg und Elgin, 2000). Auch HP1 ist nur transient mit dem Chromatin assoziiert. Dies zeigt, dass selbst das Heterochromatin dynamisch verändert werden kann (Cheutin et al., 2003).

### 1.2 High mobility group (HMG) Proteine

Die häufigsten chromosomalen Nicht-Histon-Proteine in eukaryontischen Zellen sind die High mobility group (HMG) Proteine. Ihr Name leitet sich von ihrem Laufverhalten bei einer SDS-Gelelektrophorese ab. HMG Proteine besitzen einige gemeinsame chemische und physikalische Eigenschaften. So können sie vom Chromatin mit 0,35 M NaCl extrahiert werden, sind löslich in 5% Perchlorsäure oder Trichlorsäure, besitzen eine molekulare Masse kleiner als 30 kD und weisen einen hohen Anteil an geladenen Aminosäuren auf (Johns, 1982). Die HMG Proteinfamilie wird in 3 Unterfamilien unterteilt, die HMGA-Familie (früher bekannt als HMGI/Y), die HMGB-Familie (früher bekannt als HMG1/2) und die HMGN-Familie (früher bekannt als HMG14/17). Jede dieser drei Unterfamilien besitzt eine einzigartige Proteinsignatur und charakteristische funktionelle Sequenzmotive. Mit Hilfe dieser funktionellen Sequenzmotive erfolgt die Interaktion zwischen HMG Proteinen und DNA bzw. Chromatin. Das Bindungsmotiv der HMGA Proteine ist der sogenannte AT-Hook, die HMG-Box ist das Bindungsmotiv der HMGB Proteine und die nukleosomale Bindungsdomäne ist das charakteristische Bindungsmotiv der HMGN Proteine. Alle diese HMG Proteine fungieren als Architekturelemente des Chromatins. Sie besitzen die Fähigkeit, die Struktur ihrer Zielstellen zu modifizieren und somit strukturelle Veränderungen der DNA bzw. des Chromatins zu induzieren, um so DNA-abhängige Prozesse zu unterstützen. Auch HMG Proteine wurden als sehr mobile Proteine beschrieben, die nur transient an die DNA bzw. Chromatin binden (Misteli et al., 2000; Hock et al., 1998a; Lührs et al., 2002; Catez et al., 2003; Harrer et al., 2004; zur Publikation angenommen). Im Folgenden wird auf die Funktionen der einzelnen HMG-Proteinfamilien näher eingegangen.

#### 1.2.1 Die HMGA-Familie

Die HMGA-Familie besteht aus drei Mitgliedern, das HMGA1a (früher bekannt als HMG-I), das HMGA1b (früher bekannt als HMG-Y) und das HMGA2 (früher bekannt als HMG-C). HMGA1a und HMGA1b sind zwei Spleißvarianten, die sich durch 11 Aminosäuren unterscheiden. Die molekulare Masse von HMGA1a beträgt 11,6 kD, die von HMGA1b 10,6 kD und HMGA2 besitzt eine molekulare Masse von 12 kD.

Es wurde gezeigt, dass HMGA Proteine präferenziell an die kleine Furche der B-DNA mit kleinen AT-reichen Abschnitten binden (Strauss und Varshavsky, 1984; Solomon et al., 1986; Reeves et al., 1987). Diese DNA-Bindung erfolgt über drei unabhängige AT-Hook-DNA-Bindungsmotive, wobei jedes AT-Hook-Motiv einen konservierten Sequenzabschnitt (Prolin-Argenin-Glycin-Argenin-Prolin) besitzt. Dieses DNA-Bindungsmotiv findet man auch in anderen Proteinen, wie Transkriptionsfaktoren oder Komponenten von Chromatinmodellierenden Komplexen (Aravind und Landsman, 1998). Das AT-Hook-Motiv erkennt die Bindungssequenz AA(A/T)T in ihrer Ziel-DNA. Entscheidender bei einer Bindung an die DNA scheint aber deren Struktur zu sein. So binden HMGA Proteine präferenziell an DNA mit verdrehter oder geknickter Anordnung, wie zum Beispiel „Supercoiled“ DNA (Nissen und Reeves, 1995; Bustin und Reeves, 1996), „4-way-junctions“, ungepaarten Regionen AT-reicher DNA (Liu et al., 1999) und geknickte DNA an der Oberfläche des Nukleosoms (Reeves und Nissen, 1993; Reeves und Wolffe, 1996).

Abhängig von der Sequenz, der Organisation, der Topologie oder der Länge des DNA-Substrats, kann eine HMGA Bindung lineare DNA verbiegen, Verbiegungen und Knicke entfernen, entwinden oder Schleifen bilden (Lehn et al., 1988; Falvo et al., 1995; Chase et al., 1999; Bagga et al., 2000; Liu et al., 2000). Ebenfalls kann eine Bindung von HMGA an entspannter Plasmid DNA *in vitro* „Supercoils“ einführen (Nissen und Reeves, 1995). Es wird diskutiert, dass die Konformationsänderungen des DNA-Substrates durch unterschiedliche Mechanismen verursacht werden können. Beispielsweise könnte die gleichzeitige Bindung der drei AT-Hooks eines einzelnen HMGA Moleküls an weit entfernten Bereichen des DNA-Fadens, oder die gleichzeitige Bindung mehrerer HMGA Moleküle an lokale Bereiche des DNA-Moleküls, gefolgt von einem nicht-kovalentem „cross-linking“ verschiedener DNA Moleküle, die Konformationsänderung verursachen (Reeves, 2001). Neben der DNA interagieren HMGA Proteine ebenfalls mit zahlreichen Proteinen, meist Transkriptionsfaktoren (z.B. AP-1, c-Jun, NF- $\kappa$ B p50/p56, Pu.1, SRF u.a.).

HMGA Proteine gehören zu den am stärksten modifizierten Proteinen im Zellkern. So werden HMGA Proteine durch Phosphorylierungen, Azetylierungen, Methylierungen und Poly-ADP-Ribosylierungen posttranslational modifiziert (zusammengefasst in Reeves und Beckerbauer, 2001). Diese Modifikationen sind dynamische und schnelle Antworten auf Ereignisse von intra- und extrazellulären Signalen, die die Substrat-Bindungseigenschaften und die biologischen Aktivitäten von HMGA beeinflussen. Zum Beispiel wird die Affinität der DNA Bindung durch Phosphorylierungen und Azetylierungen *in vitro* reguliert (Nissen et al., 1991; Reeves et al., 1991). Die Zellzyklus-abhängige Phosphorylierung von HMGA wird von endogenen zellulären Signalen kontrolliert (Detivaud et al., 1999), aber auch Signalereignisse an der Zelloberfläche können den Status der Phosphorylierungen von HMGA beeinflussen (Wang et al., 1995, 1997; Banks et al., 2000; Xiao et al., 2000).

Die biologischen Funktionen von HMGA Proteinen sind vielfältig. Sie sind beispielsweise aktiv an der dynamischen Änderung der Chromatinstruktur während der Chromosomenkondensation und Zellteilung beteiligt (Disney et al., 1989; Reeves 1992; Saitoh und Laemmli, 1994). Weiter unterstützt die von HMGA induzierte Konformationsänderung den Aufbau von Repressoren oder Aktivatoren in der Nähe regulatorischer Bereiche. Ein sehr gut untersuchtes Beispiel ist der Einfluss der HMGA Proteine auf die Interferon  $\beta$  (IFN- $\beta$ )-Expression. Durch Bindung von HMGA1 an einen spezifischen regulatorischen Bereich im Interferon  $\beta$  Enhancer werden Verbiegungen der DNA entfernt und Transkriptionsfaktoren rekrutiert. Dadurch entsteht eine stabile Nukleoproteinstruktur, das sogenannte Enhanceosom (Thanos und Maniatis, 1995). Weiter wird der „SWI/SNF nucleosome remodeling complex“ rekrutiert, welcher die TATA-Box zugänglich für das Polymerase II Holoenzym macht (Agesti und Bianchi, 2003). Eine Azetylierung der HMGA1 Proteine durch Histonazetylasen führt wiederum zur Auflösung des Enhanceosoms (Munshi et al., 1998).

HMGA Proteine werden hauptsächlich in undifferenzierten Zellen oder Embryonalzellen exprimiert. In differenzierten Zellen ist nur wenig HMGA-Expression nachweisbar (Bustin und Reeves 1996; Chiappetta et al., 1996). Eine abnorme Expression von HMGA ist meist mit einer Veränderung des zellulären Wachstums und Differenzierung verbunden. Ein Fehlen von HMGA2 (HMGA2 Knock-Out-Maus) führt zum Beispiel zu einem Zwergenwachstum und ist als Pygmäenphänotyp bekannt (Zhou et al., 1995). Bei einer Überexpression von HMGA2 wiederum wurden vermehrt Fettzellen gebildet, was darauf hinweist, dass HMGA2 eine wichtige Rolle in der Adipogenese spielt (Anand und Chada, 2000). Mittels Mikroinjektionsversuche konnte festgestellt werden, dass durch eine HMGA-Überexpression während der Maus-Embryogenese eine vorzeitige Aktivierung des embryonalen Genoms induziert werden kann (Beaujean et al., 2000).

HMGA Proteine werden auch in Verbindung mit Krebs genannt. Sie sind in vielen malignen Tumoren überexprimiert, beispielsweise bei Brust-, Prostata-, Colon-, Magen- Haut- und Lungenkrebs (Reeves und Beckerbauer, 2001). Die Überexpression korreliert mit der Malignizität und der möglichen Metastasierung (Tallini und Dal Cin, 1999). Daher wird HMGA1 auch als möglicher diagnostischer Marker für die Malignizität bei vielen Krebsarten gehandelt. Ebenso sind in vielen benignen Bindegewebs-Tumoren HMGA2 Proteine überexprimiert (Battista et al., 1999; Arlotta et al., 2000).

### **1.2.2 Die HMGB-Familie**

Die HMGB-Familie besteht aus drei Mitgliedern, das HMGB1 (früher bekannt als HMG-1), das HMGB2 (früher bekannt als HMG-2) und das weniger erforschte HMGB3 (früher bekannt als HMG-2a). Die Mitglieder der HMGB-Familie besitzen im Vergleich zu den anderen HMG-Familien eine relativ große molekulare Masse von ca. 25 kD und sind die am häufigsten

vorkommenden zellulären HMG-Proteine (1 Molekül pro 10-15 Nukleosomen). HMGB1 und HMGB2 Proteine kommen in allen eukaryontischen Zellen vor und werden von jeweils eigenen Genen kodiert. Dennoch besitzen sie eine 82%ige Identität in der Aminosäuresequenz. Die Sequenz von HMGB1 ist evolutionär außerordentlich konserviert. Bei allen bislang untersuchten Säugern findet man nur 2 Substitutionen innerhalb 214 Aminosäuren. Eine derart starke Konservierung lässt vermuten, dass HMGB Proteine eine sehr wichtige Funktion ausüben müssen (Agresti und Bianchi, 2003).

Kennzeichnend für die HMGB Proteine sind 2 HMG-Box-Bindungsdomänen, die N-terminale A-Domäne und eine weitere zentral gelegen B-Domäne. Jede HMG-Box besteht aus ca. 80-90 extrem basische Aminosäuren. Zusätzlich besitzen HMGB Proteine einen langen, stark negativ geladenen C-terminalen Bereich bestehend aus 30 (HMGB1) bzw. 20 (HMGB2) aufeinanderfolgenden Aspartat- und Glutamatresten. Die HMG-Box ist ein DNA-Bindungsmotiv, das an die kleine Furche von B-DNA bindet. Auch dieses Bindungsmotiv findet man häufig in Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise UBF (upstream binding factor), SRY (mammalian testis-determining factor) oder LEF1/TCF-1a (lymphoid enhancer binding factor). Beide HMG-Box-Domänen (A bzw. B) binden an die kleine Furche der DNA, wobei die A-Domäne eine höhere Affinität für veränderte DNA-Konformationen aufweist als die B-Domäne, diese kann wiederum einen rechten Winkel in die lineare DNA einführen (zusammengefasst in Thomas und Travers, 2001).

Die Hauptfunktion der HMGB Proteine ist es, durch Bindung eine Verbiegung der DNA zu erzeugen. Präferentiell binden HMGB Proteine aber an bereits veränderte DNA-Konformationen, wie zum Beispiel „4-way-junctions“, DNA mit eingebauten Nukleotid Analogen (Krynetski et al., 2003), durch UV Bestrahlung beschädigte DNA (Pasheva et al., 1998) und durch Cisplatin modifizierte DNA (Ohndorf et al., 1999). Beispielsweise binden HMGB Proteine an durch Cisplatin modifizierte DNA und blockieren so DNA-Reparatur-Mechanismen (He et al., 2000; Nagatani et al., 2001). Cisplatin wird daher sehr effektiv als Chemotherapeutikum bei Tumoren wie Hodenkrebs und einigen Brustkrebsarten eingesetzt, bei denen HMGB Proteine überexprimiert werden (He et al., 2000).

HMGB ist eines der mobilsten nukleären Proteine (Scaffidi et al., 2002) und ist in der Lage, in 1,5 Sekunden den ganzen Zellkern zu durchqueren. Daraus folgt die Überlegung, dass HMGB Proteine allein durch Diffusion zu ihren potentiellen Zielstellen gelangen und eher durch das „Versuch-Irrtum Prinzip“ an der Zielstelle binden können (zusammengefasst in Agresti und Bianchi, 2003).

Auch HMGB Proteine können Gentranskription beeinflussen. Durch *in-vitro* Experimente wurde gezeigt, dass HMGB1 die Sequenz-spezifische Bindung von Progesteron-Rezeptoren an ihre „Response Elemente“ erhöht, indem HMGB1 an den DNA-Abschnitt des „Response Elements“ bindet, dieses dabei verbiegt und so die bereits gebogene DNA regelrecht für

andere Faktoren anbietet (Onate et al., 1994). Das gleiche Prinzip wurde auch für einen Östrogen-Rezeptor beschrieben (Verrier et al., 1997).

Auf der anderen Seite kann HMGB die RNA-Polymerase II abhängige Transkription unterdrücken. HMGB1 kann mit dem TBP-Protein (TATA-Box-binding protein) einen Komplex bilden. Dadurch wird die Bildung des Präinitiationskomplexes durch Konkurrenz der TFIIB-Interaktion mit TBP unterbunden (Ge und Roeder, 1994). Andererseits stabilisiert und aktiviert HMGB2 den TBP-beinhaltenen TFIID-TFIIA-Komplex, der an die Promotor-DNA gebunden ist (Shykind et al., 1995). Auch am Aufbau des Enhanceosoms soll HMGB beteiligt sein. Die Vorstellung ist, dass HMGB die entsprechende DNA biegt und dann andere Proteine an diese gebogene DNA binden (Agresti und Bianchi, 2003). HMGB Proteine assoziieren auch mit der nukleosomalen Linker-DNA und können so das „Chromatin Remodeling“ durch die Bindung der „Remodeling“ Maschinerie ACF (Drosophila) unterstützen. An der nun „flexibleren“ Linker-DNA können die Nukleosomen verschoben werden (Bonaldi et al., 2003). Allgemein kann gesagt werden, dass HMGB Proteine verschiedene DNA-Protein-Interaktionen beschleunigen und ihre Aktivität steigern.

### **1.2.3 Die HMGN-Familie**

HMGN Proteine wurden erstmals aus Säugerzellen isoliert und als chromosomale Nicht-Histon-Proteine klassifiziert (Johns, 1982). Sie wurden später in allen Zellen der bislang analysierten Säugern und Vertebraten gefunden. HMGN Proteine besitzen, im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der HMG-Familie, eine höhere Affinität zu Nukleosomen als zu DNA. Es gibt verschiedene Mitglieder der HMGN-Familie. Die Proteine HMGN1 (12kD) und HMGN2 (10kD), früher bekannt als HMG14 und HMG17, sind in fast allen Zellen von Vertebraten vorhanden und am besten untersucht. Die erst kürzlich entdeckten Mitglieder HMGN4 (Birger et al., 2001) und HMGN3 (früher bekannt als Trip7; West et al., 2001) von dem es zwei Spleißvarianten gibt (HMGN3a, und HMGN3b) sind HMGN1 und HMGN2 sehr ähnlich, weisen aber eine gewebsspezifische Verteilung auf und kommen in geringeren Mengen als HMGN1 und HMGN2 vor. Das NSBP1 (auch bekannt als NBP-45; Shirakawa et al., 2000) hat eine deutlich größere Molekularmasse (45kD) als HMGN1 oder HMGN2 und zeigt mit diesen nur Übereinstimmungen in den ersten 85 Aminosäuren. Im Vergleich zu HMGN1 und HMGN2 wird NSBP1 in nur geringen Mengen exprimiert. Im Durchschnitt enthält ein Zellkern  $1 \times 10^5$  HMGN1 und HMGN2 Moleküle. Dies reicht aus, um an ca. 2 % der Nukleosomen binden zu können (Johns, 1982).

#### **1.2.3.1 Funktionelle Domänen der HMGN Proteinen**

HMGN Proteine bestehen aus drei funktionellen Domänen, das zweigeteilte Kernlokalisationssignal (nuclear localisation signal; NLS), die nukleosomale Bindungsdomäne

(nucleosome-binding domain; NBD) und die Chromatin Aktivierungsdomäne (chromatin-unfolding domain; CHUD). Alle funktionellen Domänen sind in den orthologen Genen verschiedener Spezies hoch konserviert.



**Abb.5:** Die funktionellen Domänen der HMGN Proteine HMGN1 (ehemals HMG14), HMGN2 (ehemals HMG17), HMGN3 (ehemals Trip7) und HMGN4 (neues Protein: Genbanknummer: NM\_006353). Alle HMGN Proteine besitzen drei funktionelle Domänen: ein zweigeteiltes Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal, NLS), eine nukleosomale Bindungsdomäne (nucleosomal binding domain, NBD) und eine Chromatin Aktivierungs Domäne (chromatin unfolding domain, CHUD). Die meisten konservierten Aminosäuren sind angegeben. Die CHUD variiert zwischen den einzelnen HMGN Proteinvarianten. Benachbarte Aminosäuren können funktionell zur CHUD gehören (aus Bustin, 2001).

Das **Kernlokalisierungssignal (NLS)** besteht aus zwei Domänen, den ersten 4 N-terminalen Aminosäuren (PKRK) und einer Domäne aus 5 Aminosäuren zwischen der nukleosomalen Bindungsdomäne und der Chromatin Aktivierungsdomäne (siehe Abb. 5). Durch das Kernlokalisierungssignal ist es den HMGN Proteinen möglich in den Zellkern zu gelangen. Dies geschieht über einen Importin-abhängigen Transport und ist somit ein aktiver energieverbrauchender Vorgang, der einen effektiven Kernimport gewährleistet (Hock et al., 1998b).

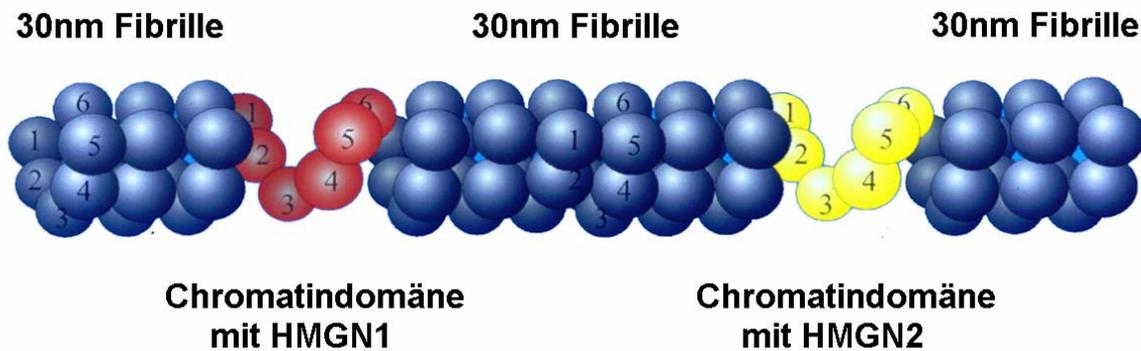
Das wohl charakteristischste Motiv der HMGN Proteine ist die **nukleosomale Bindungsdomäne (NBD)** (siehe Abb. 5). Diese besteht aus 30 positiv geladenen Aminosäuren und ist stark konserviert. Die aminoterminalen Region der nukleosomalen Bindungsdomäne besitzt einen hohen Anteil an Argininresten, während die carboxyterminale Region reich an den Aminosäuren Prolin und Lysin ist (Bustin et al., 1995). Die NBD erkennt die Struktur des nukleosomalen „Core“-Partikels (Histone und 147 bp DNA). Die Bindung zwischen dem Motiv und dem Nukleosom findet 25 bp vom Ende der DNA und im Bereich der zwei großen Furchen, die die nukleosomale Achse umgeben, statt (Alfonso et al., 1994). Die Bindung an diese „Core“-Partikel ist unabhängig von der sich umwickelnden DNA (Shirakawa et al., 2000). Auch wurde durch Experimente mit spezifischen Punktmutationen innerhalb der NBD herausgefunden, dass benachbarte Aminosäuren für die korrekte Bindung an die Nukleosomen benötigt werden.

Die **Chromatin Aktivierungsdomäne (CHUD)** besteht aus einer negativ geladenen Region, die den HMGN Proteinen die Fähigkeit verleiht das Chromatin aufzulockern (siehe Abb. 5). Mittels Deletionsmutanten, denen die CHUD-Domäne fehlte, wurde gezeigt, dass diese

Mutanten zwar an Nukleosomen binden können, aber nicht mehr fähig sind das Chromatin aufzulockern (Trieschmann et al., 1995a; Ding et al., 1997). Weiter konnte gezeigt werden, dass die C-terminale Region von HMGN1, die die CHUD-Domäne beinhaltet, mit dem aminoterminalen Bereich des Histon H3 interagiert (Trieschmann et al., 1998). Weiter ist bekannt, dass der Kontaktbereich der HMGN1 bzw. HMGN2 Proteine mit dem Nukleosom teilweise mit dem von Histon H1 überlappen (Alfonso et al., 1994). Da Histone H1 als Linker-Proteine eher mit der Kompaktierung des Chromatins in Verbindung gebracht wird, könnte diese Überlappung die Interaktion zwischen dem Histon H1 und dem Chromatin stören und so zu einer Auflockerung des Chromatins führen (Bustin, 1999). Tatsächlich konkurrieren HMGN Proteine und Histon H1 *in vivo* dynamisch um die gleichen Bindungsstellen (Catez et al., 2002).

### **1.2.3.2 Interaktion der HMGN Proteine mit dem Chromatin**

Die chromosomalen HMGN Proteine sind die einzigen bekannten Zellkernproteine, die spezifisch an Nukleosomen binden (Mardian et al., 1980). Sie besitzen eine größere Affinität zu Nukleosomen als zu DNA und interagieren sowohl mit der nukleosomalen DNA (Alfonso et al., 1994) als auch mit dem aminoterminalen Bereich der nukleosomalen Histone (Crippa et al., 1992; Trieschmann 1998; Shirakawa et al., 2000). HMGN Proteine binden kooperativ als Homodimere an Nukleosomen, entweder zwei Moleküle HMGN1 oder zwei Moleküle HMGN2 (Postnikov et al., 1995). Die Bindung der einzelnen HMGN Moleküle findet, wie oben erwähnt, 25 bp vom Ende der DNA und im Bereich der zwei großen Furchen, die die nukleosomale Achse umgeben, statt. HMGN Proteine überbrücken dadurch die zwei benachbarten Doppel-Helix-DNA-Stränge auf der Oberfläche des Core Partikels und interagieren mit der DNA ca. 25 bp vom Eingangs- bzw. Ausgangspunkt des „Core“-Partikels (Modell von Bustin, 2001). Die HMGN-Homodimere assoziieren durchschnittlich mit sechs aufeinanderfolgende Nukleosomen und bilden so Chromatinbereiche, in denen entweder nur HMGN1- oder nur HMGN2-Proteine zu finden sind (Postnikov et al., 1997; Abb. 6). Diese Chromatinabschnitte sind schließlich noch zu größeren Chromatindomänen zusammengefasst. Auch diese Domänen enthalten entweder nur HMGN1 oder HMGN2 (Hock et al., 1998a). Durch die Bindung der HMGN Proteine an das Nukleosom wird der Ein- und Austrittswinkel der Linker-DNA vergrößert, wodurch eine Auflockerung des Chromatins entstehen kann, für die letztendlich die Chromatin-Aktivierungsdomäne verantwortlich ist (Abb. 6).



**Abb.6:** Modell der Organisation der HMGN Proteine im Chromatin. Die Bindung von HMGN1- oder HMGN2-Homodimeren an sechs aufeinanderfolgenden Nukleosomen bewirkt die Auflockerung der 30nm Fibrille. Dabei entstehen Cluster mit HMGN1 (rot) oder HMGN2 (gelb). Diese Cluster können selbst wieder Bestandteil größerer Chromatindomänen sein. In diesem Modell ist die 30nm Fibrille als Solenoid dargestellt (Finch und Klug, 1976). In einem alternativen Modell kann die 30nm Fibrille als Zickzack-Modell dargestellt werden (Bednar et al., 1998). Der Effekt der HMGN Proteine wäre in dieser Darstellung identisch (vgl. Bustin, 1999).

Diese Chromatin-Aktivierungsdomäne interagiert mit dem aminoterminalen Bereich des Histon H3, welches deazetyliert eine Kompaktierung des Chromatins verursacht (Trieschmann et al., 1998). Weiter wurde festgestellt, dass HMGN Proteine mit gleichen Bereichen am Nukleosom interagieren wie Histon H1 (Alfonso et al., 1994). Diese Überlappung könnte die Interaktion von Histon H1 mit dem Chromatin beeinträchtigen und somit zu der oben beschriebenen Auflockerung des Chromatins führen. Die Interaktion zwischen HMGN Proteinen und dem Nukleosom, aber auch mit anderen Proteinen, kann, wie für „Core“-Histone und Histon H1 beschrieben, zusätzlich durch posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung und Azetylierung reguliert werden (Bergel et al., 2000; Herrera et al., 1999; Lührs et al., 2002; Prymakowska-Bosak et al., 2001). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Histonazetyltransferase PCAF HMGN2 spezifisch am zweiten Lysinrest azetyliert und damit die Interaktion mit dem Nukleosom reduziert (Herrera et al., 1999). Bei HMGN1 wurde die nukleosomale Bindungsdomäne als ein Hauptziel für Azetylierungen *in vivo* beschrieben. Die Histonazetyltransferase p300 schwächt die Bindungsaffinität von HMGN1 zu den Nukleosomen durch Azetylierung mehrerer Lysinreste (Bergel et al., 2000). Die Kinasen Rsk2 und Msk1 phosphorylieren HMGN1 am sechsten Serinrest und modifizieren dadurch HMGN1 so, dass ebenfalls die Affinität der Proteine zu Nukleosomen reduziert wird. Die Proteinkinase C (PKC) wiederum kann *in vitro* und *in vivo* zwei Serinreste in der nukleosomalen Bindungsdomäne sowohl in HMGN1 als auch in HMGN2 phosphorylieren. Diese Modifikation lässt die HMGN Proteine vom Nukleosom dissoziieren und fördert die Interaktion mit einem spezifischen 14.3.3 Isotyp (Prymakowska-Bosak et al., 2001, 2002). Die posttranslationalen Modifikationen regulieren also die Bindung

der HMGN Proteine an das Chromatin und führen eine zusätzliche Komplexität und eine vielseitigere dynamische Interaktion der HMGN Proteine im Zellkern ein.

### 1.2.3.3 Verteilung und Mobilität der HMGN Proteine

Aufgrund der oben genannten Eigenschaften und der Tatsache, dass HMGN Proteine größere Chromatin-Domänen bilden, scheinen HMGN Proteine ein integraler Teil des Chromatins zu sein, der permanent mit spezifischen Chromatinregionen assoziiert ist. Durch Studien an lebenden Zellen konnte herausgefunden werden, dass die Verteilung von HMGN Proteinen abhängig von der Transkriptionsaktivität der Zelle ist und HMGN Proteine nicht statisch sind, sondern sich dynamisch umverteilen können. In Zellen, die eine hohe Transkriptionsaktivität aufwiesen, waren HMGN Proteine an Orten aktiver Transkription lokalisiert. Bei niedriger Transkriptionsaktivität dagegen wurden HMGN Proteine in Nicht-Chromatinstrukturen gefunden, den sogenannten Interchromatin-Granula. Bei vollständiger Hemmung der Transkription ist HMGN2 letztendlich ausschließlich in den Interchromatin-Granula akkumuliert. HMGN2 zeigt also eine von der Transkriptionsaktivität abhängige und dynamische Verteilung (Hock et al., 1998a). Während in der Interphase HMGN Proteine mit dem Chromatin assoziieren, sind sie nicht oder nur schwach mit mitotischen Chromosomen assoziiert (Hock et al., 1998b). Sie sind während der Mitose im Wesentlichen im gesamten Zytoplasma verteilt. Nachdem die Kernmembran in der späten Telophase wieder gebildet wird, werden die HMGN Proteine aktiv über einen Importin-abhängigen Mechanismus in die Tochterkerne transportiert (Hock et al., 1998b; Prymakowska-Bosak et al., 2001). Das zweigeteilte Kernlokalisierungssignal bindet an Importin  $\alpha$  und gelangt so über den schnellen Importin/GTPase-Weg in den Zellkern. Da HMGN Proteine sehr klein sind, könnten sie allein durch Diffusion in den Zellkern gelangen. Der erleichterte Importmechanismus dagegen lässt vermuten, dass diese Proteine direkt nach der Mitose rasch in den Kern zurücktransportiert werden müssen, um ihre Aufgabe am Chromatin erfüllen zu können (Hock et al., 1998b). Während der Mitose ist die nukleosomale Bindungsdomäne an zwei konservierten Serinen phosphoryliert und die negative Ladung der Phosphate mindert die Bindung der Proteine an Nukleosomen (Prymakowska-Bosak et al., 2001). Diese Phosphorylierung unterstützt zusätzlich die Interaktion der HMGN Proteine mit dem Protein 14.3.3 $\zeta$ , welches die HMGN Proteine im Zytoplasma zurückhält. Um wieder in den Zellkern zu gelangen, müssen die HMGN Proteine nach der Mitose wieder dephosphoryliert werden. Nur dephosphorylierte HMGN Proteine werden in den Zellkern importiert (Prymakowska-Bosak et al., 2002).

Neuere Untersuchungen ergaben, dass ein Großteil der HMGN Proteine in makromolekulare Komplexe organisiert sind (Lim et al., 2002). In HeLa Zellen wurde sowohl HMGN1 als auch HMGN2 in verschiedenen metastabilen Komplexen gefunden, deren einzelnen Komponenten noch nicht identifiziert wurden. Eine Inhibition der Transkription erhöhte die

Anzahl der freien, das heißt nicht komplexgebundenen, HMGN Proteine. Dies lässt vermuten, dass die Bindung der HMGN Proteine in den Komplexen abhängig vom metabolischen Zustand der Zelle ist. Interessanterweise ist die nukleosomale Bindungsaffinität von komplexgebundenen HMGN Proteinen größer als die von freien HMGN Proteinen (Lim et al., 2002). Es wird spekuliert, dass HMGN Proteine transient an Komplexe binden und sich zwischen den verschiedenen Komplexen hin und her bewegen können (Catez et al., 2003). Mittels gezielten Bleichens von Zellen (Photobleaching), die ein HMGN-GFP-Fusionsprotein (GFP = green fluorescent protein) exprimieren, wurde durch Messung der Fluoreszenzerholung die intranukleäre Mobilität der HMGN Proteine analysiert (Misteli et al., 2000). Dabei wurde festgestellt, dass sich HMGN1 und HMGN2 Proteine sehr schnell in zufälliger Art mit einer Diffusionskonstante von  $0,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$  durch den gesamten Zellkern bewegen. Dies bedeutet, dass HMGN Proteine in nur 5 Sekunden den gesamten Zellkern durchqueren können. Die Geschwindigkeit der Proteine hängt natürlich davon ab, wie lange ein Protein an ein Substrat gebunden ist. Es wurde deshalb kalkuliert, dass ca. 90% aller HMGN Proteine zu jeder Zeit zumindest transient gebunden vorliegen müssten.

### **1.2.3.4 Biologische Funktionen der HMGN Proteine**

Wie bereits beschrieben, sind HMGN Proteine Architekturelemente des Chromatins, die an Nukleosomen binden und die 30nm Fibrille auflockern (Bustin, 2001). Diese „Auflockerung“ des Chromatins ermöglicht es anderen Proteinen, an die DNA zu gelangen, um dort DNA-relevante Prozesse wie zum Beispiel Transkription, Replikation und DNA-Reparatur zu unterstützen (Ding et al., 1997; Trieschmann et al., 1995a, 1995b; Birger et al., 2003). So wurde mit Hilfe von „simian virus 40“ (SV40) Minichromosomen gezeigt, dass die durch Histon H1 vermittelte Kompaktierung des Chromatins und die damit verbundene transkriptionelle Inhibition der RNA-Polymerase II Aktivität durch HMGN1 aufgehoben werden kann (Ding et al., 1997). Wie oben bereits erwähnt, wurde in lebenden Zellen gezeigt, dass sich HMGN1 und HMGN2 Proteine im Zellkern an Orten transkriptionell aktiver Gene konzentrieren (Hock et al., 1998a). Ein weiteres Beispiel dafür, dass die Bindung von HMGN an das Nukleosom eine Voraussetzung für die Transkription ist, wurde in permeabilisierten Zellen gezeigt. Durch Inkubation dieser Zellen mit einem der nukleosomalen Bindungsdomäne entsprechendem Peptid, wurden die endogenen HMGN Proteine von ihren Bindungsstellen verdrängt und die Transkription durch RNA-Polymerase II unterbunden (Hock et al., 1998a). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass HMGN Proteine auch die DNA-Reparatur beeinflussen. Mit Hilfe embryonaler Mausfibroblasten aus HMGN1 „knock-out“ Mäusen wurde gefunden, dass HMGN1 die DNA-Reparatur-Rate erhöht, indem es die Chromatinkonformation ändert und damit Komponenten Zugang zur DNA ermöglicht, die bei der Reparatur von UV-Schäden involviert sind (Birger et al., 2003).

Die Frage die sich nun stellt ist, wie HMGN Proteine in der Lage sind, das Chromatin aufzulockern und damit DNA-relevante Prozesse zu ermöglichen. Dabei spielt wohl die negativ geladene CHUD-Domäne die maßgebliche Rolle. Wie oben schon erläutert, interagiert diese mit den zwei potentiellen Hauptakteuren der Chromatinkompaktierung, dem Histon H1 und dem Histon H3. Eine Entfernung oder Azetylierung des aminoterminalen Bereichs von Histon H3 ist stets mit einer Auflockerung des Chromatins verbunden (Trieschmann et al., 1998). Da HMGN Proteine an gleichen Bereichen am Nukleosom interagieren wie Histon H1 (Alfonso et al., 1994) und gezeigt wurde, dass beide Proteine um diese Bindungsstelle konkurrieren (Catez et al. 2002), wäre die Konkurrenz mit Histon H1 eine Möglichkeit, die Auflockerung des Chromatins durch HMGN Proteine zu erklären. Vorstellbar ist ein dynamisches Zusammenspiel von Histon H1 und HMGN Proteinen, die dabei die lokale Struktur des Chromatins modulieren, wobei HMGN Proteine nicht in der Lage sind, ein bereits gebundenes Histon H1 zu verdrängen, aber ein Überschuss an HMGN Proteinen die Verweildauer von H1 am Chromatin verringert. Dadurch würde die Zugänglichkeit an die Nukleosomen ermöglicht und ein Fenster für die Chromatinbindung regulatorischer Faktoren und chromatinmodifizierender Komplexe geöffnet (Catez et al., 2003).

Eine weitere wichtige Frage ist, wie HMGN Proteine an ihre Zielstellen gelangen. Eine Möglichkeit ist durch die Mobilität der Proteine gegeben. Bei  $10^7$  Nukleosomen und  $10^5$  HMGN-Molekülen in einer eukaryontischen Zelle würde eine zufällige Kollision zwischen einem Nukleosom und einem HMGN-Molekül alle 0,2 Sekunden stattfinden und eine Kollision mit einem spezifischen Nukleosom alle 20 Sekunden. HMGN Proteine könnten folglich zufällig ihre bestimmten Bindungsstellen finden und je nachdem, ob andere regulatorische Proteine rekrutiert werden, könnten DNA-relevante Prozesse unterstützt werden, oder sie dissoziieren wirkungslos wieder vom Chromatin ab. Die bereits erwähnten metastabilen Proteinkomplexe, mit denen HMGN Proteine assoziiert sind, könnten die Bindung und Spezifität der HMGN-Nukleosom-Interaktion erhöhen, beispielsweise durch Erkennung spezifischer Sequenzelemente, durch posttranslationale Modifikationen der Histonenden, oder aber auch durch andere Proteine, die HMGN zu spezifischen Chromatinregionen bringen (Catez et al., 2003). Die nukleosomale Bindungsaffinität von komplexgebundenen HMGN Proteinen ist auf jeden Fall größer als die von freien HMGN Proteinen (Lim et al., 2002). Vorstellbar wäre, dass einige dieser Komplexe als HMGN-Reservoir dienen, aber auch, dass durch das beständige Wechseln der HMGN Proteine zwischen verschiedenen Komplexen die Proteine an Chromatinregionen gelangen, jeweils abhängig von den zellulären Bedingungen und Bedürfnissen (Khochbin und Kao, 2001). Damit wären HMGN Proteine epigenetische Faktoren, welche die Gen-Expression im Kontext von Chromatin regulieren.

### **1.2.3.5 Die Rolle von HMGN Proteinen in Differenzierungs- und embryonalen Entwicklungsprozessen**

Die Grundlage von zellulären Differenzierungsvorgängen und embryonalen Entwicklungsprozessen ist die differentielle Genaktivität, wobei die Struktur und die Zusammensetzung des Chromatins eine sehr wichtige Rolle spielen (zusammengefasst von Patterton und Wolffe, 1996). Nicht-Histon-Proteine wie HMGN1 und HMGN2 Proteine, die als Architekturelemente die Struktur des Chromatins mitbestimmen, könnten also die Genexpression und damit Differenzierungsprozesse beeinflussen. Bislang ist nur sehr wenig über die Rolle der HMGN Proteine während der embryonalen Entwicklung und bei zellulären Differenzierungsprozessen bekannt. Ergebnisse aus verschiedenen Modellsystemen zeigten aber, dass sich die Transkription der *HMGN*-Gene und der zelluläre Bestand der HMGN Proteine bei Differenzierungsprozessen deutlich verändern kann, wie beispielsweise während der Erythropoiese bei Hühnern (Crippa et al., 1991), der Myogenese bei Ratten (Begum et al., 1990), aber auch bei der Differenzierung von Osteoblasten bei Säugern (Shakoori et al., 1993) und der Nierenentwicklung bei Mäusen (Lehtonen und Lehtonen, 2001). Die Differenzierung von Myoblastenzellen zu Myotuben konnte durch eine erhöhte Expression von HMGN1 gestört werden (Pash et al., 1993). Eine regulierte Expression der HMGN Proteine scheint folglich wichtig zu sein für eine ordnungsgemäße Differenzierung. Eine Wegnahme der HMGN Proteine durch Injektion von Antisense Oligonukleotiden bzw. Verdrängung der Proteine durch Injektion eines Peptids, welches der nukleosomalen Bindungsdomäne entsprach, hatte eine Verzögerung der embryonalen Entwicklung von Mausembryonen ab dem 4-Zell-Stadium zur Folge (Mohamed et al., 2001). Diese Ergebnisse sprechen zwar für einen Zusammenhang zwischen HMGN Expression und zelluläre Differenzierung, zeigen aber nicht, ob HMGN Proteine tatsächlich an der Regulation von entwicklungsrelevanten Genen beteiligt sind. Noch völlig unbekannt ist die Regulation der HMGN Expression selbst.

### **1.3 *Xenopus laevis* als Modellsystem zur Analyse der Embryonalentwicklung und der Rolle von Chromatin in embryonalen Entwicklungsprozessen**

Die transkriptionelle Aktivität von spezifischen Genen während der embryonalen Entwicklung wird teilweise durch die Konformation des Chromatins reguliert, die wiederum durch die Aktivität nukleärer Proteine umgeformt und verändert wird (Patterton und Wolffe, 1996). Ein sehr gutes Modellsystem, um die Rolle von Chromatin in Entwicklungsprozessen zu untersuchen, ist der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis*. Der Vorteil dieser Tiere ist, dass sie sich hervorragend für Untersuchungen der frühen embryonalen Entwicklung eignen. Ihre Haltung in Aquarien ist einfach und durch Injektion von Gonadotropin kann die Ablage

einer großen Anzahl von Eiern stimuliert werden. Die Eier lassen sich leicht *in vitro* befruchten und kultivieren. Ihre Entwicklung ist sehr schnell und durch ihre Größe von 1-2 mm Durchmesser eignen sie sich sehr gut für Manipulationen wie Mikroinjektionen und Transplantationen. Nieuwkoop und Faber (1975) beschrieben detailliert den Ablauf der frühen Embryogenese und unterteilten sie in genau definierte Stadien.

*Xenopus laevis* gehört zu einem der best untersuchtesten entwicklungsbiologischen Modellsystemen. Da fundamentale Mechanismen der Entwicklung auch zwischen evolutionär weit entfernten Organismen erhalten sind (DeRobertis und Sasai, 1996), ist die Erforschung molekularer Mechanismen, zellulärer Signalwege und die Interaktion beteiligter Faktoren im Modellsystem *Xenopus laevis* auch auf andere Organismen, beispielsweise auf den Menschen, durchaus übertragbar. Die Embryonalentwicklung hat traditionell einen zentralen Platz in der Biologie und ein klassisches Modellsystem ist die Embryonalentwicklung der Amphibien. Bereits 1924 haben Hans Spemann und Hilde Mangold gezeigt, dass Organisation und Differenzierung des Amphibienkeimes auf induktiven Wechselwirkungen während der Gastrulation beruhen. Durch Transplantationsexperimente beispielsweise zeigten sie, dass ein Explantat der dorsalen Urmundlippe eines Molchembryos während der Gastrulation in einem zweiten Embryo eine zweite Körperachse induzieren kann. Diese zweite Körperachse stammt wesentlich aus dem Gewebe des Empfängerembryos, somit programmierte der verpflanzte „Organisator“ das Entwicklungsschicksal der Empfängerzellen um (Spemann und Mangold, 1924). Mit Hilfe neuerer Techniken auf biochemischer und molekularbiologischer Ebene wurde es ermöglicht, einen tieferen Einblick in grundlegende Prozesse und Mechanismen der Embryogenese zu gewinnen. Inzwischen konnten Spemanns Aussagen molekularbiologisch bestätigt werden. Es wurden beispielsweise aus *Xenopus laevis* Mesoderm-induzierende Proteine, wie Noggin, Mitglieder der FGF- (fibroblast growth factor), TGF $\beta$ - (transforming growth factor)- und Wnt- (wingless) Familie und ihre Rezeptoren isoliert (Sive, 1993). Zusätzlich wurden die Signalwege von Wnt und TGF  $\beta$  entschlüsselt, die das Prinzip der Wachstumsfaktoren verständlicher machten.

Ein weiterer Vorteil des Modellsystems *Xenopus* ist, dass Prozesse wie Furchung, Gastrulation, Neurulation und Organogenese auf zellulärer und morphologischer Ebene sehr gut charakterisiert sind. Der Beginn der zygotischen Transkription im Blastulastadium von *Xenopus* (MBT = Midblastula Transition) ist zeitlich klar festgelegt (Newport und Kirschner, 1984). Dies bringt den Vorteil, dass maternale Proteine und Proteine der zygotischen Transkription unterschieden werden und zusätzlich manipuliert werden können. Die Möglichkeit der Mikroinjektion in die Zygote von *Xenopus* erlaubt es, Proteinmengen mittels Morpholino-Oligonukleotiden („knock-down“) bzw. rekombinanten Proteinen zu manipulieren.

Da die embryonale Entwicklung von *Xenopus laevis* sehr gut charakterisiert ist, bietet sich hiermit die Möglichkeit, neuere Ergebnisse in einem größeren Kontext einzuordnen.

Auch der Ablauf der Oogenese von *Xenopus* ist eingehend bekannt. Die Oogenese beim Menschen wurde beispielsweise erst durch intensive Studien der Oogenese von *Xenopus laevis* verstanden. Die Oogenese beginnt bei *Xenopus* kurz nach der Metamorphose und dauert mehrere Monate. Die Meiose wird dann im Diplotän der Prophase für längere Zeit arretiert, währenddessen die Oozyte heranwächst. Im Kern der Oozyte setzt nun eine hohe transkriptionelle Aktivität ein, wie die charakteristischen Lampenbürstenchromosomen belegen (Callan et al., 1987). Die Transkripte werden mit Proteinen zu RNP-Partikel verpackt, ins Zytoplasma der Oozyte transportiert und für die frühe embryonale Entwicklung gespeichert. Zusätzlich sind bis zu 1500 (multiple) Nukleolen, resultierend aus einer rDNA-Amplifikation, im Kern zu finden, die für die Produktion von Ribosomen zuständig sind. Maternale Vitellogenine aus der Leber werden per Endozytose in die Oozyte aufgenommen und als Dottergranula gespeichert. Die Eireifung erfolgt dann über ein hormonelles Signal, welches wiederum Progesteron aus den Follikelzellen freisetzt und so den Übergang von der meiotischen Prophase in die Metaphase induziert. Nach der Reifung der Oozyten zu Eiern wird die Transkription der endogenen Chromosomen unterdrückt.

Ein klassisches Modell für höher geordnete Chromatinstrukturen stellt der Aufbau der Lampenbürstenchromosomen (LBC) dar. Der Aufbau der LBC mit Schleifen oder Domänen, die an bestimmten DNA-Sequenzen durch Nicht-Histon-Proteine verankert sind, bietet die Möglichkeit, höher geordnete Chromatinstrukturen näher zu untersuchen. LBCs sind spezielle Chromosomen, die charakteristisch für das Diplotän der weiblichen meiotischen Prophase der Amphibien, aber auch anderer Tiergruppen sind (zusammengefasst von Callan, 1986). Die relativ großen Chromosomen sind leicht zu isolieren und lichtmikroskopisch zu untersuchen. Die Achsen bestehen aus linear angeordneten kondensierten Chromomeren, während die Schleifen transkriptionell aktives Chromatin darstellen. Die Schleifen sind voller naszierender Transkripte mit assoziierten Proteinen. Speziell strukturierte Schleifen sind charakteristisch für ganz bestimmte Chromosomen (Callan, 1986). LBC bilden somit ein ideales Werkzeug, um kondensiertes und transkriptionell aktives Chromatin *in situ* zu analysieren. Bisher ist wenig über jene Faktoren bekannt, die zur Umbildung des Interphasechromatins und zur Bildung dieser außergewöhnlichen Chromosomen während der Oogenese führen (Morgan, 2002).

Nach der Reifung der Oozyten zu Eiern wird die Transkription der endogenen Chromosomen unterdrückt. Die Befruchtung leitet dann 11 Furchungsteilungen ein, in Abwesenheit der zygotischen Transkription (Newport und Kirschner, 1984). Ab der Midblastula Transition (ca. 5000 Zellen) wird der Zellzyklus verlängert und die Transkription des embryonalen Genoms wird aktiviert. Allgemein wird das Muster der gewebsspezifischen Genexpression in den

meisten mehrzelligen Organismen sehr früh in der Embryogenese festgelegt. Die Konformation des Chromatins kann dabei die transkriptionelle Aktivität von spezifischen Genen regulieren. Der Zustand des Chromatins wiederum wird durch die Aktivität nukleärer Proteine umgeformt und verändert (Patterson und Wolffe, 1996).

Ein Beispiel für eine entwicklungsregulierte Genexpression in *Xenopus* sind die Histone und deren Varianten. Die Histon-H2A-Variante H2A.X wird beispielsweise in Oozyten in großer Menge angesammelt, verschwindet aber wieder nach der Befruchtung mit fortschreitender Zellteilung (Kleinschmidt und Steinbeisser, 1991; Dimitrov et al., 1994). Linker Histone und deren Varianten werden ebenfalls entwicklungspezifisch während der Embryogenese exprimiert (Khochbin und Wolffe, 1994). Die maternale Histon H1 Variante H1M (bzw. B4) wird beispielsweise nur in Oozyten exprimiert (Smith et al., 1988) und das somatische Histon H1 fehlt zu diesem Zeitpunkt gänzlich (Dimitrov et al., 1993; Hock et al., 1993; Dworkin-Rastl et al., 1994). Die maternale Histon H1 Variante B4 ist weniger basisch als das somatische Histon H1 (Dimitrov et al., 1993) und besitzt somit auch eine geringere Affinität zum Chromatin. Dies verursacht folglich einen geringeren Verpackungsgrad der frühen embryonalen DNA. Ab der Midblastula Transition (MBT), mit Beginn der Transkription des embryonalen Genoms, wird B4-Protein allmählich durch drei somatische Histon H1 Varianten ersetzt und ist mit dem Ende der Gastrulation nicht mehr nachweisbar (Dimitrov et al., 1993; Hock et al., 1993). Ähnliches wurde auch im Mausmodell gefunden. Hier wird die oozytenspezifische Histon H1-Variante H1FOO durch das somatische Histon H1 ab dem 2-Zellstadium ersetzt (Gao et al., 2004).

Interessanterweise korreliert die Expression von Histon H1 in *Xenopus* mit der transkriptionellen Inaktivierung vieler Gene zwischen der MBT und der Neurulation (Wolffe, 1989, Andrews et al., 1991; Bouvet et al., 1994). Es wurde beispielsweise gezeigt, dass Histon H1 die Expression der oozytenspezifischen 5s RNA Gene unterdrückt (Kandolf, 1994; Bouvet, et al., 1994). Ebenso legt Histon H1 selektiv regulatorische Gene still, die für die mesodermale Differenzierung notwendig sind. Dies hat zur Folge, dass ektodermale Zellen im Embryo nur beschränkt auf Mesoderm-spezifische Induktionssignale reagieren können (Steinbach et al., 1997). Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Änderung der Chromatinzusammensetzung einen Einfluss auf die Transkription spezifischer Gene während der embryonalen Entwicklung haben kann.

Neben Histon H1 ist über weitere Chromatinproteine, die die Chromatinzusammensetzung beeinflussen können, wenig bekannt. Lediglich die Expression der HMGB Proteine wurde in der frühen embryonalen Entwicklung von *Xenopus laevis* detailliert beschrieben. Dabei wurde festgestellt, dass HMGB Proteine ebenso wie B4 während der Oogenese bei *Xenopus* akkumulieren und sie in großen Mengen im frühen embryonalen Chromatin vorhanden sind (Kleinschmidt et al., 1983; Ura et al., 1996; Nightingale et al., 1996). HMGB Proteine binden

speziell an die „Linker DNA“, in einer ähnlichen Weise wie Histon H1, aber mit einer geringeren Affinität. Es wird vermutet, dass durch die Bindung von HMGB und B4 an die „Linker DNA“ die Nukleosomen weniger stabil sind und dadurch die schnellen embryonalen Zellzyklen unterstützt werden, was bei einer häufigen Reorganisation des Chromatins von Vorteil ist (Ura et al., 1996; Nightingale et al., 1996). Ebenso wie die Histon H1 Variante B4, nimmt die Menge an HMGB Protein allmählich während der embryonalen Entwicklung ab, einhergehend mit der Ansammlung von somatischem Histon H1 (Kleinschmidt et al., 1983). Über die anderen Mitglieder der HMG-Familie, HMGA und HMGN, und ihre Rolle in der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* ist bislang nichts bekannt.

### 1.4 Aufgabenstellung

Die Aufgabenstellung bestand im Wesentlichen in der Charakterisierung der HMGN Proteine von *Xenopus laevis* (XHMGN). Ausgehend von der Isolierung der entsprechenden cDNAs sollte das Expressionsmuster von *XHMGN1* und *XHMGN2* während der Oogenese und der Embryogenese detailliert analysiert werden. Ebenfalls sollte das Expressionsmuster mit Hilfe spezifischer Antikörper auf Proteinebene dargestellt werden. Weiter sollte die Frage geklärt werden, ob eine Veränderung der HMGN Proteinmengen während der embryonalen Entwicklung zu einer veränderten oder fehlerhaften Embryonalentwicklung führt. Dazu war geplant, Überexpressionsstudien und „knock-down“-Experimente durchzuführen. Die Konsequenzen der veränderten HMGN Proteinmengen sollten auf Chromatinebene, zellulärer Ebene und morphologischer Ebene untersucht werden. Zusätzlich sollte geklärt werden, ob eine veränderte HMGN Expression Auswirkungen auf die Expression spezifischer embryonaler Gene ausüben kann. Die Bearbeitung dieser Fragen sollte zum Verständnis der Funktion der HMGN Proteine und ihrer Rolle in embryonalen Entwicklungsprozessen beitragen und klären helfen, ob diese ubiquitären Chromatinproteine die Expression bestimmter Gene während der Embryonalentwicklung beeinflussen.

## 2 Material

### 2.1 Biologisches Material

#### 2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstier wurde der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* direkt von einer Tierfarm aus Südafrika (South African Snake Farm, Fish Hoek, Cape Province) oder von der Firma Nasco (Wisconsin, USA) bezogen. Als weitere Versuchstiere diente der Rippenmolch *Pleurodeles waltl* aus einer institutseigenen Zucht.

#### 2.1.2 Zelllinien

➤ XIKE-A6 Kulturzellen

Diese Zelllinie stammt aus Nierenepithel-Gewebe von *Xenopus laevis* (*Xenopus laevis* kidney epithelium, line A6, American Type Culture Collection). XIKE Zellen wurden in Kulturmedium (900 ml DMEM = Dulbecco's Modification of Eagle's Medium; 150 ml H<sub>2</sub>O; 100 ml FCS) bei 27°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### 2.1.3 Primäre Antikörper

➤ Kaninchen-Seren gerichtet gegen *Xenopus* HMGN1 (XHMGN1)

Die Seren stammten aus einer Immunisierung mit dem *Xenopus*-HMGN1-Peptid PKRKQVNADVADAKD (Seqlab, Göttingen). Die Seren haben die Bezeichnung S 120 und S119.

➤ Kaninchen-Seren gerichtet gegen *Xenopus* HMGN2 (XHMGN2)

Die Seren stammten aus einer Immunisierung mit dem *Xenopus*-HMGN2-Peptid PKRKADGDSKAEKAK (Seqlab, Göttingen). Die Seren haben die Bezeichnung S388 und S386.

➤ Antikörper gegen XH1A (*Xenopus* H1A)

Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gerichtet gegen *Xenopus* H1A (Moorman and de Boer, 1985; Hock et al., 1993)

➤ Affinitätsgereinigter-Antikörper gerichtet gegen die konservierte nukleosomale Bindungsdomäne von HMGN Proteinen

Kaninchen-Serum gegen nukleosomale Bindungsdomäne von HMGN Protein (Hock et al., 1993)

➤ Kaninchen-Seren gerichtet gegen *Xenopus* Nukleoplasmin

Das Antiserum wurde freundlicherweise von Prof. Krohne (Biozentrum Würzburg) zur Verfügung gestellt (Kleinschmidt et al., 1985).

### 2.1.4 Sekundäre Antikörper

Für Immunfluoreszenz-Mikroskopie verwendete Sekundär-Antikörper wurden 1:150 in PBS verdünnt und von Dianova (Hamburg) bezogen.

Antikörper gegen	Kaninchen	gekoppelt mit	FITC Texas-Red
Antikörper gegen	Maus	gekoppelt mit	FITC Texas-Red

Für Immunblots verwendete Enzym-gekoppelte Antikörper:

- mit alkalischer Phosphatase gekoppeltes Schaf anti-Digoxigenin Fab-Fragment (Verdünnung: 1:5000; Roche).
- mit Peroxidase gekoppeltes Ziege anti-Kaninchen IgG (Verdünnung: 1:10000; Roche).

### 2.1.5 Bakterienstämme

#### ➤ **E.coli XL 1 Blue:**

Zum Vermehren von Plasmiden wurde routinemäßig der E.coli Stamm XL 1 Blue verwendet.

#### ➤ **TOP10 One Shot® :**

Dieser Bakterienstamm wurde zur Transformation des pCR2.1. Vektors verwendet. Diese kompetenten Zellen waren im TOPO-Kit der Firma Invitrogen enthalten (siehe auch 2.2.4).

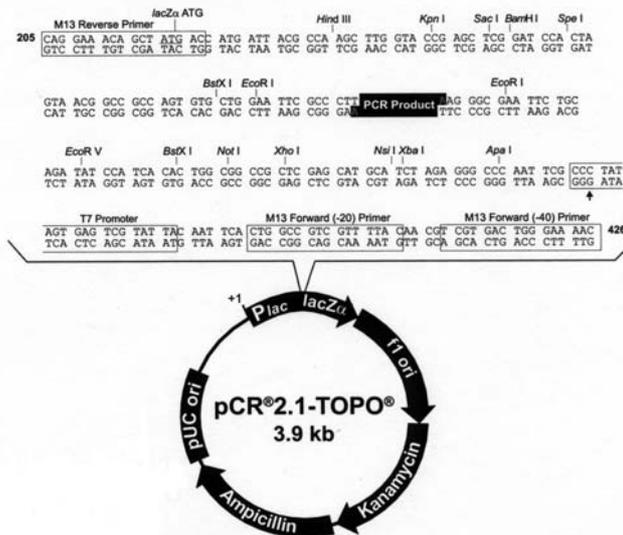
#### ➤ **E. coli BL-21:**

Bei dem hier verwendeten E.coli Stamm handelt es sich um E.coli BL-21 CodonPlus™ (DE3)-RIL der Firma Stratagene. Dieser Stamm zeichnet sich durch eine verminderte Protease Aktivität aus und besitzt außerdem zusätzliche Kopien seltener tRNA-Gene, um die Expression von Proteinen zu verbessern.

## 2.2 Molekularbiologisches Material

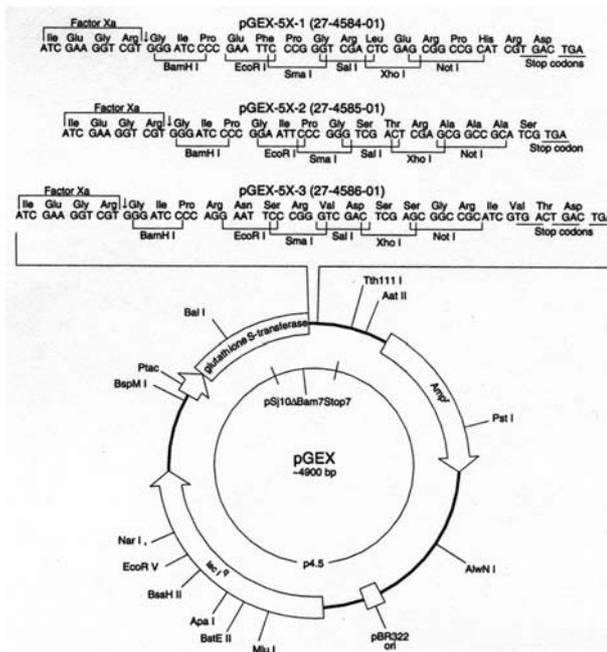
### 2.2.1 Plasmidvektoren

➤ **pCR®2.1-Topo®**



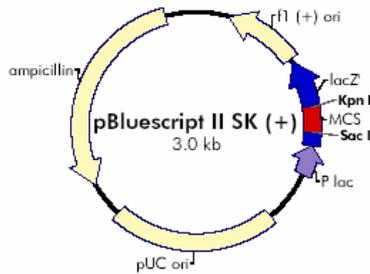
**Abb.7:** Dieser Vektor ist Teil eines Kits der Firma Stratagene und wurde für die direkte Klonierung von cDNA-Fragmenten, die durch RT-PCR gewonnen wurden, verwendet. Der Vektor ermöglicht eine Blau/Weiß-Selektion zum erleichterten Auffinden positiver Klone.

➤ **pGEX-5X-1**

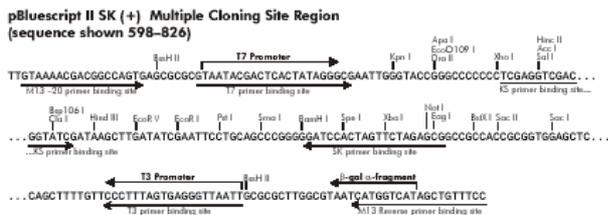


**Abb.8:** Dieser Vektor stammt von der Firma Amersham Pharmacia Biotech und ist Teil eines Expressionssystems. Er ermöglicht die Expression eines Fusionsproteins aus Glutathion-S-Transferase und dem erwünschten Protein, wobei der GST-Anteil am 5'-Ende eines Proteins angehängt wird. Der GST-Teil des Fusionsproteins ermöglicht (ähnlich wie ein His-Tag) die Aufreinigung über Glutathion-Sepharose, an welche eine spezifische Bindung des Fusionsproteins erfolgt. Nach der Aufreinigung des Fusionsproteins kann der GST-Teil enzymatisch abgespalten werden.

➤ **pBluescript 2 KS+**



**Abb.9:** Dieser Vektor stammt von der Firma Stratagene (Heidelberg). Gezeigt ist die Karte des Vektors pBluescript SK + mit der Sequenz der multiple cloning site, die von den Promotoren T3 und T7 flankiert wird.



**2.2.2 Enzyme**

➤ Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

➤ Taq-Polymerase

Taq-Polymerase wurde von der Firma Promega (Mannheim) bezogen; zusätzlich wurde eine institutseigene (AG Seibel), selbst hergestellte und funktionsgetestete Taq-Polymerase verwendet.

➤ Reverse Transkriptase MMULV

Für die Reverse Transkription wurde stets die MMULV-Reverse Transkriptase (50 U/µl) der Firma Promega (Mannheim) verwendet.

➤ Micrococcus Nuklease

Die Micrococcus Nuklease wurde von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

➤ Ribonuklease Inhibitor

Ribonuklease Inhibitor wurde von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

➤ T4 DNA Ligase

Die T4 DNA Ligase wurde von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

**2.2.3 Oligonukleotide**

Oligonukleotide für die spezifische Amplifikation von cDNA-Fragmenten wurden bei der Firma INTERACTIVA (Ulm) bestellt. Der für die Reverse Transkription verwendete

Oligo(dT) Primer wurde von der Firma Promega (Mannheim) bezogen. Die verwendeten Primer sind im Anhang detailliert aufgelistet.

Zusätzlich wurden für „knock-down“-Experimente Morpholino-Oligonukleotide von der Firma GeneTool (LLC, Philomath, Oregon, USA) bezogen.

- **XHMGN2-Morpholino-Oligo:** 5'-CCTTTCTCTTGGGCATTGTTGGCTG-3'
- **Morpholino-Standard-Control-Oligo:** 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'

### 2.2.4 Kits

- Plasmid Mini Präp ( Peqlab, Erlangen);
- QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden);
- TOPO<sup>®</sup> - und Original TA Cloning Kit (Invitrogen);
- ApoTag<sup>®</sup> In Situ Apoptosis Detection Kit ( Oncor Appligene, Heidelberg);
- BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, Weiterstadt);
- ECL Western blotting detection reagent ( Amersham, Braunschweig);

### 2.2.5 Proteine

Rekombinantes humanes HMGN1, HMGN2, HMGN1S20,24E und HMGN1s88c wurden von M. Bustin (NCI, NIH, Bethesda, USA) zur Verfügung gestellt. Bakterielle Expression und HPLC Aufreinigung sind unter Bustin (1999) und Prymakowska-Bosak (2001) beschrieben.

- **rekombinantes humanes HMGN2** (Herstellung wurde von Bustin (1991) beschrieben)
- **rekombinantes humanes HMGN1** (Herstellung wurde von Bustin (1991) beschrieben)
- **HMGN1S20,24E**; punktmutiertes Protein, bei dem zwei für die Chromatinbindung wichtige Serine durch Glutaminsäure ersetzt wurden (Herstellung wurde in Prymakovska Bosak et al. 2001 beschrieben)
- **HMGN1s88c**; HMGN1s88c wurde in einer Fluoreszenz-markierten Form als HMGN1s88c-5IAF verwendet und von R. Hock (Biozentrum Würzburg) zur Verfügung gestellt. Die Fluoreszenzmarkierung ist unter Hock et al. (1998b) beschrieben.

### 2.2.6 Chemikalien

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Chemikalien und Lösungsmittel in Analysequalität von folgenden Firmen bezogen:

- Merck (Darmstadt), Applichem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisendorf)

### 2.2.7 Geräte

Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank, CO <sub>2</sub> -Auto-Zero	Heraeus-Holding, Hanau
Drehtisch Reax 2	Heidolph, über Hartenstein, Würzburg
Drystar Geltrockner	H. Hölzel GmbH
Feinwaage Mettler AC 100	Mettler, Düsseldorf
Fluoreszenzmikroskop Axiophot Stereo HB050 mit Quecksilberlampe	Zeiss, Oberkochen
Gewebekulturschalen	Greiner Labortechnik
Heizblock	Liebisch, über Hartenstein, Würzburg
Heizplatte	Medax Nagel GmbH, Kiel
Homogenisator RW20	Janke & Kunkel, über Hartenstein, Würzburg
Kippschüttler WS5	Laborgerätebau Edmund Bühler, Tübingen
Kühlzentrifuge Minifuge T	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B	Du Pont Instruments, Bad Homburg
Laborwaage Mettler PJ 3600 DeltaRange®	Mettler, Düsseldorf
Magnetrührer M35	GLW, Würzburg
Mikroschmiede	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Mikromanipulator	Brinkmann Instrumentenbau, Mannheim
Proteingelkammer Mini Protean II	BIO-RAD, München
Blotkammer Mini Trans Blo	BIO-RAD, München
pH-Meter WTW pH521	über Hartenstein, Würzburg
Proteingelkammer Mini V8	Gibco BRL
Schlittenmikrotom	Leitz, Wetzlar
Sequenzierer	ABI PRISM <sup>TR</sup> 310 Genetic Analyser Perkin Elmer, Applied Biotems GmbH, Weiterstadt
Sonifier B12	Branson Sonic Power Company, über Gerhard Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Stabilisiertes Netzgerät 500 V 1 A	Dipl. Ing. L. Fischer, Heidelberg
Sterile Bank	Steril GARD Hood Class III Müller Labortechnik, Windhagen
The Denley Mixer A257, Multi Axle Rotator	über Hartenstein, Würzburg
Thermocycler TECHNE PROGENE	über Thermo-Dux, Wertheim
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
UV-Stratalinker	Stratagene Europe, Amsterdam, Holland
Vortex L24	GLW, Würzburg
Wasserbad WTH 500	über Hartenstein, Würzburg

## 3 Methoden

### 3.1 Mikrobiologische Methoden

#### 3.1.1 Flüssigkultur von Bakterien

Lösungen:

LB-Medium (Luria Bertami) 1 l: 10 g Bacto-Trypton (Gibco)

→ pH 7,4 (NaOH) 5 g Hefeextrakt (Gibco)

10 g NaCl

⇒ autoklavieren

Antibiotika-Stammlösungen: Ampicillin: 50 mg/ml in H<sub>2</sub>O bidest.

Kanamycin: 50 mg/ml in H<sub>2</sub>O bidest.

Tetrazyclin: 5 mg/ml in Ethanol (100 %, p.a.)

Durchführung:

Für eine Übernachtskultur wurden ca. 5-20 ml Medium in einem Greinerröhrchen vorgelegt. Zur Selektion wurde je nach verwendetem Bakterienstamm ein Antibiotikum zugesetzt. Ampicillin und Kanamycin wurden in Endkonzentrationen von 50 µg/ml eingesetzt, Tetracyclin wurde mit einer Konzentration von 15 µg/ml verwendet. Das Selektionsmedium wurde mit Bakterienmaterial aus einer Glycerinkultur oder eine Bakterienkolonie von einer Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C über Nacht geschüttelt. Für Flüssigkulturen größerer Volumina bzw. für Kulturen zur *in-vivo*-Expression von Proteinen wurde zunächst, wie beschrieben, eine Übernachtskultur angesetzt. Mit 5 ml dieser Übernachtskultur wurde dann am nächsten Tag 100-200 ml Medium angeimpft.

#### 3.1.2 Bestimmung der Bakteriendichte einer Flüssigkultur mit Hilfe der optischen Dichte (OD)

Um die Bakteriendichte in einer Flüssigkeit zu bestimmen, misst man die Extinktion bei einer Wellenlänge von 600 nm. Hierbei gilt, dass eine OD von 1, bei einer Schichtdicke von 1cm,  $8 \times 10^8$  Zellen/ml entspricht. Man benötigt dazu einen Nullwert, der mit LB-Medium eingestellt wurde.

#### 3.1.3 Glycerinkultur

Lösungen:

➤ Glycerin

Durchführung:

Zur Aufbewahrung von Bakterien über einen längeren Zeitraum wurden Glycerinkulturen angesetzt. Hierzu wurden 100-200 µl Glycerin mit 900 µl einer Übernachtskultur vermischt

und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Ausgehend von der Glycerinkultur konnte nun eine neue Übernachtskultur angeimpft werden, indem mit einer sterilen Pipettenspitze etwas Bakterienmaterial von der Glycerinkultur in die Übernachtskultur übertragen wurde (siehe 3.1.1).

### **3.1.4 Bakterienkultur auf Agarplatten**

Lösungen:

- 1,5 % Agar (Select Agar, Gibco) in LB-Medium (vgl. 3.1.1)
- Antibiotika-Stammlösungen (siehe 3.1.1)

Durchführung:

Für die Herstellung von Agarplatten wurde der Agar in LB-Medium eingewogen und autoklaviert. Nachdem sich die Lösung nach dem Autoklavieren auf etwa  $50^{\circ}\text{C}$  abgekühlt hatte, wurde das geeignete Antibiotikum aus einer Stammlösung in der jeweiligen Endkonzentration (siehe 3.1.1) zugegeben. Der flüssige Agar wurde anschließend in sterile Petrischalen gegossen, so dass der Boden einer Schale gerade bedeckt war. Nachdem der Agar fest geworden war, wurden die Schalen umgedreht, um ein Auftropfen von Kondenswasser auf den Nährboden zu verhindern. Die Selektionsplatten wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und konnten 3-4 Wochen ohne Verlust der Antibiotikawirkung bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

Um aus einer Flüssigkultur eine Plattenkultur herzustellen, wurden ca. 50-100  $\mu\text{l}$  der Kultur auf die Platte pipettiert und mit einem sterilen Drygalski-Spatel ausplattiert. Sterilisiert wurde der Drygalski-Spatel indem er mit 100 % Ethanol benetzt und am Bunsenbrenner abgeflammt wurde. Bakterien konnten auch mit Hilfe einer sterilen Impföse auf die Platte überführt und dort ausgestrichen werden.

### **3.1.5 Herstellen kompetenter Bakterien**

Kompetente Bakterien können unter geeigneten Bedingungen (siehe 3.1.6) plasmidförmige DNA aus ihrer Umgebung aufnehmen. Bakterien wurden durch Modifikation der Lipiddoppelschicht, die sie umgibt, chemisch kompetent gemacht.

Lösungen:

- LB-Medium (siehe 3.1.1)
- Tetrazyclin: 5  $\text{mg}/\text{ml}$  in Ethanol (100 %, p.a.)

TSS (Transformation and Storage Solution):

→ pH 6,5

LB-Medium

+ 10 % (w/v) PEG 3350 oder 8000

+ 5 % (v/v) DMSO

+ 20-50 mM  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\text{MgSO}_4$  oder  $\text{MgCl}_2$ )

→ sterilfiltrieren, Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$

### *Durchführung:*

Zunächst wurden 10 ml LB-Medium mit Endkonzentration  $15 \mu\text{g}/\text{ml}$  Tetrazyclin versehen. Die Flüssigkultur wurde mit einer Einzelkolonie oder aus einer Glycerinkultur des gewünschten Bakterienstammes angeimpft. Standardmäßig wurde der Bakterienstamm XL1-blue verwendet. Die Übernachtskultur wurde bei  $37^\circ\text{C}$  unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 100 ml LB-Medium mit einer Endkonzentration von  $15 \mu\text{g}/\text{ml}$  Tetrazyclin mit 1-5 ml der Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterien wurden nun bei  $37^\circ\text{C}$  unter Schütteln (ca. 2 Stunden) bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,3 - 0,4 vermehrt. Dann wurde die Flüssigkultur auf zwei 50 ml Röhren verteilt und bei 1000 g und  $4^\circ\text{C}$  10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in  $1/40$  des Ausgangsvolumens (2,5 ml) eiskaltem TSS aufgenommen und resuspendiert. Die Suspension wurde in Aliquots zu 100  $\mu\text{l}$  auf vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Bakterien wurden bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert und waren mehrere Wochen haltbar.

### **3.1.6 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien**

Die Aufnahme von Fremd-DNA in ein Bakterium wird als Transformation bezeichnet. Damit die Fremd-DNA bei der Transformation in eine Bakterienzelle nicht abgebaut wird, muss sie ringförmig vorliegen (Plasmid-DNA) und benötigt einen Replikationsstartpunkt, der von der Bakterienzelle erkannt werden kann. Zusätzlich trägt die Plasmid-DNA meistens eine Antibiotikaresistenz, um eine Selektion der erfolgreich transformierten Bakterien zu ermöglichen.

Zur Transformation benötigte man kompetente Zellen wie der E. coli Bakterienstamm XL1-Blue (siehe 3.1.5).

### Lösungen:

- LB-Medium (s. 3.1.1)

### Durchführung:

Ein Aliquot (100  $\mu\text{l}$ ) kompetenter Bakterien wurde langsam auf Eis aufgetaut. Die Bakterien wurden mit dem Ligationsansatz vermischt und 45-60 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde dann für 30 sek bei  $42^\circ\text{C}$  einem Hitzeschock ausgesetzt und sofort wieder auf Eis gestellt. Zu den Bakterien wurde 900  $\mu\text{l}$  LB-Medium zugegeben und 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  geschüttelt. Es wurden zwei Verdünnungen auf entsprechenden Selektionsplatten, je nach Antibiotika-Resistenz des transformierten Plasmids, ausplattiert. Zunächst wurden 100  $\mu\text{l}$  des 1 ml Transformationsansatzes entnommen und ausgestrichen, was einer  $1/10$  Verdünnung entspricht. Die restlichen Bakterien wurden bei 10000 rpm für 30 sek in einer Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 100  $\mu\text{l}$  abgenommen, in denen das Pellet

resuspendiert wurde. Anschließend wurde alles auf einer zweiten Platte ausgestrichen was einer  $9/10$  Verdünnung entspricht.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 RT-PCR

#### 3.2.1.1 Reverse Transkription

Die RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction) gliedert sich in zwei Abschnitte. Zunächst wird RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in DNA übersetzt. Da mRNA nur aus Exons besteht, unterscheidet sich die bei dieser Prozedur entstehende DNA von der im Genom des Organismus, aus dem die RNA isoliert wurde. Man nennt die entstandene DNA cDNA, wobei das c für „copy“ steht. Man nutzt diese Technik beispielsweise für die Klonierung unbekannter cDNA-Sequenzen, indem man zunächst die isolierte Gesamt-RNA in cDNA umschreibt und dann mit spezifischen Primern (die Sequenzen können z.B. aus dem entsprechenden Gen eines verwandten Organismus stammen) die gesuchte cDNA amplifiziert.

Pipettierschema für eine RT-Reaktion (20  $\mu$ l):

RNA (1  $\mu$ g) mit sterilem, bidest. Wasser auf 12  $\mu$ l auffüllen, 3 min bei 70°C im Thermocycler denaturieren und sofort auf Eis stellen, dann :

+	1 $\mu$ l	<b>RNase-Inhibitor</b> (MBI)	40U/ $\mu$ l
+	2 $\mu$ l	<b>RT-Puffer</b> (Promega)	10x
+	2 $\mu$ l	<b>MgCl<sub>2</sub></b> (Promega)	SL 25 mM
+	1 $\mu$ l	<b>dNTPs</b> (MBI)	Mix SL 100 mM je Nukleotid
+	1 $\mu$ l	<b>Oligo dT-Primer</b> (Promega)	500 $\mu$ g/ml
+	1 $\mu$ l	<b>Reverse Transkriptase</b> <b>MMULV</b> (Promega)	50 U/ $\mu$ l

Durch Auf- und Abpipettieren gut mischen und im Thermocycler mit folgendem Segment, 1 h 37°C, 5 min 95°C und Kühlung bei 4°C, inkubieren.

Aus einem RT-Ansatz wurden 1 oder 2  $\mu$ l in eine sich anschließende PCR eingesetzt. Der RT-Ansatz konnte mehrere Tage bei 4°C gelagert werden, um für weitere PCRs verwendet zu werden.

### 3.2.1.2 PCR (polymerase chain reaction)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine Technik, mit der man selektiv DNA-Sequenzen vervielfältigen kann. Sie basiert auf der Tatsache, dass ein DNA-Doppelstrang bei Erhitzung denaturiert, sich also in zwei Einzelstränge zerlegt. Mit Hilfe einer hitzebeständigen DNA-Polymerase können die Einzelstränge in Anwesenheit von Primern und den vier Nukleotidtriphosphaten repliziert werden. Als Primer werden DNA-Oligomere zugegeben, die die Zielsequenz flankieren. Man benötigt also zumindest Kenntnis über Teile der Sequenz, oder aber ähnliche Sequenzen, aus der sich die erforderlichen Primer ableiten lassen.

#### Primer und Primerdesign:

Der Erfolg einer PCR hängt sehr stark von den verwendeten Primern ab, die bestimmte Eigenschaften besitzen sollten. Sie sollten nicht mit sich selbst oder dem anderen Primer hybridisieren können, sie sollten keine Schleifen bilden können und wenn möglich sollte ihre komplementäre Sequenz nur einmal auf der eingesetzten DNA vorkommen. Außerdem sollten die Schmelztemperaturen der beiden verwendeten Primer etwa gleich hoch sein und der G/C-Gehalt ihrer Sequenzen zwischen 40 und 60 % liegen. Die Schmelztemperatur gibt an bei wie viel Grad Celsius die Hälfte dieser komplementären Sequenzen in der Lösung als Doppelstrang vorliegen. Diese Temperatur kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$T_m = 2^\circ\text{C} \cdot (A + T) + (G + C)$$

Die PCR-Reaktion ist umso spezifischer, je näher die Annealing-Temperatur bei der Schmelztemperatur der beiden Primer liegt. Die Annealing-Temperatur wurde anfangs meist ca. 5°C unter  $T_m$  gewählt und bei Misserfolg dann nach oben (unspezifische Amplifikation, erkennbar als „Schmier“ bei der Gelelektrophorese) oder unten (kein Amplifikationsprodukt) variiert. Die Primer wurden mit dem Programm „OLIGO“ bzw. „Fast PCR. Microsoft Visual Studio 6.0 SP5, 2002“ am Computer entworfen und von INTERACTIVA (Ulm) bezogen.

#### Durchführung der PCR

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Taq-Polymerase herangezogen, die entweder von der AG Seibel im Lehrstuhl selbst hergestellt wurde bzw. von der Firma Promega (Mannheim) bezogen wurde. Die Taq-Polymerase hat die Eigenschaft, dass sie einen Überhang aus A-Nukleotiden am 3'-Ende des Produkts anfügt. Diese Polymerase besitzen keine 3'→5'-Exonukleaseaktivität (Fehlerkorrektur). Die Taq-Polymerase kann während der Elongationsphase ca. 1000 Nukleotide/min verarbeiten

Sollten die DNA-Fragmente mit sehr hoher Genauigkeit amplifiziert werden, wie z.B. für eine Klonierung wurde die Pfu-Polymerase (Promega) herangezogen. Diese Polymerase hängt keine überhängenden A-Nukleotiden am 3'-Ende des Produkts an, besitzt aber 3'→5'-

## Material und Methoden

Exonukleaseaktivität und eine „Proof-reading“ Aktivität. Die Pfu-Polymerase kann während der Elongationsphase lediglich 500 Nukleotide/min verarbeiten. Dieser Wert ist bei der Bestimmung der Elongationszeit einer PCR zu berücksichtigen.

Pipettierschema für Taq-Polymerase (50 µl-PCR-Ansatz):

- 20-100 ng DNA
- 3 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- 5 µl Taq-DNA-Polymerase 10x Reaction Buffer
- 1 µl dNTPs (Mix, SL je Nukleotid 10 mM, MBI)
- 0,5 µl 5'-Primer (SL 100 pmol/µl, Interactiva)
- 0,5 µl 3'-Primer (SL 100 pmol/µl, Interactiva)
- 1 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl, Promega)
- auf 50 µl mit H<sub>2</sub>O bidest. auffüllen

Pipettierschema für Pfu-Polymerase (50 µl-PCR-Ansatz):

- 20-100 ng DNA
- 1 µl Pfu-DNA-Polymerase 10x Reaction Buffer mit MgSO<sub>4</sub> (Promega)
- 1 µl dNTPs (Mix, SL je Nukleotid 10 mM, MBI)
- 1 µl 5'-Primer (SL 100 pmol/µl, Interactiva)
- 1 µl 3'-Primer (SL 100 pmol/µl, Interactiva)
- 1 µl Pfu-DNA-Polymerase (2-3 U/µl, Promega)
- auf 50 µl mit H<sub>2</sub>O bidest. auffüllen

Der Ansatz wurde in ein 0,5 ml-PCR-Reaktionsgefäß auf Eis pipettiert, wobei die Polymerase zum Schluss zugegeben wurde. Das Ganze wurde gut vermischt und im Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert:

Initiale Denaturierung 2 min 96°C

Denaturierung	1 min 96°C	} 20-30 Zyklen
Primer-Annealing	1 min (Temperatur je nach Primer)	
Elongation	1 min pro 1000 Basen + 30 sek (Taq), 72°C	
	1 min pro 500 Basen + 30 sek (Pfu), 72°C	

finale Elongation 10 min, 72°C

Kühlung 4°C

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte im 1%igen Agarosegel (siehe 3.2.5).



- 25 mM Tris/HCl, pH 8,0  
+ 1 Spatelspitze RNase A  
⇒ Lagerung 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 H<sub>2</sub>O bidest.
- 100 % Ethanol (p.a., auf Eis vorkühlen)

### *Durchführung:*

Zunächst wurde das Plasmid in den Bakterien vermehrt. Dazu wurde vom betreffenden Klon eine 10 ml-Übernachtskultur in LB<sub>Amp</sub>-Medium hergestellt. Am nächsten Morgen wurden 1,5 ml dieser Übernachtskultur in ein frisches Eppendorf-Cap überführt und 30 sek bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl GTE-Puffer durch Vortexen resuspendiert. Danach wurden 200 µl Lösung 2 zugegeben und durch mehrmaliges Invertieren des Caps gemischt. Zum Schluss wurden 150 µl Lösung 3 zugegeben und der Ansatz kurz kräftig geschüttelt. Nach einer 30sekündigen Zentrifugation bei 13000 rpm zum Pelletieren der Zelltrümmer wurden 400 µl des Überstandes in ein frisches Gefäß überführt und 400 µl eiskaltes Ethanol (100 %, p.a.) zugegeben. Beim Abnehmen des Überstandes war darauf zu achten, dass kein ausgefallenes SDS mit verschleppt wurde, weil dies nachfolgende Reaktionen stören könnte. Für eine höhere Reinheit der Präparation wurde der gesamte Überstand in ein frisches Cap überführt und dann 400 µl des Überstandes nach einer weiteren 5minütigen Zentrifugation abgenommen, in ein frisches Cap gegeben und mit Ethanol versetzt. Der Ansatz wurde kurz gemischt und dann sofort 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand sorgfältig abgenommen und das Pellet 5-10 min luftgetrocknet. Zum Schluss wurde das Pellet in 30 µl H<sub>2</sub>O bidest. aufgenommen. Von der GTE-Plasmid-Präparation wurden 8 µl in einem Restriktionsverdau (siehe 3.2.4) eingesetzt (maximal mögliches Volumen).

### **3.2.3.2 PEQLAB Plasmid Mini-Präp**

Diese Methode ist eine Kombination aus alkalischer Lyse und Adsorption der DNA an ein Silika-Gel unter Hochsalz-Bedingungen. Die DNA wird dabei nicht gefällt, sondern an das Gel gebunden und anschließend mit einem Niedrigsalz-Puffer (z. B. H<sub>2</sub>O bidest.) bei pH 7,0-8,5 eluiert. Die durch diese Methode gewonnene Plasmid-DNA besitzt eine sehr hohe Reinheit und ist somit auch für empfindlichere Reaktionen wie Sequenzierungen einsetzbar.

Durchgeführt wurde die PEQLAB Plasmid Mini-Präp nach Herstellerprotokoll, ausgehend von einer 6-10 ml-Übernachtskultur. Eluiert wurde mit 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ , was normalerweise zu Konzentrationen zwischen 250 und 400  $\text{ng}/\mu\text{l}$  führte.

### 3.2.4 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Oft müssen Plasmide zerschnitten werden, um z.B. festzustellen, ob das erwünschte Insert tatsächlich mit dem Vektor ligiert hat. Auch die Orientierung eines Inserts kann häufig durch einen Restriktionsverdau festgestellt werden.

Restriktionsenzyme schneiden DNA an definierten Sequenzen. Man unterscheidet Restriktionsenzyme vom Typ I, II und III. In der Molekularbiologie werden meistens Vertreter des Typs II, sogenannte Nukleasen und dort speziell die Endonukleasen verwendet, da sie innerhalb eines DNA-Stranges schneiden können. Abhängig vom Enzym entstehen dabei glatte (blunt) oder kohäsive (sticky) Enden. Die überhängenden Enden können sich wieder mit komplementären Sequenzen, die vom selben Enzym geschnitten wurden, zusammenlagern, was bei der Rekombination zweier verschiedener DNA-Moleküle ausgenutzt werden kann.

*Standard-Ansatz (Gesamtvolumen 20  $\mu\text{l}$ ):*

1  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA (bzw. 17  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA aus GTE-Präp)

2  $\mu\text{l}$  10x Restriktions-Puffer (MBI, entsprechend zum Enzym)

1  $\mu\text{l}$  Restriktionsenzym (MBI)

$\text{H}_2\text{O}$  bidest. bis zu einem Volumen von 20  $\mu\text{l}$

Der Ansatz wurde gemischt, 1 h bei 37°C inkubiert und dann in einem 1 %igen Agarose-Gel analysiert. Dazu wurden 10  $\mu\text{l}$  des Verdau mit 2  $\mu\text{l}$  6x Beladungspuffer vermischt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 30 min bei 100 V (konstant).

### 3.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (DNA und RNA)

Die Konzentration der gewonnenen DNA und RNA wurde photometrisch (Biophotometer, Eppendorf) über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen (Nukleinsäuren besitzen dort ihr Absorptionsmaximum). Gemessen wurde eine 1:20-Verdünnung gegen einen entsprechenden Leerwert. Dabei gilt, dass eine  $\text{OD}_{260}$  von 1 etwa 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DNA bzw. 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNA entspricht. Aus den Quotienten  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  und  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$  konnten Aussagen über die Reinheit der Probe getroffen werden. Die Absorption bei 280 nm spiegelt die Verunreinigungen durch Proteine wider, während Peptide, aromatische Verbindungen und Kohlenhydrate bei 230 nm ihr Absorptionsmaximum haben. In Tabelle 3.1 ist zusammengefasst, wie von der OD auf die Konzentration geschlossen werden kann und wie die Quotienten  $^{260}/_{280}$  und  $^{260}/_{230}$  bei reinen Proben aussehen sollten.

**Tabelle 3.1:** Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

	OD <sub>260</sub> = 1 entspricht	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub> ≥	OD <sub>260</sub> /OD <sub>230</sub> ≥
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

### 3.2.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Auftrennung der DNA macht man sich das negativ geladene Phosphoribose-Rückrad zu nutzen. Wird ein elektrisches Feld angelegt bewegen sich die DNA-Moleküle in wässriger Lösung zur positiv geladenen Anode. Lässt man diese Bewegung in einem molekularen Netzwerk ablaufen, wie in einem Agarosegel, so werden die einzelnen DNA-Moleküle je nach Größe und Form aufgetrennt, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit mit der Größe abnimmt. Aber auch die Konformation der DNA beeinflusst die Wanderungsgeschwindigkeit. Ringförmige kovalent geschlossene DNA läuft schneller, je größer ihre Verwindungszahl ist, egal ob die DNA negativ oder positiv superspiralisiert vorliegt. Linearisierte DNA wandert etwas schneller als das entspannte, geschlossene Plasmid.

Die Trennschärfe hängt von der Gesamtlauflänge und der Agarosekonzentration im Gel ab. Die Konzentration sollte dem Größenbereich der erwarteten Fragmente angepasst werden.

Um die DNA-Banden im Agarosegel sichtbar zu machen gibt man Ethidiumbromid zu. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert zwischen den Basen der DNA und erzeugt bei Anregung mit UV-Licht eine orange Fluoreszenz.

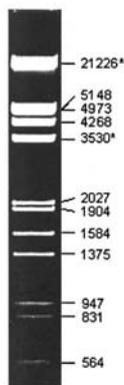
**Tabelle 3.2:** Abhängigkeit zwischen Agarosekonzentration und Trennbereich

% Agarose	optimaler Trennbereich
0,3	5-60 kb
0,6	1-20 kb
0,7	0,8-10 kb
0,9	0,5-7 kb
1,2	0,4-6 kb
1,5	0,2-3 kb
2,0	0,1-2 kb

### Lösungen:

- 10x TBE (pH 8,2):
  - 890 mM Tris/HCl
  - 890 mM Borsäure
  - 20 mM EDTA
- 10x DNA-Probenpuffer:
  - 10x TBE
  - + 50 % (v/v) Glycerin
  - + 0,4 % (w/v) Bromphenolblau
  - + 0,4 % (w/v) Xylencyanol
- Laufpuffer (1x TBE)
- Ethidiumbromid-Stammlösung (50 mg/ml)

### Durchführung:



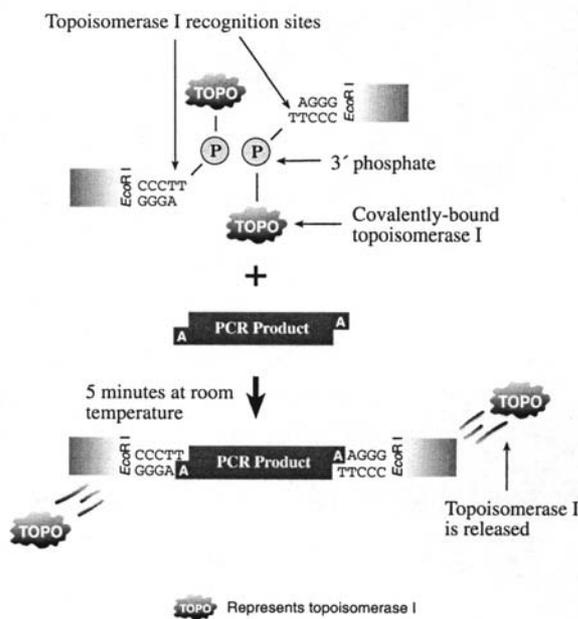
**Abb.10:** DNA-Marker III (MBI) im 1%igen Agarosegel. Größenangaben in bp.

Für ein 1%iges Gel wurden 0,4 g Agarose (low EEO, Applichem oder pEQLab) in 40 ml 1x TBE gelöst und aufgeköcht. Nachdem die Lösung auf etwa 50°C abgekühlt war, wurde 1µl der Ethidiumbromid-Stammlösung zugegeben. Die Lösung wurde gut gemischt und in einen Gelschlitten gegossen. Der Gelschlitten wurde vorher mit Tesafilm abgedichtet, und es wurde ein Kamm, zum Auftragen der Proben, eingesteckt. Nach ca. 30 min war das Gel komplett polymerisiert und konnte verwendet werden. Sollte die Polymerisation schneller erfolgen konnte das Gel auch bei 4°C gegossen werden. Das Gel wurde, nach

Entfernen des Tesafilms, mit dem Gelschlitten in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt und mit Laufpuffer überschichtet. Dann wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen und eventuell vorhandene Luftblasen aus den Taschen entfernt. Anschließend wurden die zu analysierenden Proben mit  $\frac{1}{10}$  Volumen 10x Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Um die Größen der aufgetrennten DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde in einer Spur ein Gemisch aus Fragmenten definierter Größe als Marker mit aufgetragen. Es wurde immer der Marker III (MBI) verwendet, mit EcoRI und HindIII verdaute  $\lambda$ -DNA (siehe Abb. 9), von dem 1 µg aufgetragen wurde. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100-130V durchgeführt, und wurde beendet, wenn das Bromphenolblau aus dem Probenpuffer etwa  $\frac{2}{3}$  des Gels durchlaufen hatte. Die durch das Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden wurden mit einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und über eine Videokamera mit angeschlossenem Drucker oder mit einer Polaroid-Kamera dokumentiert.

### 3.2.7 Klonierung von PCR-Fragmenten in den pCR®2.1-Vektor

#### 3.2.7.1 Klonierung mit dem TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen)



**Abb.11:** Prinzip des TOPO TA Cloning® Kits der Firma Invitrogen (Karlsruhe).

Die Klonierungsmethode des *TOPO TA Cloning® Kits* (Invitrogen) macht sich die Tatsache zu Nutze, dass Taq- und Tfl-Polymerasen durch ihre terminale Transferase-Aktivität einen 3'-Überhang aus Deoxyadenosinen an das PCR-Produkt anfügen. Der Vektor liegt in linearisiertem Zustand vor und besitzt einen 3'-Überhang aus Thymidinen. Außerdem ist das Enzym Topoisomerase I kovalent an die offenen 3'-Enden des Vektors gebunden. Durch die Ligationsaktivität der Topoisomerase I wird ein PCR-Produkt mit 3'-A-Überhang schnell in den Vektor integriert, wobei das Enzym dissoziiert. Das Prinzip ist in

Abbildung 11 verdeutlicht. Diese Methode erlaubt auch eine Vorauswahl möglicher positiver Klone über Blau/Weiß-Selektion, wobei die positiven, also die Klone mit integriertem PCR-Produkt, weiß bleiben, während die Klone ohne Insert blau werden. Ohne Insert wird das *lacZ*-Gen exprimiert und X-Gal als Substrat der  $\beta$ -Galaktosidase gespalten, wobei ein blauer Farbstoff entsteht. Das PCR-Produkt inseriert zwischen Promotor und *lacZ*-Gen, so dass keine Expression dieses Gens mehr möglich ist. Nach der Ligation wurde der Ansatz in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 bzw. TOP10F' (Invitrogen) transformiert. Die Transformation wurde dann in zwei Verdünnungen auf LB<sub>Amp</sub>-Platten (mit X-Gal für Blau/Weiß-Selektion) ausgestrichen.

#### Kurzprotokoll:

- Ansatz (6  $\mu$ l):
 

PCR-Produkt	0,5-4 $\mu$ l
Salt Solution (Invitrogen)	1 $\mu$ l
Steriles H <sub>2</sub> O bidest.	bis zu einem Volumen von 5
TOPO®-Vektor (Invitrogen)	0,5-1 $\mu$ l
- Ansatz mischen und 5 min bei RT (22-23 °C) inkubieren
- Ansatz zu einem Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* TOP10 oder TOP10F' geben und vorsichtig vermischen.

- 5-30 min auf Eis inkubieren.
- 30 sek Hitzeschock bei 42 °C, danach sofort auf Eis.
- Zugabe von 250 µl SOC-Medium (Invitrogen, sollte Raumtemperatur haben) und 1 h schütteln bei 37°C.
- Ausplattieren auf LB<sub>Amp</sub>-Platten in 2 Verdünnungen (40 µl, 260 µl) mit 40 µl X-Gal (SL 40 mg/ml in DMF, Applichem; ca. 1 h vor Verwendung ausstreichen und einziehen lassen) für Blau/Weiß-Selektion (bei TOP10F'-Zellen müssen zusätzlich 40 µl IPTG (SL 100 mM in H<sub>2</sub>O bidest., Applichem) ausplattiert werden).
- Inkubation über Nacht bei 37 °C.

### 3.2.7.2 Klonierung mit dem Original TA Cloning® Kit (Invitrogen)

Auch diese Methode nutzt die 3'-überhängenden Deoxyadenosine von Taq- oder Tfl-amplifizierten PCR-Produkten für die Ligation in einen lineaisierten Vektor, der 3'-überhängende Thymidine besitzt. Die Ligation wird in diesem System allerdings von einer T4 DNA-Ligase übernommen. Auch hier ist eine Blau/Weiß-Selektion auf mögliche positive Klone möglich. Der einzige Unterschied zwischen den Vektoren der beiden Systeme ist die kovalent an den pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>-Vektor gebundene Topoisomerase I.

Die für die Ligation benötigte Menge an PCR-Produkt konnte über folgende Gleichung näherungsweise ermittelt werden. Eingesetzt wurde allerdings meistens das maximal mögliche Volumen aus einer Gelextraktion (siehe 3.2.9).

$$X \text{ ng PCR - Produkt} = \frac{(Y \text{ bp PCR - Produkt}) \cdot (50 \text{ ng Vektor})}{3900 (Z \text{ bp Vektor})}$$

#### Kurzprotokoll:

➤ Ansatz (10 µl):	PCR-Produkt	X µl (6 µl)
	10x Ligationspuffer (Invitrogen)	1 µl
	pCR <sup>®</sup> 2.1-Vektor (25 ng/µl) (Invitrogen)	2 µl
	Steriles H <sub>2</sub> O bidest.	bis zu einem Volumen von 9µl
	T4 DNA-Ligase (4 Weiss-Units, Invitrogen)	1 µl

- Ansatz mischen und 4 h (oder über Nacht) bei 14 °C inkubieren.
- Transformation analog zur TOPO TA Klonierung.

### 3.2.8 Klonierung von DNA-Fragmenten in bakterielle Vektoren

Über PCR gewonnene DNA-Fragmente wurden immer in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen) inkloniert, da diese Methode eine enorme Effizienz aufweist. Dieser Vektor ist aber für manche Anwendungen wie z. B. die *in-vivo*-Expression eines Proteins ungeeignet. In solchen Fällen musste die entsprechende DNA-Sequenz aus dem pCR2.1-Vektor ausgeschnitten und in einen speziellen Expressionsvektor ligiert werden.

#### 3.2.8.1 Gewinnung des Inserts

Das DNA-Fragment wurde aus dem pCR2.1-Vektor über Restriktionsverdau (siehe 3.2.4) ausgeschnitten und über ein 1%iges Agarosegel elektrophoretisch (siehe 3.2.6) aufgetrennt. Die Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht, mit einer sauberen Skalpellklinge ausgeschnitten und anschließend mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen aus dem Gel eluiert (siehe 3.2.9). Die eluierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt oder, für eine längere Lagerung, bei -20 °C aufbewahrt.

#### 3.2.8.2 Dephosphorylierung des Vektors

Die Dephosphorylierung wurde durchgeführt, um die Autoligationsrate des Vektors zu vermindern, da die Ligase phosphorylierte Enden für eine Ligation benötigt.

Der Vektor wurde zunächst linearisiert, das Restriktionsenzym 10 min bei 85 °C hitzeinaktiviert und dann der Ansatz mit Na-Acetat und Ethanol gefällt. Das Pellet wurde so in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> resuspendiert, dass in 1 µl etwa 100 ng DNA enthalten waren.

*Pipettierschema eines Standardansatzes (5 µl):*

- 100-150 ng linearisierter Vektor
- 0,5 µl 10x SAP-Puffer (Roche)
- bis zu einem Volumen von 4 µl mit H<sub>2</sub>O bidest. auffüllen
- 1 µl Shrimp alkalische Phosphatase (1 U<sub>µl</sub>, Roche)

Der Ansatz wurde gemischt und 1-2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym 15 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. Der Ansatz wurde bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt, was mehrere Wochen möglich war.

#### 3.2.8.3 Ligation und Transformation

*Pipettierschema für einen Standard-Ligationsansatz (20 µl):*

- 1 Dephosphorylierungsansatz (5 µl, 100-150 ng Vektor).
- 300 ng Insert (ca. 3fache Menge im Vergleich zum Vektor)
- 1,5 µl 10x T4 DNA-Ligase-Puffer (MBI)

- H<sub>2</sub>O bidest. bis zu einem Volumen von 19 µl
- 1 µl T4 DNA-Ligase (5 U/µl, MBI)

Der Ansatz wurde vermischt und 30-60 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ligationsansatz für eine Transformation in E. coli-Bakterien vom Stamm XL1-blue eingesetzt.

*Kurzprotokoll einer Transformation:*

- Ligationsansatz mit einem Aliquot (100 µl) kompetenter Bakterien mischen und Inkubation auf Eis für 45-60 min.
- Hitzeschock für 30 sek bei 42 °C, dann wieder auf Eis.
- Zugabe von 900 µl LB-Medium und 1 h Schütteln bei 37 °C.
- Ausplattieren auf Selektionsplatten.

### **3.2.8.4 Test der erhaltenen Klone**

Die Klone wurden über Restriktionsverdau (siehe 3.2.4) auf eine erfolgreiche Ligation hin überprüft. Außerdem wurde getestet, in welcher Orientierung das einklonierte DNA-Fragment in den Vektor inseriert hatte, was entweder ebenfalls über Restriktionsverdau oder über Sequenzierung (siehe 3.2.11) überprüft wurde.

### **3.2.9 Gelextraktion von DNA-Fragmenten (Qiagen)**

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen durchgeführt. Die gewünschten Banden wurden mit einer Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend die DNA aus dem Gel extrahiert. Vorgegangen wurde dabei nach Herstellerprotokoll, die finale Elution der DNA wurde je nach Verwendung mit 30-40 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> durchgeführt.

Es wurden Agarosen (low EEO) der Firmen Applichem oder PEQlab verwendet, die eine niedrige Bindungsaffinität zu Nukleinsäuren besitzen. Dadurch wurde die Elution der DNA erleichtert und Ausbeuten erhöht. Die eluierte DNA stand sofort ohne weitere Bearbeitungsschritte für Folgeversuche zur Verfügung.

### **3.2.10 Fällung von Nukleinsäuren**

Für viele Zwecke ist es notwendig, Nukleinsäuren zu fällen. Die am häufigsten verwendeten Präzipitationsmittel sind Ethanol und Isopropanol.

*Durchführung:*

Für eine Fällung wurde die DNA-Lösung zunächst mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt. Dann wurden 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,9 und 2,5 Volumen 100 % Ethanol p.a. zugegeben und gut vermischt. Dieser Ansatz wurde anschließend 15 min bei 13000 rpm in einer Sigma Tischzentrifuge zentrifugiert. Dabei wurde die DNA pelletiert. Der

Überstand wurde verworfen und das Pellet 2 x mit 75 % Ethanol p.a. sorgfältig gewaschen, um die kopräzipitierten Salze zu entfernen. Die 75 %ige Ethanollösung wurde auf das DNA-Pellet pipettiert und 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach dem zweiten Waschschrift wurde der Überstand wiederum verworfen und die gefällte DNA luftgetrocknet (ca. 10 min). Anschließend konnte das Pellet in der gewünschten Menge  $H_2O_{\text{bidest.}}$  oder entsprechendem Puffer aufgenommen werden.

### **3.2.11 DNA-Sequenzierung**

Sequenzierungen wurden nach der von Sanger et al. (1977) entwickelten Kettenabbruch-Methode durchgeführt. Die Methode beruht darauf, dass bei einer PCR Didesoxynukleosid-Triphosphate (ddNTPs) in stöcheometrischer Menge beigefügt werden. Wird bei der DNA-Polymerisation durch die Polymerase ein solches Nukleotid eingebaut, kommt es zum Abbruch der Polymerisation, da die DNA-Polymerase wegen der fehlenden 3'-OH-Gruppe an der Ribose des Nukleotids kein weiteres anfügen kann. Auf diese Weise erhält man DNA-Fragmente verschiedenster Längen, die alle an ihren Enden ein ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP oder ddGTP) tragen. Früher mussten 4 parallele Ansätze gefahren werden, jeweils einer für die 4 verschiedenen Nukleotide (A, T, C, G). Die Reaktionen wurden mit Radioisotopen durchgeführt, um die DNA-Fragmente zu markieren, die anschließend über spezielle Sequenziergele aufgetrennt wurden, mit denen dann ein Röntgenfilm belichtet wurde. Aus den Bandenmustern konnte dann die DNA-Sequenz abgelesen werden.

In einer verfeinerten Methode kommen fluoreszenzmarkierte ddNTPs zum Einsatz, wobei jedes Nukleotid mit einem anderen Farbstoff markiert ist (Adenin: R6G, grün; Thymin: ROX, rot; Cytosin: TAMRA, gelb; Guanin: R110, blau). In diesem System wird die zu sequenzierende DNA mit einem entsprechenden Primer und einem Premix (*ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*), der dNTPs, markierte ddNTPs, Taq-DNA-Polymerase,  $MgCl_2$  und den Puffer enthält, gemischt und in einer PCR amplifiziert. So entstehen DNA-Fragmente verschiedenster Längen, mit jeweils einem markierten Nukleotid an ihren Enden, wobei Fragmente gleicher Länge auch den gleichen Farbstoff als Markierung tragen. Diese Fragmente werden in einem Kapillar-Gelsystem der Größe nach aufgetrennt und mit einem Laser angeregt. Je nach Farbstoff wird ein Licht spezifischer Wellenlänge emittiert, das von einem Photoelement registriert und an einen Computer weitergeleitet wird. Der Computer setzt die einzelnen Messdaten über eine geeignete Software schließlich zu einer Sequenz zusammen.

*Durchführung:*

*Standardansatz einer Sequenzierreaktion (10  $\mu$ l):*

- 200-500 ng DNA
- 10 pmol oder 50 pmol Primer

- bis zu einem Volumen von 8 µl mit H<sub>2</sub>O bidest. auffüllen
- 2 µl Premix (BigDye™, PE Applied Biosystems)

Dieser Ansatz wurde gut vermischt und anschließend in einem Thermocycler bei folgendem Programm inkubiert:

- initiale Denaturierung 1 min 96°C
  - Denaturierung 30 sek 96°C
  - Primer-Annealing 15 sek (Temperatur je nach Primer)
  - Elongation 4 min 60°C
- } 25 Zyklen
- Kühlung 4°C

Die Annealing-Temperatur wurde je nach Primer gewählt, für Standard-Sequenzierprimer (T3, T7, M13 forward, M13 reverse) wurde sie auf 48°C eingestellt. In Tabelle 3.3 sind die verwendeten Sequenzierprimer mit den jeweiligen Annealing-Temperaturen aufgelistet.

**Tabelle 3.3:** Annealingtemperaturen der Sequenzierprimer

Primer	Annealing-Temperatur
T3	48°C
T7	48°C
M13 forward	48°C
M13 reverse	48°C
pGEX 5' Sequencing Primer	50-60°C
pGEX 3' Sequencing Primer	50-60°C
EGFP 5' Sequencing Primer	50°C
EGFP 3' Sequencing Primer	50°C

Nach der Reaktion wurde der Ansatz mit Na-Acetat und Ethanol gefällt, das Pellet 5-10 min luftgetrocknet und in 25 µl TSR (Template Supression Reagent, PE Applied Biosystems) aufgenommen. Nach einer Inkubation für 2 min bei 90°C wurde der Ansatz gemischt, dann kurz zentrifugiert und anschließend in ein Sequenzier-Reaktionsgefäß mit aufgesetztem Septum überführt.

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe von Internet-Datenbanken analysiert.

### 3.2.12 Präparation von RNA mit TRIfast

TRIfast-Reagent ( Peqlab, Erlangen) ist eine monophasische Lösung, bestehend aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, das effektiv Proteine denaturiert und RNase inhibitiert (Cox, 1968; Nozaki und Tanford, 1970). Bei der von Chomczynski und Sacchi (1987) entwickelten Methode zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe finden Zell-Lyse und RNA-Extraktion in einem Schritt statt. Nach Angaben des Herstellers sollen zur Isolierung von Gesamt-RNA

pro ml Reagens 50 bis 100 mg Gewebe eingesetzt werden. Die Gewebeproben wurden zusammen mit dem entsprechenden Volumen TRIfast homogenisiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurden pro ml TRIfast 0,2 ml Chloroform hinzugegeben und 15 sec gemischt (Vortex). Nach einer weiteren Inkubation von 3 min bei RT wurde bei 12000g und 4°C 15 min zentrifugiert. Dabei trennt sich eine obere farblose wässrige Phase von einer Interphase und einer unteren roten Phenol-Chloroform-Phase. RNA befindet sich in der wässrigen Phase, die nach einer Überführung in ein neues 15-ml-Corex-Röhrchen mit 1 ml Isopropanol pro ml TRIfast versetzt und gemischt wurde. Während einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur fällt der Großteil der RNA aus. Die RNA wurde durch Zentrifugation (12000g, 4°C, 10 min) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Mehrmaliges Waschen des Pellets mit 250 µl 70% Ethanol und anschließendes Zentrifugieren (7500g, 4°C, 5 min) befreit den Niederschlag von Phenolresten, Isopropanol und Salz. Die restliche Flüssigkeit ließ man bei Raumtemperatur verdampfen bis das Pellet fast durchsichtig war. Das Pellet wurde dann in sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendieren. Wenn nötig kann man zum besserem Lösen der RNA die Probe 10 min bei 65°C inkubieren. Aufbewahrt wurde die RNA bei -70°C.

### 3.2.13 RNA-Gelelektrophorese

Das Prinzip der Auftrennung der RNA-Fragmente durch Gelelektrophorese ist dasselbe wie bei DNA (siehe 3.2.6), die Moleküle werden über eine Agarose-Matrix der Größe nach aufgetrennt. Ein RNA-Gel wird mit einem anderen Puffersystem hergestellt und enthält zusätzlich Formaldehyd, um die RNA in denaturierter Form zu stabilisieren.

Lösungen:

- 10x RNA-Laufpuffer (pH 7,0): 0,2 M MOPS  
80 mM Natriumacetat  
10 mM EDTA
- Probenpuffer:

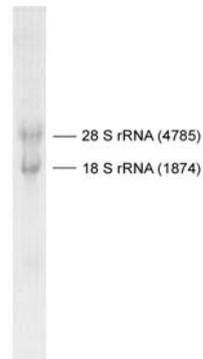
<u>20 µl:</u>		<u>500 µl:</u>
10 µl	Formamid	250 µl
3,5 µl	Formaldehyd (37 %)	87,5 µl
1 µl	10x RNA-Laufpuffer	25 µl
5,5 µl	DEPC-H <sub>2</sub> O (oder RNA-Lösung)	137,5 µl
- RNA-Beladungspuffer (pH 8,0): 1 mM EDTA  
50 % Glycerin  
0,25 % (w/v) Bromphenolblau  
0,25 % (w/v) Xylencyanol FF  
40 µg/ml Ethidiumbromid

*Durchführung:*

Für ein 1%iges RNA-Gel wurden 0,4 g Agarose (Appllichem) in 30 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und 4 ml 10x RNA-Laufpuffer gelöst und aufgeköcht. Nachdem die Lösung auf ca. 50 °C abgekühlt war, wurden noch 6,8 ml 37%ige Formaldehydlösung zugegeben, das Ganze gründlich vermischt

und in einen mit Tesafilm abgedichteten Gelschlitten mit eingestecktem Kamm gegossen. Nach etwa 30 min war das Gel ausgehärtet und konnte verwendet werden.

RNA-Gele wurden ausschließlich für anschließende Northern Blots (siehe 3.2.15) oder zur Überprüfung einer Sondenreaktion gefahren. Um die Größe der Fragmente abschätzen zu können, wurden die ribosomalen RNAs (18 und 28 S, siehe Abb. 12) herangezogen.



**Abb.12:** Gesamt-RNA im 1%igen Agarosegel

Wurde Poly(A<sup>+</sup>)-RNA oder eine Sonde über ein Gel analysiert, diente zusätzlich aufgetragene Gesamt-RNA aus Geweben oder Zellen als „Marker“. Beladen wurde das Gel pro Spur mit 15 µg Gesamt-RNA oder 5 µg Poly(A<sup>+</sup>)-RNA. Eine Sonde wurde in 2 Verdünnungen getestet, eine Spur wurde mit 1 µl, eine zweite mit 5 µl Sondenlösung beladen. Die aufzutragende RNA wurde in einer entsprechenden Menge RNA-Probenpuffer aufgenommen, der Ansatz 5 min bei 70 °C inkubiert, um die RNA zu denaturieren, dann auf Eis gestellt und mit  $\frac{1}{10}$  Volumen Beladungspuffer vermischt.

Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben vorsichtig in die Taschen eines mit Laufpuffer überschichteten Gels pipettiert.

Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 100 V und wurde beendet, wenn das Bromphenolblau aus dem Beladungspuffer knapp  $\frac{2}{3}$  des Gels durchlaufen hatte. Die durch das Ethidiumbromid im Beladungspuffer angefärbten RNA-Banden wurden durch UV-Licht sichtbar gemacht und über eine Videokamera mit angeschlossenem Videoprinter oder einer Polaroid-Kamera dokumentiert.

### 3.2.14 In-vitro-Transkription/Markierung von RNA-Sonden mit Digoxigenin

Durch die Verwendung geeigneter Promotor/RNA-Polymerase-Systeme der Vektoren ist es möglich, *in-vitro* gezielte RNA-Transkripte klonierter DNA-Sequenzen herzustellen. Die hier eingesetzten Vektoren pBluescript KS+ und pCR 2.1 (siehe 2.2.1) bieten den Vorteil, dass DNA-Inserts der multiple cloning sites (MCS) von den T7- und T3- bzw. SP6-Promotoren flankiert werden. Durch den Einsatz geeigneter Restriktionsenzyme zur Plasmid-linearisierung (3.2.4) und der jeweiligen RNA-Polymerase kann von einer klonierten cDNA

nach Bedarf ein Sense- oder Antisense-RNA-Strang hergestellt werden. Durch Linearisierung am 5'-Ende des Matrizenstrangs kann eine zur RNA komplementäre Antisense-RNA-Sonde erzeugt werden. Durch Linearisierung am 3'-Ende des Matrizenstrangs und einem komplementären Promotor kann eine der mRNA entsprechende „sense“ RNA synthetisiert werden. Da RNA-Polymerasen Digoxigenin-markiertes UTP (Dig-UTP) als Substrat annehmen und einbauen können, lässt sich auf diese Weise das naszierende RNA-Molekül markieren.

Für einen Standardansatz benötigt man gemäß Protokoll des Herstellers (Boehringer/Mannheim) folgendes:

20 µl-Standardansatz:            1 µg Template-DNA, gelöst, linearisiert  
    2 µl 10 x Transkriptionspuffer  
    2 µl NTP-Markierungsgemisch  
    2 µl RNA-Polymerase  
    1 µl RNase-Inhibitor  
    ad 20 µl mit H<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde 2 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die RNA wurde danach sofort mit 2,4 µl 4 M LiCl und eiskaltem Ethanol p.a. gefällt. Nach gutem Durchmischen wurde die Probe entweder mindestens 2 h bei -20 °C oder mindesten 30 min bei -70 °C stehengelassen. Anschließend wurde die RNA durch Zentrifugation (12000g, 4°C, 10 min) pelletiert. Nach Abnehmen des Überstandes folgte das Waschen des Pellets mit 50 µl eiskaltem 70%-igem Ethanol (mit H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> angesetzt). Nach nochmaligem Zentrifugieren (9500g, 4°C, 5min) wurde das Pellet im Vakuum 2-3 min gefriergetrocknet, in 100 µl sterilem TE (pH 3,6) gelöst und bei Bedarf bei -70°C gelagert.

Die Menge an markierter Sonde konnte durch Erhöhung des Ansatzvolumens um ein 5-faches gesteigert werden. Der Einsatz von 1µg Template-DNA blieb dabei aber konstant.

NTP-Markierungsgemisch	6,5 mM UTP
	3,5 mM Dig-UTP
	je 10 mM ATP, GTP und CTP

### **3.2.15 Northern Blot (Transfer von RNA auf eine Membran)**

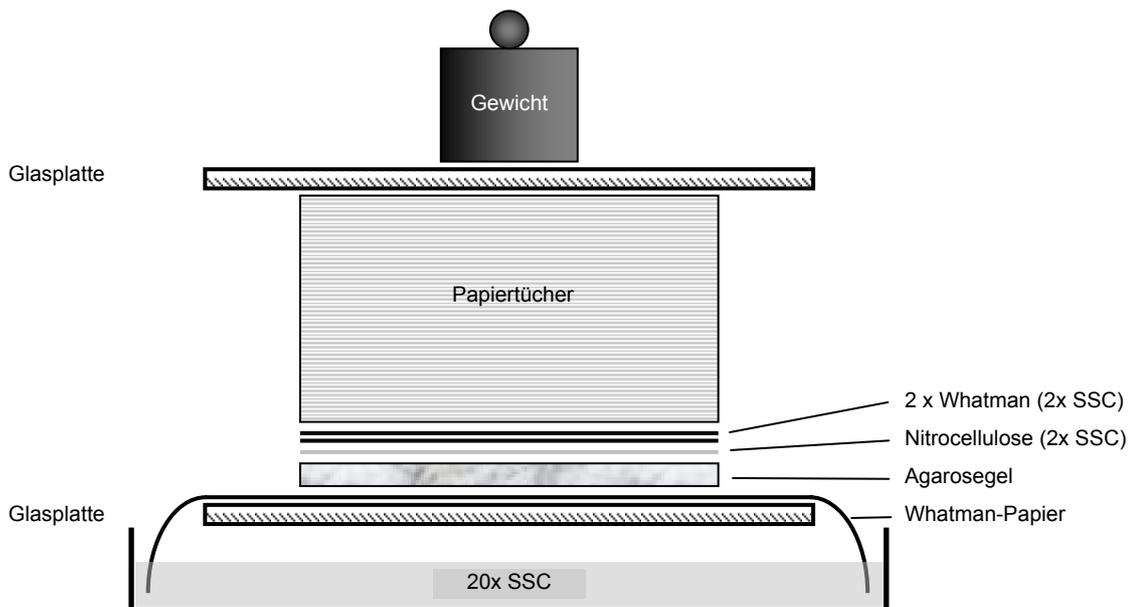
Lösungen:

- 20x SSC:                            3 M NaCl  
    0,3 M Na-Citrat
- 2x SSC

### Durchführung:

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel zunächst 30 min in 20x SSC äquilibriert. Dann wurde der Blot, wie in Abbildung 13 dargestellt, aufgebaut. Das Gel wurde dabei mit der Oberseite nach unten auf das Whatman-Papier gelegt, damit die Reihenfolge der Spuren auf dem späteren Blot der auf dem Gel entsprochen hat. Die Bereiche des Gels, die nicht geblottet werden sollten, wurden mit Parafilm abgedeckt, und dann wurde die mit 2x SSC getränkte Nitrocellulose aufgelegt. Dann folgten 2 Whatman-Filter, ebenfalls mit 2x SSC getränkt, und dann ein Stapel Papiertücher. Der Puffer wird durch Kapillarkraft durch das Gel in den Papierstapel gezogen, und dabei wird die RNA auf die Membran transferiert. Die Dauer des Transfers richtete sich nach der Größe des Fragments, das geblottet werden sollte. Normalerweise wurde mindestens 4 h oder über Nacht geblottet, bei Überprüfung kürzerer Sonden beispielsweise ca. 2 h.

War der Transfer beendet, wurde der Blot abgebaut, die Nitrocellulose kurz in 2x SSC gespült und luftgetrocknet. Anschließend wurde die transferierte RNA durch UV-Licht auf der Membran fixiert. Der Blot konnte in Alufolie eingewickelt mehrere Wochen gelagert werden.



**Abb.13:** Schematische Darstellung eines Northern Blot Aufbaus

### 3.2.16 Spezifischer Nachweis einer RNA auf einem Northern Blot

Über eine markierte Sonde (siehe 3.2.14) kann eine spezifische RNA auf einem Northern Blot sichtbar gemacht und somit nachgewiesen werden. Auf diese Weise kann man feststellen, ob eine bestimmte RNA in einem Gewebe zu einem bestimmten Zeitpunkt vorhanden ist und kann so das zeitliche Expressionsmuster eines Gens in diesem Gewebe auf Ebene der mRNA analysieren.

### Lösungen:

- Prähybridisierungslösung: 5x SSC (Endkonzentration)  
+ 50 % (v/v) Formamid  
+ 0,1 % (w/v) Laurylsarcosinat  
+ 0,02 % SDS  
+ 2-5 % (w/v) Blockierungsreagenz (Roche)  
⇒ zum Lösen erhitzen!
- Hybridisierungslösung: ca. 10 µl Sondenlösung (siehe 4.4.14) pro 10 ml  
Prähybridisierungslösung
- Waschpuffer 1: 2x SSC  
+ 0,1 % (w/v) SDS
- Waschpuffer 2: 0,1x SSC  
+ 0,1 % (w/v) SDS
- DIG-Puffer 1 (pH 7,5): 100 mM Maleinsäure  
150 mM NaCl

### Durchführung:

Der Blot wurde zunächst mindestens 1 h in Prähybridisierungslösung inkubiert, um alle unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Die Temperatur richtete sich dabei nach der Sonde, wobei wichtige Kriterien der G/C-Gehalt der Sonde, ihre Länge und die Homologie zwischen Sonde und nachzuweisender RNA waren. Im Allgemeinen wurde die Temperatur zwischen 50 und 68 °C gewählt. Nach der Prähybridisierung (1 h) wurde über Nacht mit derselben Temperatur hybridisiert.

Am nächsten Tag wurde der Blot 2 mal 15 min bei RT mit Waschpuffer 1 gewaschen, dann 2 mal 15 min in Waschpuffer 2 bei der Temperatur, mit der hybridisiert worden war. Nach den Waschsritten wurde der Blot 1 min in DIG-Puffer 1 äquilibriert, dann erfolgte die Detektion über Antikörper gegen die Digoxigenin-Markierung (siehe 3.3.17 bzw. 3.2.18).

### 3.2.17 Detektion über alkalische Phosphatase und NBT/BCIP

#### Lösungen:

- DIG-Puffer 1 (pH 7,5): 100 mM Maleinsäure  
150 mM NaCl
- DIG-Puffer 2: 1 % (w/v) Blockierungsreagenz (Roche) in DIG-Puffer 1  
⇒ zum Lösen erhitzen!

- Antikörperlösung: Anti-DIG-Fab-Fragmente vom Schaf, gekoppelt an alkalische Phosphatase (Roche)  
⇒  $1/5000$  verdünnt in DIG-Puffer 2
- DIG-Puffer 3 (pH 9,5): 100 mM Tris/HCl  
100 mM NaCl  
50 mM MgCl<sub>2</sub>
- Färbelösung (NBT/BCIP): 10 ml DIG-Puffer 3  
+ 33 µl BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, Roth; SL 50 mg/ml in 100 % Dimethylformamid)  
+ 66 µl NBT (p-Nitrotetrazoliumblau, Roth; SL 50 mg/ml in 70 % Dimethylformamid)

### *Durchführung:*

Zunächst wurde der Blot 30 min in DIG-Puffer 2 abgesättigt und dann weitere 30 min in Antikörperlösung inkubiert. Anschließend wurde der Blot 2 mal 15 min mit DIG-Puffer 1 gewaschen, danach 3-5 min in DIG-Puffer 3 äquilibriert und schließlich mit Färbelösung überschichtet. Durch die alkalische Phosphatase entsteht ein braun-violetter Niederschlag. Die Entwicklung erfolgte im Dunkeln und dauerte je nach Versuch zwischen 1 min und mehreren Stunden. Zum Abstoppen der Reaktion wurde der Blot gründlich mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gewaschen. Um das Ergebnis zu protokollieren, wurde der feuchte Blot entweder fotografiert oder mit einem Flachbrettscanner dokumentiert.

### **3.2.18 Detektion über Peroxidase und ECL (Enhanced Chemiluminescence)**

Diese Methode hat die Vorteile, dass man durch die kürzere Entwicklungsdauer schneller zu einem Ergebnis kommen kann und dass man einen Blot mehrmals ohne Strippen mit verschiedenen Sonden inkubieren kann.

#### Lösungen:

- DIG-Puffer 1 (pH 7,5): 100 mM Maleinsäure  
150 mM NaCl
- DIG-Puffer 2: 1 % (w/v) Blockierungsreagenz (Roche) in DIG-Puffer 1  
⇒ zum Lösen erhitzen!
- Antikörperlösung: Anti-DIG-Fab-Fragmente vom Schaf, gekoppelt an Peroxidase (Roche)  
⇒  $1/1000$  verdünnt in DIG-Puffer 2

- ECL-Lösungen 1+2 (Amersham Pharmacia Biotech)

### *Durchführung:*

Die Durchführung verlief analog zum Protokoll der Detektion mit alkalische Phosphatase: 30 min absättigen in DIG-Puffer 2, 30minütige Inkubation mit Antikörperlösung und zweimal 15minütiges Waschen mit DIG-Puffer 1. Direkt im Anschluß daran wurde die ECL-Reaktion durchgeführt. Dazu wurden die beiden ECL-Lösungen 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 möglichst faltenfrei in Frischhaltefolie eingeschlagen. Anschließend wurde mit dem Blot ein Röntgenfilm (Cronex) belichtet. Die Expositionsdauer betrug je nach Signal zwischen 1 sek und 20 min. Der Röntgenfilm wurde 1-3 min im Entwicklerbad inkubiert und dann nach kurzem Spülen mit Wasser 1-3 min im Fixierbad fixiert. Zum Schluss wurde der Film noch gründlich mit Wasser gespült und zum Trocknen aufgehängt. Zum Protokollieren wurden die Filme mit einem Flachbrettscanner dokumentiert und mit Adobe Photoshop bearbeitet.

### **3.2.19 Strippen eines Northern Blots**

Um mehrere Sonden auf demselben Blot testen zu können, ist es häufig notwendig die vorhandene gebundene Sonde „abzuwaschen“.

### Lösungen:

- Strip-Puffer (Probe Away):
  - 50 % Formamid
  - 50 mM Tris/HCl pH 8,0
  - 1 % (w/v) SDS

### *Durchführung:*

Der Blot wurde gründlich in H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen und dann 1 h bei 68 °C in Strip-Puffer inkubiert. Anschließend wurde wieder gründlich mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gewaschen.

Bevor eine neue Sonde auf diesem Blot verwendet wurde, wurde getestet, ob die alte Sonde komplett entfernt worden war. Dazu wurde der Blot mit DIG-Antikörpern und ECL entwickelt. War der Strip erfolgreich gewesen, dann konnte wieder prähybridisiert und mit einer anderen neu Sonde hybridisiert werden.

### **3.2.20 Isolierung von Zellkernen aus Kulturzellen (A6-Zellen)**

Zur Überprüfung des Chromatins wurden Zellkerne aus Kulturzellen isoliert, die dann anschließend mit Micrococcus.Nuklease verdaut wurden (siehe 3.5.8).

Lösungen:

- Waschpuffer : 10 mM Tris (pH 7,4)  
15 mM NaCl  
60 mM KCl  
0,15 mM Spermine  
0,5 mM Spermidin  
0,3 M Sucrose  
4 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM PMSF (frisch dazugeben !)

Für einen Präparationsansatz wurden Zellen in 2 großen Plastik-Petrischalen (Ø 14 cm) bis zu einer Zelldichte von maximal 2-3 x 10<sup>6</sup> Zellen pro ml Kulturmedium kultiviert. Das Medium wurde vorsichtig abgegossen und die Zellen in 10mM Tris/HCl (pH 7,8) resuspendieren. Anschließend wurden die Zellen 15 min auf Eis inkubieren, damit die Zellen durch das hypertotonische Medium aufquellen. Nun wurden die Zellen mit einem Teflonhomogenisator (10-20 mal) homogenisieren, um die Zellkerne aus dem Zytoplasma zu befreien. Zwischendurch wurde unter dem Mikroskop die Isolierung der Zellkerne überprüft. Die nun isolierten Kerne wurden bei 1000 g pelletiert, in 250 µl Waschpuffer resuspendiert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Nach zweimaligen waschen mit dem Waschpuffer wurde das gewaschene Pellet in 1 ml 100 mM NaCl / 2 mM MgCl<sub>2</sub> aufgenommen und Anzahl der Kerne in einer Neubauer-Kammer bestimmt (siehe 3.2.21). Dann wurden die Kerne wiederum bei 3500 rpm für 10 min bei 4°C pelletiert und schließlich in einem entsprechenden Puffer aufgenommen (z.B. Micrococcus Nuklease-Verdau-Puffer; siehe 3.5.8). Die Menge an isolierter DNA wurde bei einer Absorption von 260 nm in 1%igen SDS gemessen, wobei 27 Absorptionseinheiten 1mg DNA entsprechen.

### **3.2.21 Mengenbestimmung von Zellkernen mit der Neubauer-Kammer**

Die Zählung der Zellkerne erfolgt stets mikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Kammer. Im Mittelsteg der Neubauer-Kammer sind Zählnetze eingraviert. Diese bestehen aus 4 Großquadraten, die jeweils aus 16 Kleinquadraten bestehen. Der Abstand zwischen dem gravierten Glassteg und dem aufgelegten eingeschliffenen Deckglas beträgt 0,1 mm. Die Fläche eines Großquadrates beträgt 1 mm<sup>2</sup>, somit ist das Volumen eines Großquadrates 0,1 µl. Es wurden stets 4 Großquadrante ausgezählt, wobei darauf zu achten ist, dass Zellen, die auf den Begrenzungslinien zwischen den Quadraten liegen, nicht doppelt gezählt werden. Aus der Anzahl der gezählten Zellen kann auf die Zellzahl im Gesamtvolumen geschlossen werden. Dazu wurde diese Formel benutzt:

$$16 \times \varnothing \text{Zellzahl pro Kleinquadrat} \times 10^4 \times \text{Verdünnung} = \text{Anzahl} / \text{ml}$$

### 3.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.3.1 Perchlorsäure (PCA)–Extraktion

Lösungen: 5% PCA (Perchlorsäure 0,72N)

Durchführung:

Die PCA-Extraktion wurde im Wesentlichen nach Kleinschmidt et al. (1983) durchgeführt. Gewebe oder Proteinextrakte wurden mit 5% PCA homogenisiert oder gemischt und 30 min auf Eis unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Unlösliche Proteine wurden mit 4400 rpm bei 4°C in einer Minifuge pelletiert und die PCA-löslichen Proteine im Überstand mit 6-fachem Volumen Azeton über Nacht bei -20°C gefällt. Die Azeton-präzipitierten Proteine wurden mit 12000 g pelletiert, mit 70% eiskaltem Azeton gewaschen, getrocknet und in einem entsprechenden Puffer resuspendiert.

#### 3.3.2 Herstellung und Aufreinigung eines Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteins

Um ein gewünschtes Protein als GST-Fusionsprotein exprimieren lassen zu können, musste zunächst die entsprechende DNA-Sequenz gewonnen und in den Vektor pGEX-5X-1 (Amersham Pharmacia Biotech) einkloniert werden (siehe 3.2.7). Bei Expression dieses Konstrukts in Bakterien hat man ein Fusionsprotein erhalten, das aus der Glutathion S-Transferase, einem Enzym, das ursprünglich aus *Schistosoma japonicum* stammt und eine molekulare Masse von ca. 26 kDa besitzt, und einem spezifischen Protein besteht. Über den GST-Anteil war eine Aufreinigung des Proteins möglich. Vor der Expression des Konstrukts wurde noch überprüft, ob die einklonierte DNA-Sequenz im richtigen Leseraster inseriert hatte, um sicher zu gehen, dass das richtige Protein exprimiert werden würde.

##### 3.3.2.1 Expression des GST-Fusionsproteins in Bakterien

Für die Expression wurden Bakterien vom Stamm *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL verwendet (siehe auch 2.1.5).

Lösungen:

- LB-Medium (siehe 3.1.1)
- IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-Thiogalactosid, Applichem; SL 1 M in H<sub>2</sub>O)

Durchführung:

Es wurde, wie unter 3.1.1 beschrieben, eine Flüssigkultur hergestellt, die bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,9 durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert wurde. Vor der Induktion wurde eine Probe abgenommen, die parallel zur induzierten Kultur weitere 4-6 h bei 37 °C inkubiert wurde, bevor die Bakterien durch 10minütige Zentrifugation bei 3000 g pelletiert und geerntet worden sind. Diese Probe (nicht induzierte Kontrolle)



Waschschritte mit PBS, um restliches Ethanol zu entfernen. Dazu wurde mit jeweils dem 10fachen Säulenvolumen kaltem PBS gut resuspendiert und erneut 5 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde schließlich abgenommen und verworfen. Zum Schluss wurde 1 Säulenvolumen kaltes PBS zugegeben, was zu einer 50%igen Sepharose-Suspension in PBS führte, die später direkt für die Reinigung eingesetzt wurde. In PBS kann die Sepharose bei 4 °C etwa einen Monat gelagert werden.

### **Aufschluß der Bakterien:**

Das Bakterienpellet wurde aufgetaut und in  $\frac{1}{20}$  Volumen der Ausgangskultur Aufschlusspuffer resuspendiert. Die Suspension wurde 10-20 min bei 22-25 °C auf einem Rollinkubator inkubiert und anschließend sonifiziert. Sonifiziert wurde auf Eis mit wenigen, möglichst kurzen Ultraschallstößen. Nach der Sonifikation wurde die Suspension weitere 20 min rollend bei 22-25 °C inkubiert. Dieser Schritt sollte die Micellen auflösen, die sich bei der Sonifikation bilden und Proteine einschließen konnten. Vor der anschließenden 20minütigen Zentrifugation bei 10000 g und 4 °C wurde eine Probe abgenommen, die separat zentrifugiert wurde. Pellet und Überstand der Probe wurden getrennt bei -20 °C aufbewahrt („Sonicat Pellet“ und „Sonicat Überstand“) und dienten als Kontrollen, ob sich das Protein gut aus den Bakterien hatte gewinnen lassen. Der Überstand der zentrifugierten Suspension wurde für die Reinigung verwendet, das Pellet konnte verworfen werden.

### **3.3.2.3 Reinigung nach der Batch-Methode:**

Der Überstand wurde mit der entsprechenden Menge der vorbereiteten Bulk-Matrix vermischt und die Mischung dann 30 min bei 22-25 °C unter Rollen inkubiert. Anschließend wurde 5 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert. Vom Überstand wurde eine Probe („Durchlauf“) für die Analyse in der SDS-PAGE abgenommen, der Rest wurde verworfen. Es folgten 3 Waschschritte mit jeweils dem 10fachen Säulenvolumen kaltem PBS. Nach jedem Waschschritt wurde 5 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände der Waschschritte wurde gesammelt und aufgehoben für die Analyse im SDS-Gel („W1-3“). Anschließend wurde das an die Sepharose-Matrix gebundene Fusionsprotein eluiert. Dazu wurde pro Elutionsschritt 1 Säulenvolumen Elutionspuffer zugegeben und gemischt. Nach einer 10minütigen Inkubation bei 22-25 °C wurde 5 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand, der das gereinigte Fusionsprotein enthielt, abgenommen. Es wurde 3-5 mal eluiert und die Elutionen getrennt aufbewahrt („E1“-„E5“).

Kurzfristig wurden die Proben bei 4 °C, längerfristig bei -20 °C gelagert.

### **Proben für die SDS-PAGE:**

Die Pellets der Proben aus Kultur und Sonicat wurden in der entsprechenden Menge SDS-Probenpuffer aufgenommen (1 ml Probe  $\Rightarrow$  1 ml Probenpuffer), von den Überständen,

Wasch- und Elutionsfraktionen wurden jeweils 10 µl mit Probenpuffer vermischt und aufgetragen.

### 3.3.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration über die $E_{280}$

Die Konzentration des Fusionsproteins in den Elutionsfraktionen kann näherungsweise über  $E_{280}$ , die Extinktion der Lösung bei 280 nm, bestimmt werden. Für GST allein wurde ermittelt, dass eine  $E_{280}$  von 1 einer Konzentration von ca.  $0,5 \text{ mg/ml}$  entspricht. Die Ausbeuten aus den Reinigungen wurden alle auf diese Weise bestimmt.

### 3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli)

Das gebräuchlichste Verfahren zur Auftrennung und Reinheitskontrolle von Proteinen ist die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Wanderungsgeschwindigkeit von Molekülen im elektrischen Feld hängt normalerweise von drei Faktoren ab: der Größe, ihrer Form und ihrer elektrischen Ladung. Bei der SDS-PAGE ist jedoch allein die Masse für die Wanderungsgeschwindigkeit ausschlaggebend. Dies erreicht man dadurch, dass dem Gel und dem Laufpuffer SDS, ein Detergenz mit stark amphipatischen Eigenschaften, zugegeben wird. Es zerlegt oligomere Proteine in ihre Untereinheiten und denaturiert sie. An die entfalteten Peptid-Ketten binden SDS-Moleküle und verleihen ihnen eine stark negative Ladung. Zur vollständigen Denaturierung gibt man außerdem Thiole zu, um die Disulfidbrücken der Proteine zu spalten.

Lösungen:

- Lösung **A**: (Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung) 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid  
(gebrauchsfertig von der Firma Applichem)
- Lösung **B**: (Trenngelpuffer) 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
- Lösung **C**: 10 % SDS
- Lösung **D**: (Sammelgelpuffer) 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
- Laufpuffer (1000 ml): 6,0 g Tris, 28,8 g Glycin
- 10 % Ammoniumpersulfat (APS)
- TEMED (Roth)
- Probenpuffer: Rotiload (Roth)

Für die Auftrennung wurden 13-18 % ige Trenngele verwendet. Das Sammelgel war immer 6%ig. Für die Gelelektrophorese wurde das System „MiniProtean II“ der Firma Biorad verwendet. Das System beinhaltet einen sogenannten „Casting Stand“, in dem das Gel gegossen werden kann, ohne dass man vorher die Glasplatten, zwischen die das Gel gegossen wird, abdichten muss. Die Glasplatten werden mit den Abstandhaltern fest in eine Halterung geschraubt. Diese Halterung wird dann in den „Casting Stand“ eingespannt. Die

Unterseite der Glasplatten wird nun so auf einen flexiblen Untergrund gedrückt, dass bei korrektem Aufbau nichts auslaufen kann.

Vor dem Gießen des Gels wurde die Apparatur aufgebaut und die Höhe des Trenngels auf den Glasplatten markiert. Das Trenngel sollte so hoch sein, dass unter den Enden des Kammes noch etwa 0,5 bis 1 cm Sammelgel Platz haben. Dann wurden die Lösungen, je nach gewünschter Trenngel-Konzentration, zusammenpipettiert. Die angegebenen Mengen sind ausreichend für 2 Minigele:

	<b>10 %</b>	<b>12 %</b>	<b>13 %</b>	<b>15 %</b>	<b>18 %</b>
<b>Lösung A</b>	2,5 ml	3,125 ml	3,25 ml	3,75 ml	4,5 ml
<b>Lösung B</b>	5,0 ml				
<b>Lösung C</b>	100 µl				
<b>Lösung F</b>	100 µl				
<b>TEMED</b>	10 µl				
<b>H<sub>2</sub>O</b>	2,3 ml	1,665 ml	1,55 ml	1,05 ml	300 µl

**Tabelle 3.5:** Pipettierschema für die Trenngellösung bei SDS-PAGE

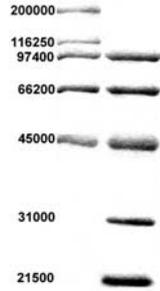
Die Lösungen wurden in ein Plastikröhrchen pipettiert, wobei zuletzt APS und TEMED zugegeben wurden, welche die Polymerisation starten. Die Gellösung wurde durchmischt und mit einer Pasteurpipette etwa 4 mm bis über die Markierung für die Höhe des Trenngels gegossen. Danach wurde sofort mit destilliertem Wasser überschichtet, da die Polymerisation am besten unter Luftabschluss abläuft. Das Trenngel sollte vor dem Gießen des Sammelgels etwa 30 min polymerisieren. Nach Ablauf der 30 min wurde das Wasser mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Sammelgel konnte vorbereitet werden.

	<b>6 %</b>
<b>Lösung A</b>	1,5 ml
<b>Lösung D</b>	2,55 ml
<b>Lösung C</b>	100 µl
<b>Lösung F</b>	100 µl
<b>TEMED</b>	10 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	5,8 ml

**Tabelle 3.6:** Pipettierschema für die Sammelgellösung bei SDS-PAGE:

Das Sammelgel wurde mit einer Pasteurpipette auf das Trenngel gegossen und dann der Kamm eingesetzt. Luftblasen in den Geltaschen wurden durch Rütteln am Kamm entfernt. Sollen besonders große Probenmengen aufgetragen werden, so empfiehlt es sich, die doppelte Menge von APS und TEMED zu verwenden, da sich stabilere Taschen ergeben, die bis oben befüllt werden können. Das Gel konnte nach ca. 30 min beladen werden, oder, um eine bessere Trennschärfe zu erreichen, mehrere Stunden bei 4°C aufbewahrt werden. Vor dem Beladen wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit Laufpuffer ausgespült, um Gelreste zu entfernen. Proteinproben wurden mit 1 Vol. 2x Rotiload (verdünnt mit 1x PBS) vermischt und vor dem Auftragen 10 min bei 95°C denaturiert. Als Größenstandard wurde teils ein vorgefärbter „broad range“ Marker der Firma GIBCO Life Technologies, teils „low-“ und „high-range“ Marker der Firma BioRad und Protein MW-Standard von MBI verwendet.

Protein	Molecular Weight	High Range	Low Range
Myosin	200,000	X	
β-galactosidase	116,250	X	
Phosphorylase b	97,400	X	X
Serum albumin	66,200	X	X
Ovalbumin	45,000	X	X
Carbonic anhydrase	31,000		X
Trypsin inhibitor	21,500		X
Lysozyme	14,400		X
Aprotinin	6,500		X



**Tabelle 3.7:** High und Low Marker

Die Gelelektrophorese erfolgte für 2 bis 2,5 h bei 100 V (U konstant). Danach wurde das Gel entweder mit Coomassie gefärbt oder geblottet.

### 3.3.4 Coomassie-Färbung

Lösungen:

- Coomassie-Färbelösung: 0,25 % (w/v) Brillant Blau R250 (Roth)  
40 % (v/v) Methanol  
8 % (v/v) Essigsäure
- Entfärbelösung: 25 % (v/v) Methanol  
10 % (v/v) Essigsäure

*Durchführung:*

Für die Coomassie-Färbung wurde das Gel 30 min in der Färbelösung sanft geschüttelt und anschließend über Nacht in Entfärber gelegt. Durch Zugabe eines gefalteten weißen Papiertuches konnte die Entfärbung beschleunigt werden. Außerdem macht das Papier einen Wechsel der Entfärbelösung überflüssig. Coomassie färbt spezifisch Proteine. Das gefärbte Gel wurde auf einem UV-Leuchtschirm photographiert.

### 3.3.5 Silberfärbung von Proteingelen

Die Silberfärbung von Proteinen wurde nach einer modifizierten Methode von Blum et al. (1987) durchgeführt.

Lösungen:

Na-Thiosulfat-Lösung	43g Na-Thiosulfat auf 100 ml dH <sub>2</sub> O
AgNO <sub>3</sub> -Lösung	2 g auf 1l dH <sub>2</sub> O
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -Lösung	60 g auf 1l dH <sub>2</sub> O
Fixierlösung	50% Methanol 12% Essigsäure
Lösung 1	50% Ethanol
Lösung 2	30% Ethanol
Imprägnierlösung	300 ml dH <sub>2</sub> O 200 µl 37% Formalin 150 µl Na-Thiosulfat-Lösung
Silberfärbelösung	300 ml AgNO <sub>3</sub> -Lösung 200 µl 37% Formalin
Reduktionslösung	300 ml Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -Lösung 150 µl 37% Formalin 3 µl Na-Thiosulfat-Lösung

Vor der eigentlichen Silberfärbung wurden die Proteine mit Coomassie angefärbt (siehe 3.3.4). Diese Vorfärbung reduziert deutlich die Hintergrundfärbung.

Danach wurde das zu färbende Gel unter Schütteln über Nacht in Fixierlösung inkubiert. Wenn nötig, kann die Zeit auch auf 3-4 h verkürzt werden, wobei jedoch wiederholtes Wechseln der Fixierlösung nötig ist. Je eine 20minütige Inkubation erfolgte zuerst in Lösung 1, dann in Lösung 2, wobei der Wassergehalt des Geles langsam erhöht wird. Nach Entfernen des Methanols, wurde das Gel in Imprägnierlösung für genau 1 min unter kräftigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde es für 3 x 1 min in dH<sub>2</sub>O gewaschen. Durch die darauffolgende Inkubation mit der Silberfärbelösung für 20 min – 1h wurde das Gel mit den Silberionen getränkt. Überflüssige Silberionen wurden durch anschließendes 2maliges Waschen für je 30 sec entfernt. Nach dem Waschen erfolgte der eigentliche Färbeschritt. Dabei musste das Waschwasser sorgfältig entfernt werden. Nach Zugabe von 150 ml Reduktionslösung und kräftigem, kurzen Schütteln fällt ein rotbrauner Niederschlag aus, der aus zu Silbercarbonat reduziertem Silber besteht. Nach etwa 30 sec wurde diese Lösung durch 150 ml frische Reduktionslösung ersetzt. Die Proteine erschienen nun hellbraun und wurden langsam dunkelbraun bis schwarz. Die Reduktion wurde abgebrochen,

als sich der Hintergrund des Geles gelblich zu färben begann. Nach dem Absaugen der Reduktionslösung wurde das Gel 2 x in dH<sub>2</sub>O gewaschen und die Silberreduktion durch 2 x 15 min Inkubation in Fixierlösung endgültig abgebrochen.

Anschließend konnten die Gele in Durchlicht fotografiert oder direkt gescannt werden.

### 3.3.6 Trocknen von SDS-Gelen

Um Coomassie- bzw. Silber-gefärbte Gele längere Zeit aufzubewahren, wurden sie getrocknet. Dazu wurde das Gel mit Hilfe einer flexiblen Folie auf ein Whatman-Papier überführt, so dass zwischen Papier und Gel keine Luftblasen entstehen. Dann wurde das Gel mit Frischhaltefolie bedeckt und in einem Drystar-Geltrockner 90 min bei 75°C und maximaler Vakuumeistung getrocknet. Nach Ablauf der Trockenzeit wurde das Gel zum Abkühlen im Trockner belassen und konnte dann entnommen werden.

### 3.3.7 Western Blotting (Proteintransfer auf eine Membran)

Lösungen:

- a) Blottingpuffer: 10 mM CAPS, 10 % Methanol; pH 10
- b) TBS: 150 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl; pH 7,4
- c) TBST: TBS + 0,1 % Tween
- d) 5 % Milch in TBS oder TBST
- e) Ponceau S (Sigma)

Nachdem die Lauffront des Gels bis kurz vor das Ende gelaufen war, wurde die Elektrophorese gestoppt und das Gel abgebaut. Das Sammelgel wurde mit Hilfe eines Spatels entfernt und entsorgt. Das Gel wurde nun 5-10 min in Blottingpuffer inkubiert. Währenddessen konnten Nitrozellulose und Whatmanpapier mit Hilfe einer Schablone auf Gelgröße zugeschnitten werden. Der Western Blot wurde im Mini-TransBlot System der Firma BioRad durchgeführt. Es können 2 Gele gleichzeitig geblottet werden.

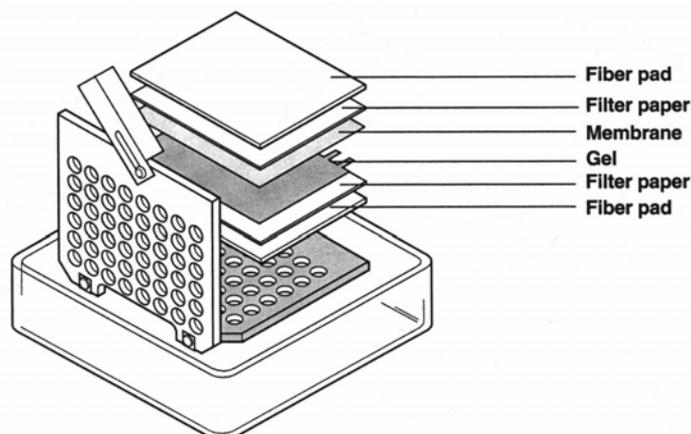


Abb.14: Aufbau eines Blot-Sandwichs

Die Grafik (Abb.14) zeigt den Aufbau eines Blot-Sandwichs für einen Transfer in der Mini Trans Blot Kammer: Filterpapier und Nitrozellulose wurden mit Blottingpuffer getränkt, dann wurde der Blot wie abgebildet aufgebaut. Das Gel wurde verkehrt herum auf das untere Whatman gelegt, damit die Reihenfolge der Banden im Blot anschließend der auf dem Gel entspricht. Luftblasen wurden mit Hilfe eines Corex-Röhrchens aus dem Aufbau gedrückt. Das Sandwich wurde zusammen mit einem Kühlakku in die Blotkammer gegeben (Orientierung schwarz zu schwarz beachten!) und die Kammer mit Blottingpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgte 30-45 min bei 50 V (U konstant) und 170 mA. Im Verlauf des Transfers sinkt die Stromstärke auf ca. 110 mA ab. Danach wurde der Blot abgebaut und die Nitrozellulose gut mit H<sub>2</sub>O bidest. gespült. Der Transfer wurde durch eine Färbung mit Ponceau S überprüft. Dazu wurde der Blot in einer Glasküvette gut mit destilliertem Wasser gespült, mit Ponceau S bedeckt und kurz unter Schütteln inkubiert (1-2 min). Ungebundenes Ponceau S wurde mit deionisiertem Wasser abgespült.

Die Markerbanden wurden mit einem weichen Bleistift markiert und der Blot in 10 % Milch pH 7,4 bis 7,6 entweder 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C abgesättigt.

Nach dem Absättigen folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, der in der Absättigungslösung verdünnt wurde. Je nach Antikörper wurden verschiedene Verdünnungen angewendet:

Die Inkubationszeit betrug 1 h bei RT. Danach wurde der Blot gut mit TBST gespült und 3 x 15 min mit TBST gewaschen. Danach folgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper, der an Peroxidase gekoppelt war. Dieser wurde 1:10000 in 10 % Milch in TBST verdünnt und mindestens 1 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Blot wiederum 3 x 10 min mit TBST gewaschen und konnte dann mit Hilfe von ECL (enhanced chemiluminescence) entwickelt werden. Hierzu wurden jeweils 1 ml der ECL-Lösungen 1 und 2 in einer Plastikschaale vermischt und der Blot damit benetzt. Nach 2 min wurde der Blot mit einer Pinzette aus der Lösung genommen, abgetropft und faltenfrei in Frischhaltefolie eingeschlagen. Er wurde in eine Bleikassette gelegt und ein Stück Röntgenfilm (Cronex) aufgelegt.

Die Expositionszeit ist abhängig vom verwendeten spezifischen Antikörper und kann von wenigen Sekunden bis zu mehreren Stunden betragen. Die Röntgenfilme wurden 3 min im Entwicklerbad entwickelt, kurz gewässert und anschließend 3 min fixiert. Anschließend wurde der Film nochmals gut mit Wasser gespült und zum Trocknen aufgehängt. Für die Erstellung von Abbildungen wurden die Filme mit einem Flachbrettscanner eingescannt und mit dem Programm Adobe Photoshop bearbeitet.

### 3.3.8 Spezifischer Proteinnachweis mit Antikörpern

Der in Milch oder BSA abgesättigte Blot wurde 1 h mit dem in Absättigungslösung verdünnten Antikörper bei RT inkubiert. Es wurde immer die Absättigungslösung verwendet, mit der bereits abgesättigt worden war, die Verdünnung war abhängig vom verwendeten Antikörper (siehe Tabelle 3.8). Nach der Antikörperinkubation wurde der Blot kurz in TBS oder TBST gespült und anschließend 3 mal 10 min gewaschen. Danach wurde 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert (Verdünnung und Puffer siehe Tabelle 3.9). Anschließend wurde wieder 3-4 mal 10 min in TBS oder TBST gewaschen. Die Detektion erfolgte dann über ECL (siehe 3.2.17), da ausschließlich an Peroxidase (HRP = Horseradish Peroxidase) gekoppelte Sekundär-Antikörper verwendet wurden.

Antikörper	Absättigungslösung	Verdünnung bzw. Arbeitskonzentration	Herkunft
anti GST (Amersham Pharmacia Biotech)	5 % Milch in TBS, pH 7,6	1:10000	Kaninchen
anti-XHMGN1 (aX14-S120)	TBST, pH 7,6	1:2000	Kaninchen
anti-XHMGN2 (aX17-S388)	5 % Milch in TBS, pH 7,6	1:2000	Kaninchen
anti-Nukleoplasmin	5 % Milch in TBS, pH 7,6	1:1000	Kaninchen
anti-H1A	5 % Milch in TBS, pH 7,6	1:1000	Maus

**Tabelle 3.8:** Verdünnungen der Primärantikörper für Western Blot

	Antikörper	Absättigungslösung	Verdünnung	Herkunft
Sekundär-Antikörper	anti-Rabbit-HRP (Dianova)	5 % Milch in TBST	<sup>1</sup> / <sub>10000</sub>	Ziege
	anti-Rabbit-HRP (Promega)	5 % Milch in TBST	<sup>1</sup> / <sub>10000</sub>	Ziege
	anti-Maus-HRP (Dianova)	5 % Milch in TBST	<sup>1</sup> / <sub>10000</sub>	Ziege

**Tabelle 3.9:** Verdünnungen der Sekundärantikörper für Western Blot

### 3.3.9 Strippen eines Western Blots

Lösungen:

- Strip-Puffer (50 ml):  
31,25 ml 100 mM Tris/HCl pH 6,7  
5 ml 20 % (w/v) SDS  
390 µl β-Mercaptoethanol
- TBS oder TBST (siehe 3.3.7)

*Durchführung:*

Der Blot wurde zunächst gut in TBS oder TBST gewaschen, dann 30 min (nicht länger!) bei 50 °C in Strip-Puffer inkubiert. Anschließend wurde der sehr gründlich mit TBS oder TBST gewaschen. Danach konnte der Blot neu abgesättigt und mit einem neuen Antikörper inkubiert werden.

## 3.4 Mikroskopie

### 3.4.1 Immunlokalisation an transfizierten Zellen

Die Verteilung eines Proteins in Zellen kann gut mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Meist wird das Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz angewandt, bei dem der spezifische, gegen das gesuchte Protein gerichtete Antikörper durch einen sekundären Antikörper visualisiert wird, der eine Markierung trägt, z. B. einen Fluoreszenzfarbstoff. Dieser Farbstoff erzeugt dann bei Anregung durch ein Licht bestimmter Wellenlänge eine spezifische Fluoreszenz. Das Fluoreszenzmuster unter dem Mikroskop entspricht dann dem Verteilungsmuster des untersuchten Proteins in den Zellen oder Geweben.

### 3.4.2 Fixierung von Zellen

Um Zellen unter dem Mikroskop besser beobachten und Proteine mittels spezifischer Antikörper nachweisen zu können, wurden die Zellen, die auf Deckgläschen gewachsen waren, mit verschiedenen Methoden fixiert.

*Lösungen:*

- PBS (siehe 3.3.2.2)
- Methanol (100 %) bei -20°C
- Aceton (100 %) bei -20°C
- Tritonlösung (pH 7,4): 0,1 % (v/v) Triton™ X-100 in PBS
- PFA-Lösung (pH 7,4): 2 % FA (w/v) aus einer 37% gesättigten FA-Lösung (Appllichem) in PBS

### Fixierung mit Methanol/Aceton

Die Deckgläschen wurden aus der Petrischale genommen und in 1 x PBS gewaschen, um Medienreste zu entfernen. Die Fixierung erfolgte für 3 min in Methanol und 5 min zur Dehydrierung in Aceton bei jeweils  $-20^{\circ}\text{C}$ . Nach der Fixierung wurden sie an der Luft mit der zellenbeschichteten Seite nach oben getrocknet.

### Fixierung mit 2 % Formaldehyd (FA)

Nach dem Waschen der Deckgläschen mit 1 x PBS erfolgte die Fixierung in 2% FA-Lösung in PBS für 10 min bei Raumtemperatur. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen folgte eine Inkubation mit einer 0,1% Tritonlösung in PBS für 10 min. Danach wurden die Deckgläschen 3 min in PBS gewaschen und anschließend für die Antikörperinkubation verwendet.

### **3.4.3 Antikörperinkubation**

Nach der Fixierung mit Methanol/Aceton oder FA konnte man eine Antikörperinkubation anschließen. Alle Schritte fanden in einer feuchten Kammer statt, um eine Austrocknung der Zellen zu verhindern. Pro Deckgläschen benötigte man ca. 20-25  $\mu\text{l}$  verdünnten Antikörper.

#### *Lösungen:*

- Antikörperlösung: Verdünnung in PBS:
  - primärer Antikörper: empirisch ermittelt
  - sekundärer Antikörper: 1:75
- Hoechst 33258: Arbeitskonzentration 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (SL 5 mg/ml)
- Mowiol: 10 g Mowiol (Hoechst) in 40 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -freiem PBS (pH 8,0) 16 h rühren; 20 ml Glycerin zugeben und nochmals 16 h rühren; ungelöste Partikel abzentrifugieren und Überstand aliquotiert bei  $-20^{\circ}\text{C}$  lagern.

#### *Durchführung:*

*Primärer Antikörper:* Die Deckgläschen wurden mit einer Lösung von primären Antikörpern in PBS überschichtet. Die Endkonzentration betrug je nach Güte des Antikörpers etwa 1 bis 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bzw. aus einer 1:100 Verdünnung bei Seren, wobei die tatsächlich eingesetzte Konzentration empirisch ermittelt wurde. Die Inkubationszeit betrug etwa 30 min. Daraufhin wurden unspezifisch gebundene Antikörper durch 2 x 5 min Waschen in PBS entfernt.

*Sekundärer Antikörper:* Ohne die Zellen auf den Deckgläschen austrocknen zu lassen wurde mit einem zweiten Antikörper, an den Fluoreszenzfarbstoffe wie Texas Red oder FITC gebunden war, inkubiert. Dieser war gegen die konstante Region der ersten Antikörper gerichtet, die spezifisch für die Tierart ist, aus der der primäre Antikörper gewonnen wurde.

Die Inkubationszeit betrug 30 min. Zusätzlich wurde der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 nach 20-25 min zugegeben (Inkubationszeit 5-10 min). Dieser bindet spezifisch an DNA. Nach erneutem 15minütigen Waschen in PBS wurden die Deckgläschen mit den Zellen nach unten mittels Mowiol auf einen Objektträger eingebettet. Das Mowiol bettet die Präparate dauerhaft ein; es eignet sich für Immunfluoreszenzen, da es UV-gängig ist. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiophot, ausgerüstet mit einer Digitalkamera, PixelFly).

### **3.4.4 Fluoreszenzmikroskopie**

Eine sehr effektive Methode der Lichtmikroskopie zur Lokalisierung von Proteinen in einer Zelle ist die Fluoreszenzfärbung von Zellen und deren Beobachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Eigenschaft der Fluoreszenzfarbstoffe ist es, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren und es bei einer anderen längeren Wellenlänge zu emittieren. Das Objekt wird nur mit Anregungslicht beleuchtet; alles andere Licht wird herausgefiltert. Das von der Probe emittierte Licht wird durch weitere Filter geleitet, und gelangt so durchs Okular ins Auge des Betrachters. Mit einer digitalen Kamera konnten die Ergebnisse protokolliert werden.

## **3.5 Arbeiten mit *Xenopus laevis***

### **3.5.1 Induktion der Ovulation und Gewinnung von Eiern**

Geschlechtsreifen *Xenopus* Weibchen wurden ca. 500 U HCG (humanes Choriongonadotropin) subcutan injiziert. Nach der Injektion beginnt die Eiablage bei Raumtemperatur etwa 12 Stunden später. Die Eiablage wurde durch sanftes Massieren des Hinterleibes unterstützt. Die Eier wurden direkt in 1 x MMR abgelaicht. Injizierte Weibchen wurden erst nach mindestens 3 Monaten Ruhephase erneut zur Ovulation induziert.

### **3.5.2 Isolierung von *Xenopus laevis* Hoden**

Geschlechtsreife *Xenopus* Männchen wurden 20 Minuten in MS 222 (3- Aminobenzoessäure-ethylester-methansulfonat; 0,2% in Leitungswasser) betäubt und dann auf Eis operiert. Die Hoden wurden in 1x MMR / 30% FCS bei 4°C für mehrere Tage aufbewahrt.

### **3.5.3 *In vitro* Fertilisation**

Die frisch abgelaichten Eier wurden in 1 x MMR gespült. Anschließend wurde die Flüssigkeit komplett entfernt. Der Hoden wurde der Länge nach aufgeschnitten und mit einer Pinzette vorsichtig über die Eier gestrichen. Danach wurde der Hoden in 1 x MMR homogenisiert und ebenfalls über die Eier verteilt. Nach 5 Minuten wurde mit 5% MMR die Petrischale aufgefüllt.

Die kortikale Rotation als Zeichen der erfolgreichen Befruchtung trat nach ca. 30 Minuten ein. Die Entfernung der Gallerthülle wurde 45 Minuten nach der Befruchtung mit einer 4minütigen Behandlung mit 2% Cysteinchlorid (pH 7,8) durchgeführt.

### **3.5.4 Embryonenhaltung**

Lösungen:

- 10 x MMR: 1 M NaCl; 20 mM KCl; 20 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 150 mM HEPES; pH 7,8
- Agar (für Agarböden in Petrischälchen): 20 g Aktivkohle; 1l H<sub>2</sub>O (gut rühren und aufkochen); 20 g Agar-Agar (auf 50 °C abkühlen lassen); 5 g Sulfodiazin)

Die befruchteten Eier wurden in Petrischalen gehalten, welche mit einem Agarboden beschichtet waren. Gehalten wurden die Embryonen bei einer Temperatur von ca. 23°C in 5% MMR. Die Stadienbestimmung folgte dabei der Einteilung nach Niewkoop und Faber (1975).

### **3.5.5 Präparation der Oozyten von *Xenopus laevis* und *Pleurodeles waltl***

Lösungen:

- Modified Barth-Medium: 88 mM NaCl; 1 mM KCl; 2,4 mM NaHCO<sub>3</sub>; 1mM MgSO<sub>4</sub>; 0,3 mM CaNO<sub>3</sub>; 0,4 mM CaCl<sub>2</sub>; 10mM HEPES; pH 7,8
- OR2-Medium: 110 mM NaCl; 2 mM KCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM NaHCO<sub>3</sub>; 0,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 15 mM Tris; pH 7,8

Weibliche *Xenopus laevis* bzw. *Pleurodeles waltl* wurden in MS 222 betäubt und auf Eis gelegt. Mit einem kleinen Schnitt wurde die Bauchhöhle geöffnet. Durch diese Öffnung wurden Ovarstückchen entnommen und in Barth-Medium gelagert. Die Wunde wurde wieder zugenäht und die Tiere konnten, nachdem sie aufgewacht waren und sich einer 24h Quarantäne unterzogen hatten, wieder zurück in ein Zuchtbecken gebracht werden. Die Oozyten wurden bis zur weiteren Verwendung für maximal 2 Tage in Barth-Medium bzw. in OR2-Medium gehalten.

### **3.5.6 Paraffineinbettung**

Lösungen:

- MEMFA: 0,1 M MOPS (pH 7,4); 2 mM EGTA; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 3,7% Formaldehyd (37%)
- Methanol
- Tertiäres Butanol

Die Embryonen wurden nach den jeweilig benötigten Stadien sortiert (Niewkoop und Faber; 1975) und in Eppendorfreaktionsgefäße überführt. In je 1 ml MEMFA-Lösung wurden die Embryonen für 1-2 h bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde wieder je 500 µl der MEMFA-Lösung abgenommen und 500 µl 70% Methanol zugegeben und für 3 min inkubiert.

Das MEMFA/Methanol-Gemisch wurde abgenommen und durch 100% Methanol ersetzt. Die Embryonen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die fixierten Embryonen wurden in tertiärem Butanol bei 40°C für 1h inkubiert. Anschließend wurden sie über Nacht in flüssigem Paraffin bei 60°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden dann die Embryonen in kleinen Blöcken aus Alufolie mit Paraffin eingebettet.

### **3.5.7 Herstellung von Paraffinschnitten**

Paraffineingebettete Objekte wurden auf Holzblöcke fixiert, getrimmt und mit einem Schlittenmikrotom (Messertyp C, Neigungswinkel 3°-4°) geschnitten. Die Schnittdicke betrug 7-10 µm. Die Schnitte wurden auf einem Objektträger mit Wassertropfen überführt und bei 52°C auf einer Heizplatte gestreckt. Das Wasser wurde wieder abgesaugt und die Schnitte wurden Luftgetrocknet (mind. 2h). Die getrockneten Schnitte wurden über eine Rotihistol/Alkoholreihe deparaffiniert und rehydriert: 3 x Rotihistol; 2 x EtOH; EtOH 90%; EtOH 70%; EtOH 50%; PBS (je 5min). Nach der Rotihistol/Alkoholreihe wurden die Schnitte entweder in Mowiol eingebettet oder direkt für weitere Methoden verwendet (z.B. TUNEL-Assay an Paraffinschnitten).

### **3.5.8 Micrococcus Nuklease Verdau von Chromatin**

Mittels der Micrococcus Nuklease wurde Chromatin aus isolierten Zellkernen verdaut, um den Zustand des Chromatins zu überprüfen (Menut et al., 1999). Die Micrococcus Nuklease besitzt die Fähigkeit, DNA zu schneiden. Dies geschieht aber nur an Positionen, an denen die Nuklease freien Zugang hat. Bei einem intakten Chromatin entstehen so ca. 146 bp-Fragmente oder ein Vielfaches davon und man kann diese DNA-Fragmente aufgetrennt in einem Agarosegel in einem typischen Leiter-Muster erkennen. Ist das Chromatin aber durch assoziierte Proteine unzugänglicher bzw. werden Bereiche zugänglicher, zum Beispiel durch Bindung von HMGN Proteine, die das Chromatin auflockern, oder erhöhte Transkriptionsaktivität, kann man im Vergleich zu einem „wildtypischen“ ein verändertes Verdauungsmuster erkennen.

#### **3.5.8.1 Zellkern-Isolation aus embryonalen Zellen (*Xenopus laevis*)**

Lösungen:

- Waschpuffer: 10 mM Tris (pH 7,4), 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 0,15 mM Spermine, 0,5 mM Spermidin, 0,3 M Sucrose, 4 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM PMSF (frisch dazugeben !)
- NucA: 10 mM HEPES 15 mM KCl, 1mM EDTA, 0,15 mM Spermine, 0,5 mM Spermidin, 0,5 mM DTT und 0,4% Triton-100

Durchführung:

Die Embryonen wurden in NucA-Puffer gewaschen, mit einer 100 µl-Spitze homogenisiert und in ein 800 µl Beckmann Röhrchen gegeben. In einer Sorvall-Zentrifuge wurden die homogenisierten Embryonen 20 min bei 17.000 rpm (4°C) zentrifugiert. Anschließend wurde mit einer Nadel (20G, gelb) vorsichtig die mittlere Phase abgenommen und die Spritze mit 500µl NucA nachgespült. Die Zellkernsuspension wurde nun in NucA 10 min bei 500-1000g zentrifugieren (4°C). Die Zellkerne waren in einem grauen Sediment, welches in 500 µl NucA resuspendiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführen wurde, in dem bereits 150 µl 12,5% Glycerin/NucA vorgelegt wurden. Erneut wurde 10 min bei 500-1000g zentrifugiert (4°C) und die pelletierten Kerne in 250 µl Waschpuffer resuspendiert. Nach zweimaligen waschen mit dem Waschpuffer wurden die Kerne in entsprechenden Volumen aufgenommen. Die Menge an isolierter DNA wurde bei einer Absorption von 260 nm in 1%igen SDS gemessen, wobei 27 Absorptionseinheiten 1mg DNA entsprechen.

### **3.5.8.2 Micrococcus Nuklease Verdau**

Lösungen:

- Stopplösung: 80 mM Tris/HCl; pH 8,0  
80 mM EDTA; pH 8,0  
2%SDS

Die isolierten Zellkerne wurden in Waschpuffer mit 1mM CaCl<sub>2</sub> und 0,7 U/µl Micrococcus Nuklease (MBI) bei Raumtemperatur 10 min verdaut. Die Reaktion wurde mit einer Stopplösung (0,5 mM EDTA) abgestoppt (gleiche Volumen wie Probe), gut gemischt und mit 1 µl RNase (10 mg/ml) 30 min bei 37°C verdaut. Anschließend wurde noch 1 h bei 37°C mit 0,5 µg/µl Proteinase K verdaut.

### **3.5.8.3 Phenol – Chloroform – Extraktion**

Lösungen: Phenol/Chloroform/Isoamylalkohohl: Phenol wurde mit gleicher Menge TE-Puffer (10 mM Tris pH8,0; 1mM EDTA) gemischt und nach dem zentrifugieren wurde die untere Phase abgenommen. Zu dieser Phase wurde die gleiche Menge an Chloroform: Isoamylalkohohl (24:1) dazugeben.

Die Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA-Lösungen diente der Entfernung von Proteinen. Die Proben wurden mit 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohohl gemischt und 5 min gevortext. Danach wurden die Proben 5 min bei 4°C mit 12.000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und anschließend wurde mit  $\frac{1}{10}$  3 M NaAcetat (pH 4,9) und 2, 5 fachen Volumen 100% EtOH p.a. über Nacht bei -20°C die DNA gefällt. Nach 20 min zentrifugieren bei 4°C mit 13.0000 rpm wurde das Pellet 2x mit 70% EtOH gewaschen und schließlich in 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> resuspendiert.

### 3.5.8.4 Nukleoprotein Gel Assay

Mit der Methode des Nukleoprotein Assay ist es möglich die Positionierung und die Mobilität der Nukleosomen näher zu untersuchen. Durch einen Verdau des Chromatins mit Micrococcus Nuklease wird, wie schon unter 3.5.8.2 beschrieben, die Zugänglichkeit des Chromatins für Proteine und die Positionierung der Nukleosomen überprüft. In diesem Assay wird das gesamte fragmentierte Chromatin in einem nativen Polyacrylamidgel gelelektrophoretisch aufgetrennt (nach Pennings, 1999).

Lösungen:

Für Micrococcus Nuklease Verdau:

- Waschpuffer: 10 mM Tris (pH 7,4), 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 0,15 mM Spermine, 0,5 mM Spermidin, 0,3 M Sucrose, 4 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM PMSF (frisch dazugeben !)
- Verdaupuffer: Waschpuffer mit 1 mM CaCl<sub>2</sub>
- Kernlysispuffer: 2 mM EDTA und 1 mM EGTA

Für Nukleoprotein Gel:

- Laufpuffer: 0,5 M TBE (pH 8,3)
- Polyacrylamidgel: 1,7 ml Acrylamid: Bisacrylamid (29:1)  
8,2 ml 0,5 M TBE (pH 8,3)  
100 µl 0,5 APS  
15 µl TEMED

Ausreichend für 2 Minigele mit dem Biorad Minigel-Tanksystem

- Beladungspuffer: 1 M TBE (pH 8,3)  
6% Ficoll  
0,2% Xylene Cyanol

Beladungspuffer und Probe wurde 1:1 gemischt, so dass eine Endkonzentration von 0,5 M TBE und 3% Ficoll vorhanden war.

Es wurden Zellkerne verwendet die wie unter 3.5.8.1 beschrieben aus embryonalen Zellen isoliert wurden. Diese wurden in Waschpuffer aufgenommen und bei 1000 g zentrifugiert und anschließend mit frischem Waschpuffer resuspendiert. Diese Prozedur wurde wiederholt und das Sediment wurde in Verdaupuffer aufgenommen. Der Verdau wurde mit verschiedenen Micrococcus Nuklease Konzentrationen durchgeführt (10, 20, 20 und 40 U/mg DNA). Bei 25°C (15 min) wurde das Chromatin verdaut und anschließend sofort für 10 min auf Eis gestellt. Danach wurde das verdaute Chromatin mit 16.000 g bei 4°C zentrifugiert (2 min) und der Überstand wurde abgenommen (S1-Fraktion, Mononukleosomen). Das Sediment wurde in Kernlysispuffer aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde erneut

mit 16.000 g bei 4°C 10 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser stellt die S2-Fraktion dar und soll Polynukleosomen und wenige Mononukleosomen beinhalten.

Die S1- und die S2-Fraktion wurde 1:1 mit Beladungspuffer gemischt. Das native Polyacrylamidgel wurde wie oben beschrieben hergestellt und die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 100 V, bis die Lauffront (Xylene Cyanol) das Gelende erreicht hatte. Das Gel wurde anschließend mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) 5min bei Raumtemperatur gefärbt, 30 min bei Raumtemperatur mit destilliertem Wasser wieder entfärbt und unter UV-Licht mit einer Polaroidkamera fotografiert.

### **3.5.9 Mikroinjektion**

#### **3.5.9.1 Herstellung von Injektionsnadeln**

Feine Glaskapillaren wurden über der Flamme eines Bunsenbrenners unter Drehen erhitzt. Schließlich wurde die Glaskapillare außerhalb der Flamme auseinandergezogen. Die dabei entstandenen zwei Teilstücke mit endständiger, fadenartiger Glasstruktur wurden mittels einer kleinen Flamme am Endstück zu einem Haken gebogen. An diesem Haken wurde, nachdem die vorbereitete Glaskapillare in einer Mikroschmiede (Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen) eingespannt wurde, ein Gewicht angehängt. Die Glaskapillare wurde mit einem glühenden Wolframdraht erhitzt und durch das Gewicht zur Injektionsnadel ausgezogen. Diese wurde unter einem Binokular auf Millimeterpapier markiert. Je Millimeter wurde eine Markierung angebracht. Das bei der Injektion abgegebene Volumen, der so geeichten Injektionsnadel, beträgt ca. 50 nl pro Eichmarkierung. Die markierte Injektionsnadel wurde abschließend unter einem Binokular mit Hilfe einer Uhrmacherpinzette vorsichtig am ausgezogenen Endstück aufgebrochen.

#### **3.5.9.2 Mikroinjektion in die Zygote von *Xenopus laevis***

Lösungen:

- 10 x MMR: 1 M NaCl; 20 mM KCl; 20 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 150 mM HEPES; pH 7,8
- 5% Ficoll / 5%MMR
- injizierte Proben : 1.) rekombinantes humanes HMGN1, HMGN2, HMGN1S20,E24, HMGN1S88C (siehe 2.2.5)  
2.) Morpholino-Oligos: XHMGN1 und XHMGN1 (GeneTool, LLC)  
3.) Afl II linearisiertes HMGN2-EGFP Plasmid

Durchführung:

Die befruchteten Eier, die bereits von der Gallerthülle befreit wurden, wurden in eine Injektionskammer überführt und dort in den Vertiefungen arretiert. Während der Injektion und mindestens 2 h danach wurden die Embryonen in 5% Ficoll / 5% MMR gehalten.

Dadurch wird ein Auslaufen des Zytoplasmas der Embryonen verhindert und die Wundheilung gefördert. Die Mikroinjektion wurde unter einem Stereomikroskop mit einem Mikromanipulator durchgeführt. Es wurden soweit nicht anders angegeben 3 ng Protein, 20 ng Morpholino-Oligonukleotide und 100 ng linearisierte Plasmid-DNA in einem Volumen von 25nl pro Embryo injiziert. Anschließend wurden die injizierten Embryonen bei 24°C gehalten.

### **3.5.9.3 Mikroinjektion in Oozyten von *Xenopus laevis***

Lösungen:

- Barth-Medium: 88 mM NaCl; 1 mM KCl; 2,4 mM NaHCO<sub>3</sub>; 1mM MgSO<sub>4</sub>; 0,3 mM CaNO<sub>3</sub>; 0,4 mM CaCl<sub>2</sub>; 10mM HEPES; pH 7,8
- OR2- Medium: 82,5 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 1,0 mM CaCl<sub>2</sub>; 1,0 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5 mM HEPES; pH 7,8
- injizierte Proben :
  - 1.) rekombinantes humanes HMGN1, HMGN2, HMGN1S20,E24, HMGN1S88C (siehe 2.2.5)
  - 2.) Morpholino-Oligos: XHMGN1 und XHMGN1 (GeneTool, LLC)

Nach der Präparation der Oozyten (siehe 3.5.5) wurden die Oozyten mit Hilfe von Uhrmacherpinzetten manuell defollikuliert und in Barth-Medium gesammelt. Zum Injizieren wurden die Oozyten in eine Injektionskammer überführt und in den Vertiefungen arretiert. Die Mikroinjektion wurde unter einem Stereomikroskop mit einem Mikromanipulator durchgeführt. Nach der Injektion wurden die Oozyten 12-48 h bei 16°C in Barth-Medium bzw. OR2-Medium inkubiert.

### **3.5.10 Quetschpräparate von Embryonen**

Es wurden *Xenopus* Embryonen verwendet, die entweder unbehandelt waren oder vorher im 1-Zellstadium mit linearisiertem Plasmid injiziert wurden. Nach Entfernen der Gallerthülle wurden die Embryonen auf einem Objektträger leicht mit einem Deckgläschen gequetscht. Die Präparate wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und das Deckgläschen mit einer Rasierklinge abgesprengt. Die Quetschpräparate wurden entweder einer Immunlokalisation unterzogen oder es wurde nur Hoechst 33258 dazugegeben und ohne Fixierung eingedeckelt. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem Zeiss Axiophot, ausgerüstet mit einer Digitalkamera (PixelFly), angefertigt.

### **3.5.11 Calcein Färbung**

Calcein ist ein fluoreszierendes Chromophor, welche spezifisch an verknöcherte Skelettstrukturen bindet. Mit dieser Methode ist es möglich, die Skelettstrukturen in der

Entwicklung von *Xenopus laevis* zu studieren. Dazu wurden die Embryonen (5 Tage alt) lebend in 0,2% Calcein für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 1-2 h in 5% MMR gewaschen. Die Auswertung der „gefärbten“ Embryonen wurde mittels eines Binokulars mit Fluorezenzlampe gemacht an dem eine Digitalkamera angebracht war.

### **3.5.12 Lampenbürstenchromosomenpräparation**

Lösungen:

- Barth-Medium: 88 mM NaCl; 1 mM KCl; 2,4 mM NaHCO<sub>3</sub>; 1mM MgSO<sub>4</sub>; 0,3 mM CaNO<sub>3</sub>; 0,4 mM CaCl<sub>2</sub>; 10mM HEPES; pH 7,8
- Isolationsmedium: 83 mM KCl; 17 mM NaCl; 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; pH 7,0
- Spreitungsmedium: 21 mM KCl; 4 mM NaCl; 1,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,9 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1mM MgCl<sub>2</sub>
- 3:1 – Medium: 75 mM KCl; 25 mM NaCl; 0,01 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,01 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM HEPES; pH 7,2
- 3:1 – Medium mit 0,1% Formaldehyd

Durchführung:

Die Präparation erfolgte nach Gall et al. (1991, 1998). Die Kerne der Oozyten wurden im entsprechenden Puffer manuell mit Uhrmacherpinzetten isoliert (Isolationsmedium bei *Xenopus* bzw. 3:1 – Medium bei *Pleurodeles*) und mit einer rundgeschmolzenen Glaspipette im entsprechenden Puffer gespült (Spreitungsmedium bei *Xenopus* bzw. 3:1 – Medium bei *Pleurodeles*). Die Kerne wurden in eine Chromosomenkammer, gefüllt mit Spreitungsmedium mit 0,1% Formaldehyd bei *Xenopus* bzw. 3:1 – Medium mit 0,1% Formaldehyd bei *Pleurodeles*, überführt. Als Chromosomenkammer dienten Plexiglasscheiben mit Bohrungen, die mit Paraffin auf Objektträgern fixiert wurden. Die Kernhülle wurde aufgerissen und der Kerninhalt 30 min auf Eis gespreitet. Die Chromosomen wurden auf Objektträger zentrifugiert (2500 rpm, 20 min, 10°C) und für 10 min in 70% EtOH bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Präparate 2 x 3 min in PBS gewaschen und ohne zu Trocken direkt für eine Immunfluoreszenz verwendet.

### **3.5.13 Whole-mount in situ-Hybridisierung von Embryonen**

Die Whole-mount in situ-Hybridisierung von Embryonen wurde nach einer modifizierten Methode von Harland (1991) durchgeführt.

Die Durchführung aller Inkubations- und Waschschrte erfolgte in einer 24-Loch-Zellkulturplatte unter leichtem Schütteln. Falls nicht anders angegeben, wurden pro Einzelloch 500µl der jeweiligen Lösung eingesetzt. Die Lösungen wurden bei den einzelnen

Schritten durch vorsichtiges pipettieren ausgetauscht. Alle Waschschrte und Inkubationen wurden, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeföhrt.

### 3.5.13.1 Fixierung der Embryonen

Lösungen:

- MEMFA: 0,1 M MOPS (pH 7,4); 2 mM EGTA; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 3,7% Formaldehyd (37%)
- Methanol

Die Embryonen wurden nach den jeweilig benötigten Stadien sortiert (Niewkoop und Faber; 1975) und in Eppendorfreaktionsgefäße überföhrt. In je 1 ml MEMFA-Lösung wurden die Embryonen für 1-2 h bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde wieder je 500 µl der MEMFA-Lösung abgenommen und 1 ml 70% Methanol zugegeben und für 3 min inkubiert. Das MEMFA/Methanol-Gemisch wurde abgenommen und durch 100% Methanol ersetzt. Die Embryonen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.5.13.2 Hybridisierung

Lösungen:

- MEMFA: 0,1 M MOPS (pH 7,4); 2 mM EGTA; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 3,7% Formaldehyd (37%)
- PBS: 140 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 6,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,4)
- PBSw: PBS mit 0,1% Tween-20
- TBS: 150 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl (pH 7,4)
- 20 x SSC: 3 M NaCl; 10,3 M Na-Citrat
- Hybridisierungslösung: 0,5 g Blocking Reagenz (Roche, Mannheim); 25 ml Formamid; 12,5 ml 20 x SSC wurde 30 min auf 65°C erhitzt und dann 9,75 ml H<sub>2</sub>O; 500 µl Hefe-t-RNA (100 mg/ml); 100 µl Heparin (50 mg/ml); 250 µl Tween-20 (20%ig); 500 µl CHAPS (10%ig) und 1250 µl EDTA (0,2M) dazugegeben
- 2 x SSC / 0,1% CHAPS
- 0,2 x SSC / 0,1% CHAPS

Die in Methanol fixierten Embryonen wurden zunächst mit einer sehr dünnen Wolframnadel perforiert, um die Zugänglichkeit der RNA-Sonde zu gewährleisten. In einer absteigenden Methanolreihe (75% / 50% / 25% Methanol in PBSw) wurden die Embryonen dann für je 5 min rehydriert und anschließend 3 x 5 min in PBSw gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen bei Raumtemperatur in 10 µg/ml Proteinase K in PBSw für exakt 25 min inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Embryonen kurz in PBSw gespült und weitere 2 x 5 min in PBSw gewaschen, um einen enzymatischen Abbau der Zelloberflächen abzustoppen. Diese enzymatische Perforierung erleichtert den RNA-Sonden die Diffusion bei der in situ-Hybridisierung. Die Embryonen wurden mit 4% Paraformaldehyd in PBSw für 20 min refixiert, kurz in PBSw gespült und anschließend 4 x 3 min mit PBSw gewaschen, um die

Fixierreaktion abzustoppen. Danach wurden die Embryonen für 3 min in 50% PBSw / 50% Hybridisierungslösung inkubiert und durch 100% Hybridisierungslösung wieder ausgetauscht. Diese wurde nach 3 min durch frische Hybridisierungslösung ersetzt und für 1 h bei 65°C in einem Wasserbad inkubiert, um endogene Phosphatasen zu inaktivieren, die bei der anschließenden Detektion einen starke Hintergrundfärbung verursachen würden. Anschließend wurden die Embryonen mit 500 µl frischer Hybridisierungslösung versetzt und für 2 h bei 55°C im Hybridisierungsofen prähybridsiert. Je 1 µl RNA-Sonde (entspricht ca. 100 ng RNA-Sonde) wurden mit je 3 µl Hybridisierungslösung 5 min bei 95°C im Heizblock denaturiert. Dann wurden je 100 µl Hybridisierungslösung auf 55°C vorgewärmt und zur denaturierten Sonde dazugegeben. Dieser Sonden / Hybridisierungslösungsmix wurde zu den 500 µl Hybridisierungslösung in der 24-Loch-Zellkulturplatte gegeben, was eine Endkonzentration der RNA-Sonde von 100 ng / 600 µl ergab. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 55°C im Hybridisierungsofen.

Nach der Hybridisierung wurden die Embryonen wie folgt gewaschen:

- 3 min bei Raumtemperatur in 50 % Hybridisierungslösung / 50% 2 x SSC / 0,1 % CHAPS
- 3 min bei Raumtemperatur in 2 x SSC / 0,1 % CHAPS
- 2 x 15 min bei 37°C in 2 x SSC / 0,1% CHAPS
- 3 min bei Raumtemperatur in 0,2 x SSC / 0,1 % CHAPS
- 2 x 15 min bei 60°C in 0,2 x SSC / 0,1 % CHAPS
- 3 min bei Raumtemperatur in 50% TBS / 50% 0,2 x SSC / 0,1 % CHAPS
- 5 min bei Raumtemperatur in TBS

### **3.5.13.3 Detektion gebundener Digoxigenin-markierten RNA-Sonden**

Lösungen:

- TBS: 150 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl; pH 7,4
- TBSx: TBS mit 0,1% Triton X-100
- Antikörperpuffer: 12,75 ml TBSx; 2,25 ml Ziegen Serum (hitzeinaktiviert, 30 min bei 56°C)
- Alkalischer Phosphatasepuffer (AP): 100 mM Tris, 100 mM NaCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 9,5
- NBT / BCIP: (siehe 3.2.17)
- Stopplösung: 100mM Tris, 1mM EDTA, pH 7,4
- BABB (Benzylalkohol: Benzylbenzoat): 2:1

Nach dem Waschen wurden die Embryonen bei Raumtemperatur für 3 min in TBSx inkubiert. Anschließend wurden sie für 2 h bei Raumtemperatur im Antikörperpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Der Antikörperpuffer wurde dann abgenommen und durch verdünnten Antikörper (anti-Dig-alkalische Phosphatase;

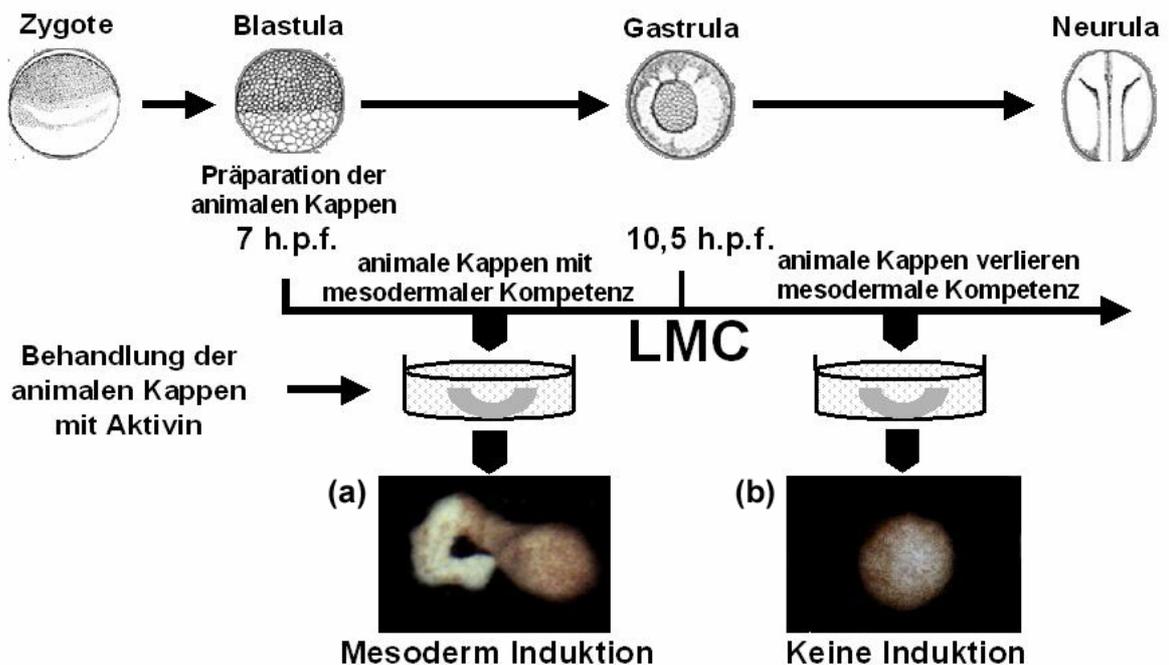
Verdünnung: 1:5000 in Antikörperpuffer) ersetzt. Die Embryonen wurden in dieser Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Antikörperlösung wurde durch TBSx ersetzt und die Embryonen 3 x je 10 min in TBSx bei Raumtemperatur gewaschen. Danach wurden die Embryonen für 15 min bei Raumtemperatur im alkalischen Phosphatasepuffer (AP) gewaschen. Anschließend wurde zu 10 ml AP-Puffer 66 µl NBT und 33 µl BCIP pipettiert. Von diesem Ansatz wurde in jedes Loch der 24-Loch-Zellkulturplatte 500 µl hinzugefügt und die Embryonen wurden für ca. 45 min im Dunkeln inkubiert. Die Farbreaktion wurde abgestoppt, wenn eine deutliche Färbung zu sehen war. Hierzu wurde die „Detektionslösung“ abgenommen und durch die Stopplösung ersetzt (2 x 5 min) und anschließend wurden die Embryonen über eine aufsteigende Methanolreihe (33%, 66%, 100%) dehydriert. Die Embryonen wurden in Methanol bei -20°C mehrere Wochen gelagert. Alternativ können die Embryonen auch durch Behandlung mit BABB (15 min inkubieren lassen) aufgehellt werden, so dass die Pigmentierung der Embryonen verschwinden. Die Dokumentation der Whole-mount Embryonen-Präparate erfolgte mittels einer computerunterstützten Digitalkamera (Pixera).

### **3.5.14 Animal Cap Assay**

Für diesen Biotest wurde die animale Kappe von *Xenopus laevis* Embryonen (Blastulae, NF8) mit einer Uhrmacherpinzette herauspräpariert. Ohne die Einwirkung von Induktionsfaktoren bildet die animale Kappe nur ein mit Cilien besetztes Epithel, es bleibt also Ektoderm. Gibt man jedoch zu den animalen Kappen einen Wachstumsfaktor (z.B. Activin aus der TGFβ-Familie), so wird das frühere Ektoderm zu Mesoderm induziert und bildet nun mesodermale Zellen wie beispielsweise Muskel- und Blutzellen aus. Diese Induktion kann aber nur in einem bestimmten Zeitfenster stattfinden. 10,5 Stunden nach der Befruchtung ist auch mit Zugabe von Activin keine Induktion mehr möglich und die Fähigkeit auf TGFβ- Wachstumsfaktoren zu reagieren geht verloren. Dies wird als „loss of mesodermal competence“ (LMC) bezeichnet (Jones und Woodland, 1987; Grainger und Gurdon, 1989).

Die Isolierten animalen Kappen wurden in Medium mit Activin (5ng/ml; R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) gegeben und 12 h darin inkubiert. Anschließend wurde die RNA aus den animalen Kappen isoliert (siehe 3.2.12). Dabei konnten aus 5 animalen Kappen ca. 3-6 µg RNA isoliert werden (5 animale kappen / 500 µl Trifast). Anschließend wurde eine RT-PCR mit den gewünschten Primern durchgeführt (siehe 3.2.1).



**Abb.15:** Schematische Darstellung des „animal cap assay“. Die animale Kappe besteht aus ektodermalen Zellen, die isoliert eine cilienbesetzte Epidermiskugel bildet, also Ektoderm bleibt (b). Gibt man aber innerhalb eines Induktionszeitfensters TGF $\beta$ - Wachstumsfaktoren (Aktivin) zum Kulturmedium, kommt es zur Induktion von Mesoderm (a). Die Mesoderminduktion ist durch morphologische Veränderungen, wie lange Auswüchse, deutlich erkennbar. Diese Induktion kann aber nur in einem bestimmten Zeitfenster stattfinden. 10,5 Stunden nach der Befruchtung ist auch mit Zugabe von Aktivin keine Induktion mehr möglich, was als „loss of mesodermal competence“ (LMC) bezeichnet wird (h.p.f. = hours post fertilisation).

### 3.5.15 Whole mount TUNEL Assay

Der TUNEL-Assay beruht auf dem Nachweis der DNA-Fragmentierung, wie sie während der Apoptose zu beobachten ist. In einem ersten Schritt wird ein Digoxigenin-markiertes dUTP durch die Terminale-Desoxynukleotidyl-Transferase (TDT) an die 3'-OH-Enden der DNA-Fragmente angehängt. Detektiert wird indirekt mittels einer alkalischen Phosphatase und NBT/BCIP als Substrat.

Lösungen:

- MEMFA: 0,1 M MOPS (pH 7,4); 2 mM EGTA; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 3,7% Formaldehyd (37%)
- MeOH
- PBS: 140 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 6,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,4)
- PBSw: PBS mit 0,1% Tween-20
- Proteinase K (10 $\mu$ g/ml)
- 4% Paraformaldehyd

- Hybridisierungslösung: 0,5 g Blocking Reagenz (Roche, Mannheim); 25 ml Formamid; 12,5 ml 20 x SSC wurde 30 min auf 65°C erhitzt und dann 9,75 ml H<sub>2</sub>O; 500 µl Hefe-t-RNA (100 mg/ml); 100 µl Heparin (50 mg/ml); 250 µl Tween-20 (20%ig); 500 µl CHAPS (10%ig) und 1250 µl EDTA (0,2M) dazugegeben
- Equilibrierungspuffer (Oncor Appligene, Heidelberg)
- Markierungslösung : 77 µl Reaktionspuffer; 7 µl 5xTDT-Puffer; 2,8 µl CoCl<sub>2</sub>; 24,2 µl H<sub>2</sub>O; 1 µl Terminale-Desoxynukleotidyl-Transferase (TDT); (je 56 µl pro Embryo)

Durchführung:

Die Formaldehyd-fixierten Embryonen (MEMFA) wurden mit einer Wolframnadel vorsichtig perforiert, damit die Zugänglichkeit für die Terminale-Desoxynukleotidyl-Transferase und das Digoxigenin-markiertes dUTP erhöht wird. Danach wurden die Embryonen durch Inkubation in 75%, 50% und 25% MeOH (je 5 min) rehydriert. Nach zweimaligem Waschen in PBSw für 5 min wurden die Embryonen 25 min mit Proteinase K (10 µg/ml) behandelt. Nach erneutem zweimaligem Waschen in PBSw für 5 min wurden die Embryonen 20 min in 4% Paraformaldehyd refixiert. Wiederrum wurden die Embryonen 3 mal in PBSw für je 5 min gewaschen, um dann 1 h bei 65°C in Hybridisierungspuffer inkubiert zu werden. Nach zweimaligem Waschen in PBSw für je 15 min, wurde die Markierung der 3'-OH-Enden der DNA-Fragmente durchgeführt. Dazu wurden die Embryonen 30 sec bei Raumtemperatur in Equilibrierungspuffer und anschließend 2 h bei 37°C in der Markierungslösung inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion mittels eines Stopp-Puffers durch 10 sec bei leichtem Schütteln und dann weitere 10 min Inkubation. Die Detektion wurde nach dem gleichen Protokoll wie bei der Whole mount in-situ Hybridisierung durchgeführt (siehe 3.5.13.3).

Nach der Detektion wurden die Embryonen über Nacht bei 4°C mittels MEMFA fixiert. Das Fixativ wurde am nächsten Tag durch Methanol ersetzt und die Embryonen konnten bei 4°C gelagert werden. Die Dokumentation der Präparate erfolgte mittels einer computerunterstützten Digitalkamera (Pixera). Zur weiteren Analyse wurden die Embryonen in Paraffin eingebettet (siehe 3.5.6) und Schnitte hergestellt (siehe 3.5.7), um die Verteilung der Apoptose-positiven Zellen zu analysieren. Diese wurde ebenfalls mittels einer computerunterstützten Digitalkamera (Pixera) fotografiert.

### **3.5.16 TUNEL-Test an Kulturzellen**

Lösungen:

- PBS: 140 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 6,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,4)
- PBS mit 0,1% Triton
- Equilibrierungspuffer (Oncor Appligene, Heidelberg)
- Markierungslösung : 77 µl Reaktionspuffer; 7 µl 5xTDT-Puffer; 2,8 µl CoCl<sub>2</sub>; 24,2 µl H<sub>2</sub>O; 1 µl Terminale-Desoxynukleotidyl-Transferase (TDT); (je 55 µl pro Deckglas)

- **Mowiol:** 10 g Mowiol (HOECHST, Frankfurt) in 40 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -freiem PBS (pH 8,0) 16 h rühren; 20 ml Glycerin zugeben und nochmals 16 h rühren; ungelöste Partikel abzentrifugieren und Überstand aliquotiert bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahren

Durchführung:

Der TUNEL-Assay für Zellkulturen wurde nach dem Protokoll aus dem Kit von Q-Biogene durchgeführt. Die Kulturzellen (Xenopus A6-Zellen) wurden auf runden Deckgläschen gezogen und zunächst 10 min bei Raumtemperatur mit 2 % Formaldehyd in PBS fixiert, dann 3 x 5 min in PBS gewaschen und schließlich 10 min mit 0,1 % Triton in PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Nach nochmaligem Waschen (3 x 5 min in PBS) wurden die Deckgläschen bei  $37^\circ\text{C}$  in eine Feuchtkammer gelegt und im Equilibrierungspuffer ca. 10 sec inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  in einer Markierungslösung, welche die Terminale-Desoxynukleotidyl-Transferase und Digoxigenin-markiertes dUTP beinhaltet, inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 0,5 M EDTA abgestoppt und in PBS gewaschen. Schließlich wurden die Zellen 30 min mit dem Zweitantikörper (ant-Digoxigenin-Texas-Red; 1:100) und Hoechst inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Zellen in Mowiol eingebettet und die Präparate wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert und die Immunfluoreszenzen mit einer digitalen Kamera (Zeiss Axiophot ausgestattet mit PixelFly) aufgenommen. Als Kontrollen wurden Zellen mit DNase I behandelt. Dadurch wird die DNA fragmentiert, wie es auch bei apoptotischen Zellen der Fall ist. Die Zellen, die als Positivkontrollen fungierten, wurden vor der Markierungsreaktion 5 min mit 0,2 U/ $\mu\text{l}$  DNase I behandelt und die Reaktion durch Zugabe von 0,5 M EDTA abgestoppt. Danach wurde, wie oben beschrieben, der TUNEL-Test fortgeführt.

### **3.5.17 Magnetische Kernresonanz (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)**

Allgemeines:

Die magnetische Kernresonanz (nuclear magnetic resonance, NMR), in seiner bildgebenden Anwendung auch als Kernspintomographie bekannt, liefert präzise Bilder aus dem Inneren biologischer Systeme und eignet sich aufgrund ihrer Nichtinvasivität gut zur Untersuchung von Embryonen. Organe wie Gehirn, Herz und Darm, aber auch Myotome können dargestellt werden, ohne dass der Embryo beschädigt wird. Dabei werden keine Röntgenstrahlen oder Radioaktivität eingesetzt, die Methode macht sich die magnetischen Eigenschaften von Wasserstoff-Atomkernen zu Nutze. Atomkerne besitzen eine Eigenschaft, die man Spin nennt. Unterschiedliche Kerne haben unterschiedliche Spins (Kern beim Wasserstoffatom, Spin  $\frac{1}{2}$ ). Bildlich kann man sich den Spin vorstellen wie einen kleinen Stabmagneten, der sich parallel zu einem statischen Magnetfeld ausrichtet ( $B_0$ ). Ein einzelner Spin mit Quantenzahl  $\frac{1}{2}$  hat die Option, sich parallel oder antiparallel zu  $B_0$  auszurichten. Durch thermische ungeordnete Bewegung stellt sich in einem Ensemble von Spins (also z.B. in

einer Flüssigkeit) ein Teil der Spins antiparallel zum äußeren Magnetfeld ein. Das Verhältnis von parallel zu antiparallel ausgerichteten Spins ist dabei nahezu 1, auf  $10^5$  bis  $10^6$  Spins kommt nur einer, der sozusagen überschüssig parallel ausgerichtet ist, die anderen gleichen sich alle auf. Es tragen also nur die Netto-Spins zu einer makroskopischen Magnetisierung bei, also nur etwa ein Millionstel aller Spins in der Probe. Dieses Verhältnis wird günstiger bei stärkeren Magnetfeldern, daher braucht man hohe Feldstärken.

Aufgrund des statischen Magnetfeldes präzedieren die Spins um die Magnetfeldrichtung (diese Bewegung kann man sich vorstellen wie die Bewegung eines Kreisels), und zwar mit einer Frequenz, die proportional zur Magnetfeldstärke ist (bei 1 T (Tesla) 42,57 MHz, bei 17,6 T 750 MHz). Strahlt man solch eine Frequenz mit einer Spule ein, lässt sich je nach Dauer des angelegten HF-Feldes (HF=Hochfrequenz) die Magnetisierung (die sich aus den Beiträgen aller Netto-Spins zusammensetzt) um einen gewissen Winkel kippen. Ist das HF-Feld abgeschaltet, wird die Magnetisierung wieder in ihre Gleichgewichtslage zurückkehren, also parallel zu  $B_0$ . Die Zeitkonstante, mit der dies passiert, ist eine charakteristische Relaxationszeit, nämlich  $T_1$ . Beobachtbar ist dieser Vorgang jedoch nicht direkt, da schon vorher die Kohärenz der Spins verloren geht, was auch als Dephasierung bezeichnet wird. Bildlich vorgestellt bröckelt die Magnetisierung aufgrund von Wechselwirkungen zwischen den Spins ab; sie ist ja nur aus Einzelbeiträgen der Spins zusammengesetzt. Diese Relaxationszeit wird als  $T_2$  bezeichnet. Typische  $T_1$ -Zeiten liegen zwischen 50 ms und 5 s (für Wasser), typische  $T_2$ -Zeiten bei 1 ms bis 1 s.

Die eigentliche Bildgebung funktioniert durch zusätzlich angelegte Magnetfeldgradienten, die einen linearen Zusammenhang zwischen Ort und Magnetfeld bewirken. Dadurch wird die Frequenz, mit der die Spins präzedieren, ortsabhängig. Durch eine mathematische Transformation (Fouriertransformation) lässt sich das NMR-Signal, das die rotierende Magnetisierung in der Spule induziert, nachdem der HF-Puls abgeschaltet wurde, von der Zeitdomäne in die Frequenzdomäne transformieren, was im 1D-Fall sofort das Profil der Probe zeigt. Kombiniert man Gradienten in allen drei Raumrichtungen, kann man 3D-Bildgebung betreiben. Durch gewebetypische Unterschiede in Spindichte und/oder Relaxationszeiten ergeben sich dann unterschiedliche Bildkontraste.

Die verwendete Feldstärke betrug bei unserem Magneten 17,6 T (Tesla). Feldstärken zum Vergleich: Erdmagnetfeld (0,05 mT); Permanentmagnet: (0,01-0,5 T); Klinische NMR-Magneten (1-3 T). Das benutzte Gradientensystem hat eine Gradientenstärke von 1 T/m. Durch stärkere Gradienten kann die Ortsauflösung erhöht werden. Begrenzt wird die Auflösung prinzipiell durch die Diffusion der Moleküle während des einzelnen NMR-Experiments. Sie liegt etwa in der Größenordnung bei 1  $\mu\text{m}$  bei freiem Wasser. Die Messungen wurden mit einem 17,6 T (750 MHz) Widebore Magnet und einer AVANCE Konsole (Bruker Analytik, Rheinstetten, Deutschland) durchgeführt.

Als Bildgebungssequenz wurde beim Xenopus-Embryo eine Spin-Echo Sequenz benutzt. Hierbei werden lokale Magnetfeldinhomogenitäten wieder ausgeglichen, der Bildkontrast ergibt sich hauptsächlich durch Unterschiede in  $T_2$  und Spindichte. Während die Spins dephasieren, wird ein zweiter HF-Puls gegeben (d.h. die Spule sendet für eine gewisse Zeit HF aus), der die dephasierenden Spins refokussiert, so dass sie nach einer charakteristischen Echozeit wieder eine Magnetisierung bilden, die detektiert werden kann. Diese ist im Vergleich zum ursprünglichen Signal jedoch durch  $T_2$ -Effekte reduziert, was eben zum Bildkontrast führt.

Durchführung:

Die Embryonen, die für diese Methode verwendet wurden, waren in Formaldehyd fixiert (MEMFA) und mit EtOH dehydriert (siehe 3.5.13.1). Vor der Durchführung der Messungen wurden die Embryonen über eine Ethanolreihe (90%, 70%, 50% EtOH) rehydriert und in PBS für die Messung eingesetzt. Zur Messung wurden die Embryonen in eine Glaskapillare mit einem Durchmesser von 2,5 mm in einer protonenfreien Flüssigkeit (FC-43, 3M Corp., St. Paul, MN) positioniert. Die Messungen wurden von Armin Porea (Experimentelle Physik V, Biophysik, Universität Würzburg) durchgeführt.

Verwendeten Messparameter:

➤ **Wildtyp-Embryo**

*Aquisitionsdaten:*

Matrixgröße	128 x 100 x 50
Sichtfeld	4,2 x 1,2 x 0,6 mm <sup>3</sup>
Ortsauflösung	33 x 10 x 10 μm <sup>3</sup>
Echozeit $T_E$ / Repetitionszeit $T_R$	5,8 ms / 600 ms
Messdauer	13,3 h

*Prozessierte Daten für Rekonstruktion mit Amira:*

Interpolierte Matrixgröße	256 x 128 x 128
---------------------------	-----------------

➤ **Morpholino-HMGN2-injizierter Embryo**

*Aquisitionsdaten:*

Matrixgröße	157 x 93 x 93
Sichtfeld	2,2 x 1,3 x 1,3 mm <sup>3</sup>
Ortsauflösung	14 x 14 x 14 μm <sup>3</sup>
Echozeit $T_E$ / Repetitionszeit $T_R$	5,4 ms / 600 ms
Messdauer	14,4 h

*Prozessierte Daten für Rekonstruktion mit Amira:*

Interpolierte Matrixgröße	256 x 128 x 128
---------------------------	-----------------

### ➤ HMGN1-injizierter Embryo

*Aquisitionsdaten:*

Matrixgröße	128 x 71 x 71
Sichtfeld	1,8 x 1,0 x 1,0 mm <sup>3</sup>
Ortsauflösung	14 x 14 x 14 µm <sup>3</sup>
Echozeit T <sub>E</sub> / Repetitionszeit T <sub>R</sub>	5,4 ms / 600 ms
Messdauer	12,5 h

*Prozessierte Daten für Rekonstruktion mit Amira:*

Interpolierte Matrixgröße	256 x 128 x 128
---------------------------	-----------------

### ➤ HMGN2-injizierter Embryo

*Aquisitionsdaten:*

Matrixgröße	128 x 86 x 86
Sichtfeld	1,8 x 1,2 x 1,2 mm <sup>3</sup>
Ortsauflösung	14 x 14 x 14 µm <sup>3</sup>
Echozeit T <sub>E</sub> / Repetitionszeit T <sub>R</sub>	5,6 ms / 600 ms
Messdauer	12 h

*Prozessierte Daten für Rekonstruktion mit Amira:*

Interpolierte Matrixgröße	256 x 128 x 128
---------------------------	-----------------

Die gemessenen Rohdaten wurden auf die Matrixgröße 256 x 128 x 128 interpoliert bevor die inverse Fouriertransformation durchgeführt wurde.

Die Auswertung der Daten und die Generierung der 3D-Bilder erfolgte mit der Software Amira™ (Version 3.0). Mit Hilfe des Segmentierungswerkzeuges in Amira™ wurden einzelne Organbereiche mit einer Farbkodierung versehen. Durch Setzung virtueller Schnitte konnten dann die einzelnen Organe näher analysiert werden.

## 4 Ergebnisse

Die Grundlage von zellulären Differenzierungsvorgängen und embryonalen Entwicklungsprozessen ist die differentielle Genaktivität, wobei die Struktur und die Zusammensetzung des Chromatins eine wichtige Rolle spielt. Als Chromatinbestandteile könnten die Nicht-Histon-Proteine HMGN1 und HMGN2 direkten Einfluss auf die Genexpression nehmen. Allerdings ist bis heute nur wenig über ihre Rolle bei Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen bekannt. Um ihre funktionelle Rolle während der Embryonalentwicklung besser zu verstehen, wurden die HMGN Proteine im Modellsystem *Xenopus laevis* näher untersucht.

### 4.1 Isolierung von *Xenopus* HMGN1 und *Xenopus* HMGN2 cDNAs

Zu Beginn wurden *Xenopus* EST-Datenbanken mit den bekannten Sequenzen des menschlichen HMGN1 und HMGN2-Gens nach Orthologen durchsucht. Dabei fanden sich zwei EST-Klone (11G6 und 11G2; Gawantka et al. 1998), die als gute Kandidaten für die entsprechenden *Xenopus* Orthologen erschienen. Diese EST-Sequenzen dienten zur Generierung von Primer-Paaren, die für die Isolierung der *Xenopus* HMGN1 und *Xenopus* HMGN2 cDNA eingesetzt wurden. Die für eine RT-PCR verwendete Gesamt-RNA wurde aus Embryonen im Stadium NF 25 isoliert. Die *Xenopus* HMGN2 cDNA konnte mittels einer RT-PCR vollständig erhalten werden. *Xenopus* HMGN1 dagegen wurde mittels eines 3'RACE isoliert und konnte ebenfalls vollständig erhalten werden. Die PCR-Produkte wurden mit TOPO TA Cloning<sup>®</sup> kloniert und anschließend sequenziert. Beide cDNAs kodierten Aminosäuresequenzen, die große Übereinstimmungen mit entsprechenden Sequenzen von Mensch, Maus und Huhn aufweisen (Abb.16). Die Übereinstimmungen waren insbesondere in den funktionellen Domänen wie dem Kernlokalisierungssignal (nuclear localisation signal; NLS), der nukleosomalen Bindungsdomäne und der C-terminalen Chromatin Aktivierungsdomäne (chromatin-unfolding domain; CHUD) besonders auffällig. Die cDNAs wurden als Werkzeuge für weitere Experimente benutzt. Die *Xenopus* cDNAs wurden als XHMGN1 (Acc# AJ272074) und XHMGN2 (Acc# AJ272075) bezeichnet.

Zusätzlich wurde die Gesamt-RNA aus Oozyten isoliert und eine RT-PCR mit Primerpaaren für XHMGN1 und XHMGN2 (entsprechenden Primer und PCR-Bedingungen sind im Anhang beschrieben) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mit TOPO TA Cloning<sup>®</sup> kloniert und anschließend sequenziert. Eine Analyse der Sequenzen ergab, dass die aus Oozyten-RNA amplifizierten XHMGN-Sequenzen zu 100% mit den embryonalen Sequenzen übereinstimmen. Folglich ist anzunehmen, dass keine Oozyten-spezifische Variante von XHMGN Proteinen existiert.

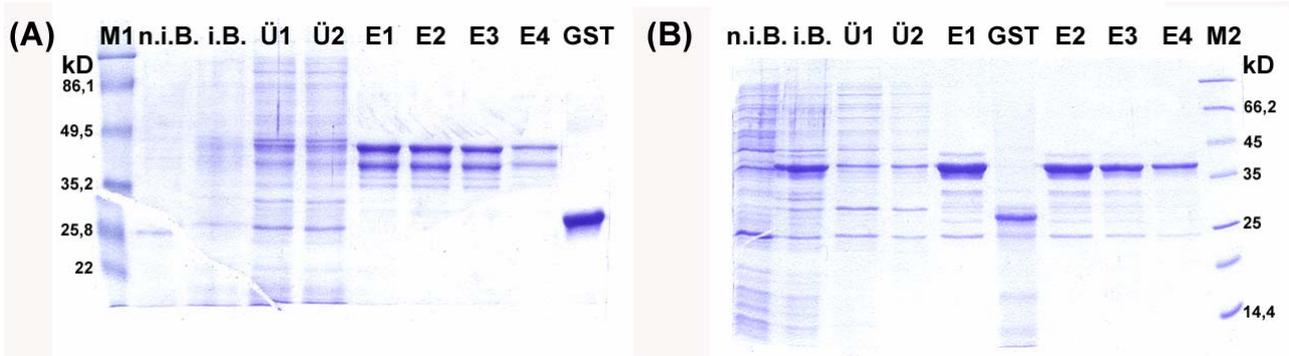


wurde dann in Western Blots die Spezifität und Effektivität der Antikörper überprüft. Zusätzlich wurden die Antikörper auf ihre Tauglichkeit in der Immunfluoreszenz überprüft.

### 4.2.1.1 Herstellung und Aufreinigung der Gluthation-S-Transferase-Fusionsproteine XHMGN1 und XHMGN2

Der Vorteil eines Gluthation-S-Transferase Fusionsproteins ist, dass diese Proteine nach ihrer Expression in Bakterien leicht über Glutathion-Säulen aufgereinigt werden können.

Plasmide der in TOPO 2.1 klonierten PCR-Produkte von XHMGN1 und XHMGN2 wurden mit EcoRI geschnitten, die Fragmente über ein Agarose-Gel aufgetrennt und das XHMGN1- bzw. XHMGN2-Fragment aus dem Gel extrahiert. Diese Fragmente wurden in den EcoRI verdauten pGEX-5X-1 Expressionsvektor einkloniert und die Orientierung durch Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierung bestätigte die gewünschte Orientierung der klonierten cDNAs, sowie ein durchgehendes Leseraster für die Expression von GST-HMGN1 und GST-HMGN2 Fusionsproteinen.



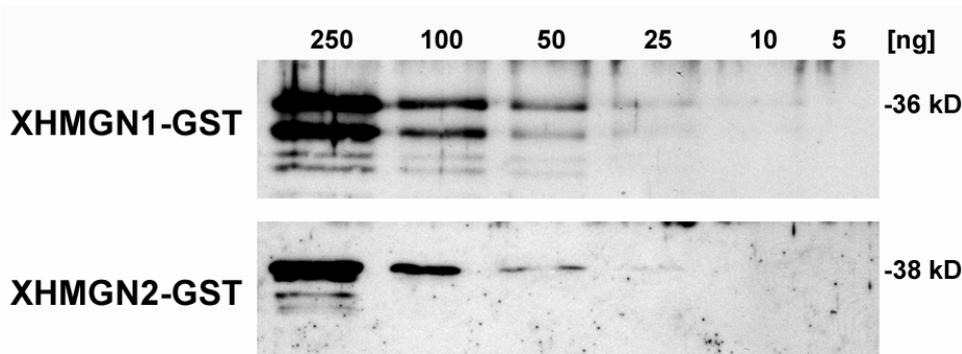
**Abb.17:** Überprüfung der Aufreinigung von GST-HMGN1 (A) und GST-HMGN2 (B) im Polyacrylamidgel. Es wurden Proben der einzelnen Aufreinigungsschritte gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt, um die Effektivität der Proteinreinigung zu überprüfen. Aufgetragen wurden nicht induzierte Bakteriensedimente (n.i.B.) und induzierte Bakteriensedimente (i.B.), der Durchlauf mit ungebundenem Fusionsprotein (Ü1) und der Durchlauf eines Waschschrittes (Ü2). Das gereinigte, von der Glutathion-Sepharose eluierte GST-HMGN1 bzw. GST-HMGN2 wurde in den Spuren E 1-4 aufgetragen. Zur Kontrolle wurde auch nur GST aufgetragen. GST-HMGN1 (E 1-4) konnte aus dem Bakterienlysat einer IPTG-induzierten Bakterienkultur aufgereinigt werden, liegt aber teilweise degradiert vor (A). GST-HMGN2 (E 1-4) konnte ebenfalls aus dem Bakterienlysat einer IPTG-induzierten Bakterienkultur aufgereinigt werden (B). Die Molekulargewichte der jeweiligen Molekulargewichtsmarker (MBI) sind angegeben.

Die überprüften Konstrukte wurden in BL21Codon<sup>+</sup> Bakterien transformiert. Dieser Bakterienstamm wird speziell für die Expression von Proteinen verwendet, da er vermehrt seltene Aminosäuren synthetisiert, sowie weniger Proteasen besitzt, die endogen exprimierte Proteine degradieren können. Die Expression der GST-Fusionsproteine wurde mit IPTG induziert. Um die GST-Fusionsproteine gereinigt zur Verfügung zu haben, müssen diese aus den Bakterienlysaten isoliert werden. Dazu wurden die GST-Fusionsproteine mit Hilfe von

Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Die Effektivität der bakteriellen Expression und die Qualität der Aufreinigung wurden mit einem Polyacrylamidgel überprüft (Abb.17).

#### 4.2.1.2 Überprüfung der Antikörper gegen XHMGN1 und XHMGN2 im Western Blot

Zur Überprüfung der Antikörper auf ihre Tauglichkeit im Western Blot wurden verschiedene Konzentrationen der aufgereinigten GST-Fusionsproteine XHMGN2-GST und XHMGN1-GST in SDS-Probenpuffer gelöst und in einem SDS-Acrylamidgel (15%) gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf einen Nitrozellulosefilter transferiert. Die Nitrozellulosemembran wurde mit den zu testenden *Xenopus*-spezifischen Antikörpern XHMGN1 bzw. XHMGN2 (Verdünnung von 1:2000) inkubiert. Die verwendeten Antikörper wurden, wie unter 4.2. beschrieben, gegen ein Peptid aus einem *Xenopus*-spezifischen Bereich von XHMGN1 bzw. XHMGN2 in Kaninchen erzeugt.



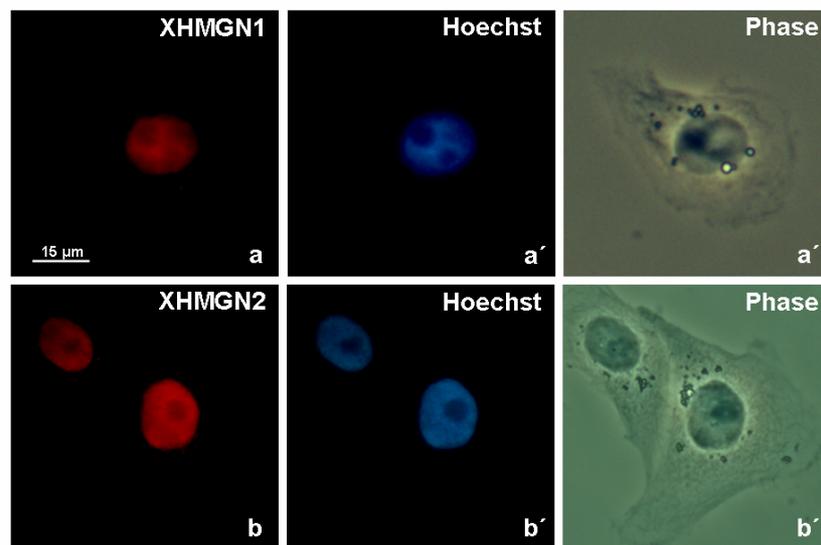
**Abb.18:** Western Blot zur Überprüfung der Antikörper gegen XHMGN1 und XHMGN2. Das Serum S120 erkennt spezifisch das XHMGN1-GST Fusionsprotein bis zu einer Konzentration von 10 ng (obere Reihe). Das Serum S388 erkennt spezifisch das XHMGN2-GST Fusionsprotein bis zu einer Konzentration von 25 ng (untere Reihe). Beide Seren sind demnach für Westernblotanalysen geeignet.

Das gegen XHMGN1 gerichtete Serum S120 erkennt spezifisch das XHMGN1-GST Fusionsprotein bis zu einer Konzentration von 10 ng. Auch das gegen XHMGN2 erzeugte Serum S388 erkennt spezifisch das XHMGN2-GST Fusionsprotein. Hier konnte ein Signal bis zu einer Konzentration von 25 ng XHMGN2-GST Protein noch detektiert werden (Abb. 18). Beide Seren wurden deshalb für weitere Immunblotanalysen verwendet.

#### 4.2.1.3 Überprüfung der Antikörper gegen XHMGN1 und XHMGN2 Protein in der Immunfluoreszenz

Zusätzlich wurden die Seren S120 und S388 auf ihre Eignung in Immunfluoreszenzanalysen getestet. Dafür wurden *Xenopus* Nierenepithelkulturzellen (A6-Zellen) verwendet und mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz getestet.

Dazu wurden die Zellen mit 2% Paraformaldehyd in PBS 3 min fixiert und anschließend in 0,1% Triton in PBS 10 min permeabilisiert. Nach mehrmaligem Waschen in PBS wurden die Zellen mit den Seren S120 und S388 (Verdünnung 1: 150) überschichtet und 30 min in einer Feuchtkammer inkubiert. Daraufhin wurden unspezifisch gebundene Antikörper durch 15 min Waschen in PBS entfernt. Anschließend wurden die A6-Zellen mit einem gegen Kaninchen IgGs gerichteten sekundären Texas Red-gekoppelten Antikörper (Verdünnung 1:150) für 20 min inkubiert. Zusätzlich wurde zur Gegenfärbung der DNA der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 nach 10 min zugegeben (Inkubationszeit 10 min). Dann wurde 3 mal 10 min in PBS gewaschen, die Zellen wurden in Mowiol eingebettet und die Präparate mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert und die Immunfluoreszenzen mit einer digitalen Kamera (Zeiss Axiophot ausgestattet mit PixelFly) dokumentiert (Abb. 19). Deutlich kann man die spezifische Kernfluoreszenz von XHMGN1 und XHMGN2 erkennen. Somit zeigte die Immunfluoreszenz-Mikroskopie, dass beide Seren auch für die Immunfluoreszenzanalyse geeignet sind.



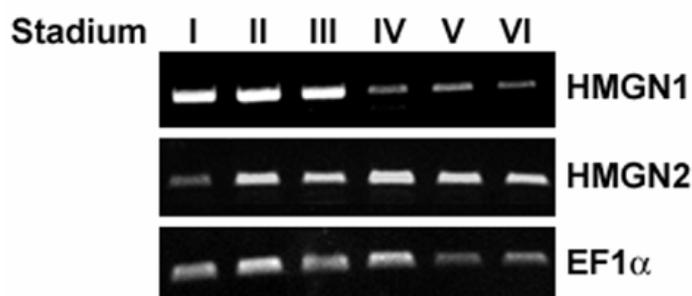
**Abb.19:** Immunfluoreszenzanalyse von *Xenopus*-A6-Zellen mit dem Seren S120 (anti-XHMGN1; a-a'') und S388 (anti-XHMGN2; b-b''). Die Immunfluoreszenz mit anti-XHMGN1 bzw. anti-XHMGN2 ist in a bzw. b gezeigt, die entsprechende Hoechst-Färbung in a' bzw. b', das entsprechende Phasenkontrastbild in a'' bzw. b''. Deutlich kann man die spezifische Kernfluoreszenz erkennen, die zeigt, dass beide Seren auch für Immunfluoreszenzanalysen geeignet sind.

### 4.3 Die Expression von *XHMGN1* und *XHMGN2* während der Oogenese und der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*

#### 4.3.1 Expression von *XHMGN1* und *XHMGN2* während der Oogenese

##### 4.3.1.1 Analyse der *XHMGN*-Expression auf mRNA-Ebene durch RT-PCR

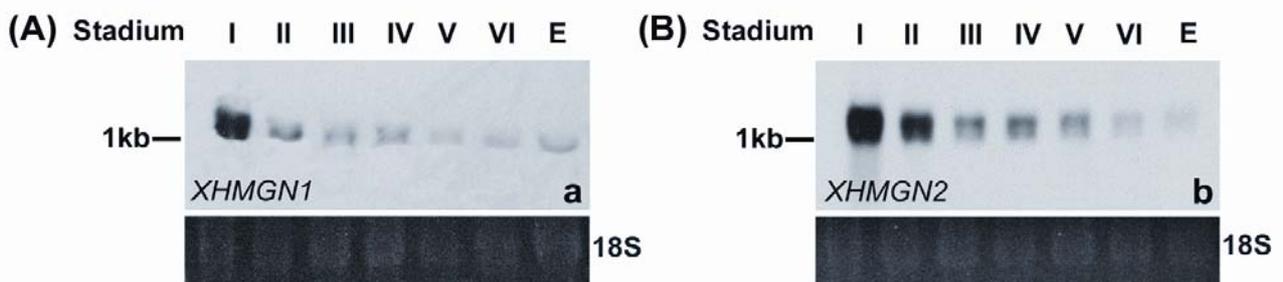
Um einen Überblick über die Expression von *HMGN1*- bzw. *HMGN2*-Genen während der Oogenese von *Xenopus laevis* zu erhalten, ist die Methode der RT-PCR eine elegante und schnelle Variante. Zur Gewinnung von Oozyten für eine anschließende RNA-Isolierung wurde ein kleines Stück Ovar 2 h bei 37°C in 0,2% Kollagenase inkubiert. Dadurch werden Follikelepithelien, welche die Oozyten umgeben, gelöst und die Oozyten verschiedener Reifestadien vereinzelt. Die Stadien (I, II, III, IV, V und VI) der vereinzelt Oozyten wurden nach Dumont (1972) bestimmt und gesammelt. Zur Maturation von Oozyte wurden zerkleinerte Ovarstücke in 10µg/ml Progesteron in Barth-Medium für 2h und weitere 12h in Barth Medium ohne Hormon bei 20°C inkubiert, anschließend manuell defollikuliert, und maturierte Oozyten (Eier) isoliert. Aus den so getrennt gesammelten Oozytenstadien und maturierten Oozyten wurde mittels der TriFast-Methode die RNA isoliert und ihre Menge photometrisch bestimmt. Für die Reverse Transkription wurde jeweils 1 µg RNA eingesetzt. Anschließend wurde eine PCR mit Primerpaaren für *XHMGN1*, *XHMGN2*, die aus den jeweils bekannten kodierenden Regionen ausgewählt wurden (*XHMGN1*; Acc# AJ272074 und *XHMGN2*; Acc# AJ272075; entsprechenden Primer und PCR-Bedingungen sind im Anhang, Oligonukleotide, beschrieben) durchgeführt. Als Kontrolle der Reversen Transkription wurde die *EF1α*-Expression mittels PCR überprüft. Sowohl *HMGN1* mRNA wie auch *HMGN2* mRNA konnten in allen Oozytenstadien nachgewiesen werden (Abb. 20).



**Abb.20:** RT-PCR Analyse verschiedener Oozytenstadien (I, II, III, IV, V und VI, wie angezeigt). Mittels PCR wurde die Expression der *XHMGN1*-, *XHMGN2*-Gene und als Kontrolle der Reversen Transkription das konstitutiv exprimierte *EF1α* untersucht. Sowohl *XHMGN1* mRNA wie auch *XHMGN2* mRNA kommen in allen Oozytenstadien vor. Da jeweils 1 µg der gesamten RNA für die RT-Reaktion eingesetzt wurde und sich das Verhältnis von mRNA zu rRNA im Verlauf der Oogenese verändert, lässt das Ergebnis keine Aussage über die Quantität der mRNAs zu.

#### 4.3.1.2 Analyse der *XHMGN*-Expression auf mRNA-Ebene im Northern Blot

Um das Ergebnis der RT-PCR zu überprüfen, wurde eine Northern Blot Analyse durchgeführt. Dazu wurde wie oben beschrieben die RNA aus verschiedenen Oozytenstadien (I, II, III, IV, V und VI) und maturierten Oozyten isoliert. Zur Northern Blot Analyse wurden je 10 µg RNA in einem Formaldehyd-Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA wurde anschließend durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht, fotografiert und durch einen Northern-Transfer auf eine Nylonmembran gebunden. Die Nylonmembran wurde dann mit spezifischen Digoxigenin-markierten *XHMGN1*- bzw. *XHMGN2*-Sonden bei 55°C über Nacht hybridisiert. Gebundene Sonden wurden durch ECL detektiert. Der Northern Blot zeigt deutlich, dass *XHMGN* mRNAs in allen Oozytenstadien und Eiern vorhanden sind (Abb. 21). Der offensichtliche mit der Reifung der Oozyten korrelierende Abfall der Signalstärke muss nicht notwendigerweise bedeuten, dass die Menge der *XHMGN* mRNAs während der Oozytenreifung abnimmt. Da gleiche RNA-Mengen pro Spur aufgetragen wurden, werden die relativen Mengen der mRNA durch die im Verlauf der Oogenese akkumulierenden ribosomalen RNAs zu Gunsten dieser verschoben. Dies führt konsequenterweise zu einer geringeren Signalstärke, die mit der Oozytenreifung korreliert.



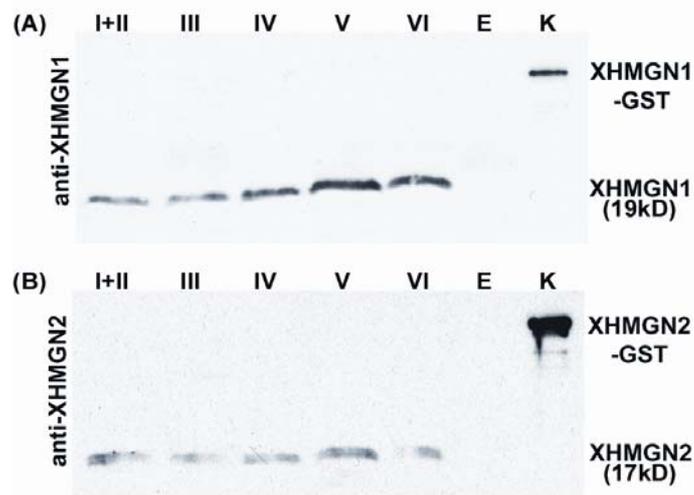
**Abb.21:** Northern Blot mit jeweils 10 µg Gesamt-RNA pro Spur. Hybridisiert wurde der Blot mit Digoxigenin-markierter Antisense-HMGN1-RNA (A) bzw. Antisense-HMGN2-RNA (B). Das jeweilige Bild darunter zeigt die 18s-RNA des korrespondierenden ethidiumbromidgefärbten Agarosegels als Beladungskontrolle. Die jeweiligen Oozytenstadien sind über der Spur benannt. Spur E enthält RNA aus maturierten Oozyten. Der Northern Blot zeigt, dass *XHMGN1* mRNA und *XHMGN2* mRNA während der gesamten Oogenese und in Eiern nachweisbar sind.

#### 4.3.1.3 Analyse der *XHMGN*-Expression auf Proteinebene im Western Blot

Zum Nachweis der *XHMGN1* bzw. *XHMGN2* Proteine während der Oogenese wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Die Oozyten wurden, wie unter 4.3.1.1. beschrieben, defollikoliert und die einzelnen Oozytenstadien gesammelt. HMG-Proteine lassen sich durch Extraktion mit 5% Perchlorsäure (PCA) anreichern. Für die PCA-Extraktion der HMGN-Proteine wurden 80 Oozyten Stadium I und II, jeweils 30 Oozyten Stadium III, IV, V und VI sowie 30 maturierte Oozyten (siehe 4.3.1.1) verwendet. Die Oozyten wurden dann direkt in 5%igem PCA homogenisiert und die in 5% PCA löslichen Proteine aufgereinigt. Die so

gewonnenen PCA-löslichen Oozytenproteine wurden in SDS-Probenpuffer gelöst, in einem SDS-Acrylamidgel (15%) gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf einen Nitrozellulosefilter transferiert. Die Nitrozellulosemembran wurde mit *Xenopus*-spezifischen XHMG1 S120 (Abb. 22A) bzw. XHMG2 S388 (Abb. 22B) Antikörper (Verdünnung von 1:2000) inkubiert.

Wie in Abbildung 22 deutlich zu sehen ist, sind die Proteine XHMG1 bzw. XHMG2 in allen Oozytenstadien nachweisbar. Murierte Oozyten enthalten dagegen keine detektierbaren Mengen an XHMG1 und XHMG2 Proteinen. Dies lässt darauf schließen, dass XHMG1 Proteine während der Eireifung abgebaut und nicht mehr synthetisiert werden.

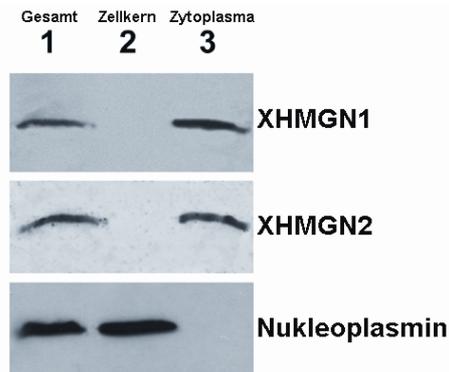


**Abb.22:** Western Blot Analyse von PCA-löslichen Proteinen aus verschiedenen Oozytenstadien. Die PCA-löslichen Proteine wurden im SDS-Acrylamidgel (15%) gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde dann zunächst mit einem gegen XHMG1 gerichteten (A), und nach entfernen des gebundenen Antikörpers (Strippen) mit einem gegen XHMG2 gerichteten Antikörper (B) inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper betrug 1:2000. Die verschiedenen Oozytenstadien sind jeweils über der Spur angegeben. Es wurden PCA-lösliche Proteine aus 80 Oozyten von Stadium I und II und jeweils 30 Oozyten von Stadium III, IV, V und VI aufgetragen. Spur E enthält die PCA-löslichen Proteine aus 30 Progesteron-behandelten, murierten Oozyten. In Spur K wurden zur Kontrolle der Antikörperreaktion 100 ng GST-XHMG1 Protein bzw. 250 ng GST-XHMG2 Protein aufgetragen.

#### 4.3.1.4 Subzelluläre Verteilung von HMG1 und HMG2 Proteinen in *Xenopus*-Oozyten

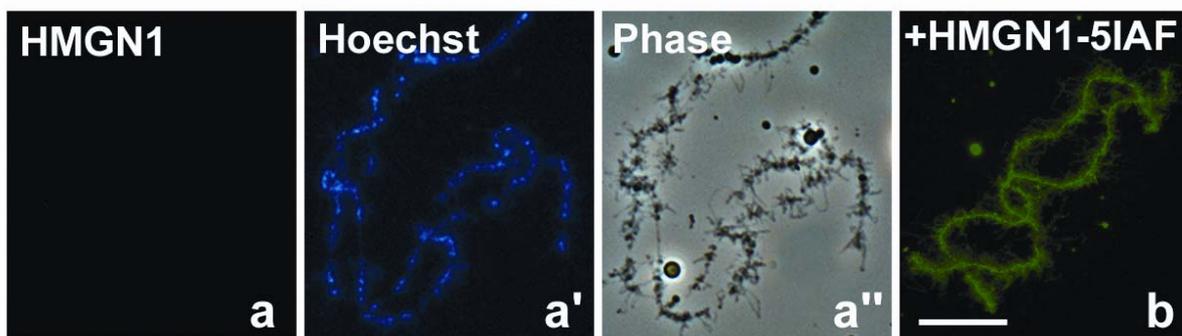
Um die Verteilung von HMG1 und HMG2 Proteinen analysieren zu können, wurde eine Westernblot-Analyse an fraktionierten Oozyten durchgeführt. Dazu wurden die Zellkerne von 30 Oozyten im Stadium V und VI manuell vom Zytoplasma getrennt und die in 5% PCA löslichen Proteine der Oozytenkerne und der Zytoplasma-Äquivalente gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde nacheinander mit gerichteten Antikörpern gegen XHMG1 (Verdünnung von 1:2000), anti-XHMG2 (Verdünnung von 1:2000) und mit gegen Nukleoplasmin gerichteten Antikörpern

analysiert. Nukleoplasmin ist ein in Oozytenkernen angereichertes saures Kernprotein (Moreau et al., 1986) und dient hier als Kontrolle der Kern-Zytoplasma-Trennung.



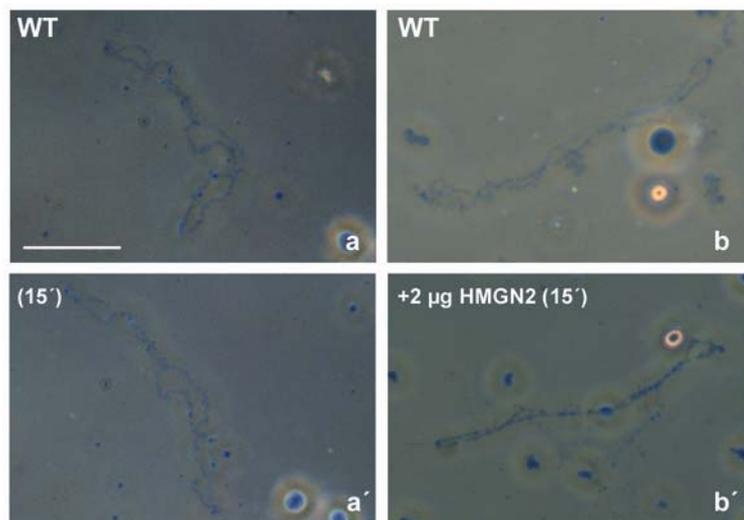
**Abb.23:** Western Blot Analyse von PCA-löslichen Proteinen aus 30 defollikulierten Oozyten (Stadium V bzw. VI, Spur 1), 30 manuell isolierte Zellkerne (Spur 2) und 30 Zytoplasma-Äquivalente (Spur 3). Die PCA-löslichen Proteine wurden im SDS-Acrylamidgel (15%) gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde dann nacheinander mit anti-XHMGN1, anti-XHMGN2 und anti-Nukleoplasmin inkubiert. Im Zellkern ist weder XHMGN1 noch XHMGN2 detektierbar. Die ausschließliche Anwesenheit von Nukleoplasmin im Zellkern zeigt, dass die manuell isolierten Zellkerne intakt blieben.

Wie in Abb. 23 zu sehen ist, findet man XHMGN1 und XHMGN2 nur im Zytoplasma und nicht in den Zellkernen. Das Kernprotein Nukleoplasmin war dagegen in den Kernen nachweisbar und zeigte, dass das zytoplasmatische Vorkommen der XHMGN Proteine nicht durch Verunreinigung von Kernproteinen verursacht wurde. Um zu zeigen, ob nicht doch geringe Mengen der XHMGN Proteine im Zellkern lokalisieren und an den Chromosomen assoziiert vorliegen, wurde eine wesentlich empfindlichere Immunfluoreszenzanalyse an gespreiteten Lampenbürstchenchromosomen (LBC) durchgeführt.



**Abb.24:** Immunfluoreszenz Analyse von *Xenopus* Lampenbürstchenchromosomen (LBC). Die Immunfluoreszenz mit anti-XHMGN1 ist in a gezeigt, die entsprechende Hoechst-Färbung in a' und das entsprechende Phasenkontrastbild in a''. 5ng des fluoreszenz-markierten rekombinanten menschlichen HMGN1 Proteins (HMGN1-88c-5IAF) wurden in den Zellkern von Oozyten injiziert. Zwei Stunden nach der Injektion wurden die Kerne isoliert, die Lampenbürstchenchromosome präpariert und unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Während in der Immunfluoreszenz kein HMGN1 Protein nachweisbar ist (a), kann injiziertes fluoreszenz-markierte HMGN1 Protein an LBC binden und nachgewiesen werden (b).

Mit dieser Methode konnten jedoch ebenfalls keine XHMGN Proteine an Lampenbürstenchromosomen detektiert werden (Abb. 24a). Wie gezeigt wurde, sind HMGN Proteine dynamisch und nur transient mit dem Chromatin assoziiert (Phair und Misteli 2000). Um deshalb auszuschließen, dass HMGN Proteine im Verlauf der LBC-Präparation verloren gegangen sind, wurden Oozyten mit je 5ng eines fluoreszenzmarkierten rekombinanten HMGN1 Proteins (HMGN1-88c-5IAF) in den Kern injiziert. 2 Stunden nach der Injektion wurden die LBC präpariert und am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Wie die LBC Fluoreszenz in Abbildung 24b zeigt, binden die injizierten Proteine an die Chromosomen. Dieses Experiment zeigt aber auch, dass LBC gebundene HMGN Proteine auch nach einer LBC-Spreitung am Chromatin nachweisbar sind und nicht verloren gehen. Somit bestätigt die negative Immunfluoreszenz in Abbildung 24a das Fehlen der HMGN Proteine im Oozytenkern. Bemerkenswert ist, dass die Bindung exogener HMGN Proteine die Struktur der LBC nicht beeinflusst. Dies ist aber nur bei einer Injektion von bis zu 5 ng HMGN2 in die Oozyten der Fall. Höhere Konzentrationen können sehr wohl die Struktur der LBC beeinflussen. Nach einer Präparation der LBC aus *Xenopus* wurden die LBC mit 2 $\mu$ g HMGN2 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und eine HMGN-abhängige Retraherung der Schleifen konnte beobachtet werden (Abb. 25). Die stark erhöhte HMGN Menge führte in diesem Fall also nicht zu einem Öffnen des Chromatins, sondern sogar zum gegenteiligen Effekt, also einer Kondensierung des Chromatins. Eine extreme Erhöhung der HMGN Proteinmenge verändert somit die Zusammensetzung des gesamten Chromatins so, dass es zu einer globalen Umstrukturierung des Chromatins kommen kann.



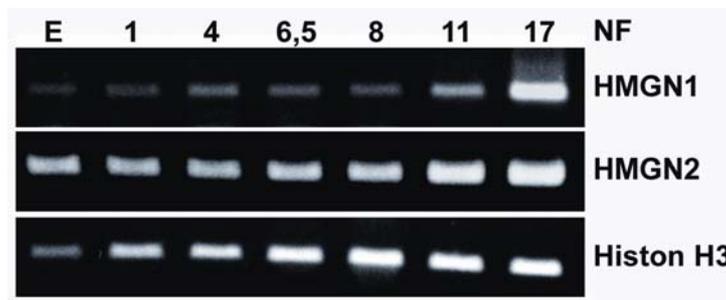
**Abb.25:** Phasenkontrastbilder von *Xenopus* Lampenbürstenchromosomen (LBC). Gezeigt werden LBC nach Präparation aus unbehandelten Oozyten (WT; a, b). Die LBC wurden in Spreitungspuffer ohne Formaldehyd inkubiert und nach der Dokumentation wurden 2  $\mu$ g HMGN2 Protein zum Puffer hinzugefügt und für 15 min inkubiert. Danach wurde das gleiche Chromosom erneut dokumentiert. Eine HMGN-abhängige Retraherung der LBC-Schleifen ist zu erkennen (b'). Die stark erhöhte HMGN Menge führte in diesem Fall also nicht zu einem Öffnen des Chromatins, sondern sogar zum gegenteiligen Effekt, also einer Kondensierung des Chromatins. Bei einem gleichermaßen inkubierten Präparat ohne HMGN-Zugabe blieben die LBC unverändert (a, a'). Eichstrich: 20  $\mu$ m.

### 4.3.2 Expression von HMGN1 und HMGN2 während der frühen Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*

Die Ergebnisse, dass in Oozyten HMGN Proteine nur im Zytoplasma vorkommen und in maturierten Oozyten gänzlich fehlen, zeigen, dass HMGN Proteine nicht maternal gespeichert werden. Maternale HMGN Proteine können daher nicht am Aufbau des Chromatins im frühen Embryo beteiligt sein. Um zu analysieren welche Rolle das zygotische HMGN in der frühen Embryonalentwicklung spielt, wurde das Expressionsmuster von *XHMGN1* und *XHMGN2* in frühen Embryonen von *Xenopus laevis* näher untersucht.

#### 4.3.2.1 Analyse der *XHMGN*-Expression auf mRNA-Ebene durch RT-PCR

Um einen ersten Überblick über die Expression von *XHMGN1* und *XHMGN2* in frühen Embryonalstadien von *Xenopus laevis* zu erhalten, wurde eine RT-PCR-Analyse durchgeführt. Dazu wurden Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien gesammelt und nach Nieuwkoop und Faber (1975) bestimmt: unbefruchtetes Ei, 1-Zell-Stadium (NF1), 8-Zell-Stadium (NF4), frühe Blastula (NF6,5), späte Blastula (NF8), Gastrula (NF11) und Neurula (NF17). Aus je 2 Embryonen dieser Entwicklungsstadien wurde mittels der TriFast-Methode die RNA isoliert und ihre Menge photometrisch bestimmt. Für die Reverse Transkription wurde jeweils 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Anschließend wurde wieder eine PCR mit Primerpaaren für *XHMGN1* und *XHMGN2* durchgeführt (PCR-Bedingungen siehe Anhang). Als Kontrolle für die Reversen Transkription wurde die Expression von *Histon H3* überprüft.

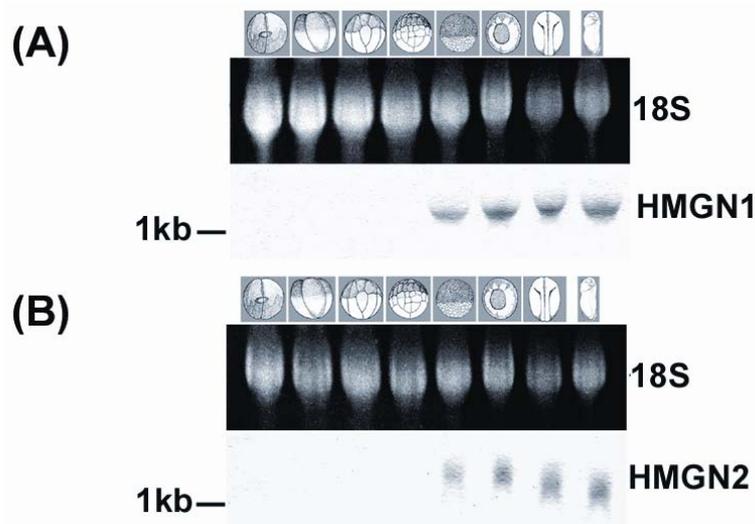


**Abb.26:** RT-PCR Analyse verschiedener Embryonalstadien: Unbefruchtetes Ei (E), 1-Zell-Stadium (NF1), 8-Zell-Stadium (NF4), frühe Blastula (NF6,5), späte Blastula (NF8), Gastrula (NF11), Neurula (NF17). Es wurden mittels einer PCR die *XHMGN1*-, *XHMGN2*-Gene und als Kontrolle der Reversen Transkription die Expression von *Histon H3* untersucht. Sowohl *XHMGN1* mRNA wie auch *XHMGN2* mRNA kommen in allen Stadien vor.

Sowohl *XHMGN1* mRNA wie auch *XHMGN2* mRNA konnten in Eiern und allen Embryonalstadien gefunden werden (Abb. 26). Da die RT-PCR eine sehr sensitive Methode ist, könnten *XHMGN1*- und *XHMGN2*-mRNAs auch nur in sehr geringen Mengen vorhanden sein. Auszuschließen ist eine Kontamination durch genomische DNA, da durch die Introns ein wesentlich größeres Fragment mit dem eingesetzten Primerpaar amplifiziert worden wäre, als das tatsächlich amplifizierte Fragment aus der mRNA als Matrize.

#### 4.3.2.2 Analyse der *XHMGN*-Expression auf mRNA-Ebene im Northern Blot

Um quantitative Aussagen über die Expression von *XHMGN1*- bzw. *XHMGN2*-mRNAs im Verlauf der frühen embryonalen Entwicklung machen zu können wurden Northern Blot Analysen durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Embryonalstadien (2-Zell-Stadium, 4-Zell-Stadium, 16-Zell-Stadium, frühe Blastula (NF 6,5), Blastula (NF 8), Gastrula (NF 11), Neurula (NF 19) und Embryos (NF25/26) nach Nieuwkoop und Faber (1975) bestimmt und gesammelt. Die Gesamt-RNA von je 5 Embryonen wurde dann mittels der TriFast-Methode isoliert, im DNA-Agarosegel gelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Anschließend wurde die Nylonmembran mit einer *Xenopus*-spezifischen Antisense *XHMGN1* bzw. *XHMGN2* RNA-Sonde, die Digoxigenin markiert war, über Nacht bei 55°C hybridisiert. Detektiert wurde der Blot mit einer alkalischen Phosphatase und dem Substrat NBT/BCIP. Sowohl *XHMGN*-mRNA als auch *XHMGN2*-mRNA konnten erst ab dem Blastulastadium detektiert werden, das heißt die Transkripte sind tatsächlich erst ab diesem Zeitpunkt in größeren Mengen vorhanden (Abb. 27A, B).



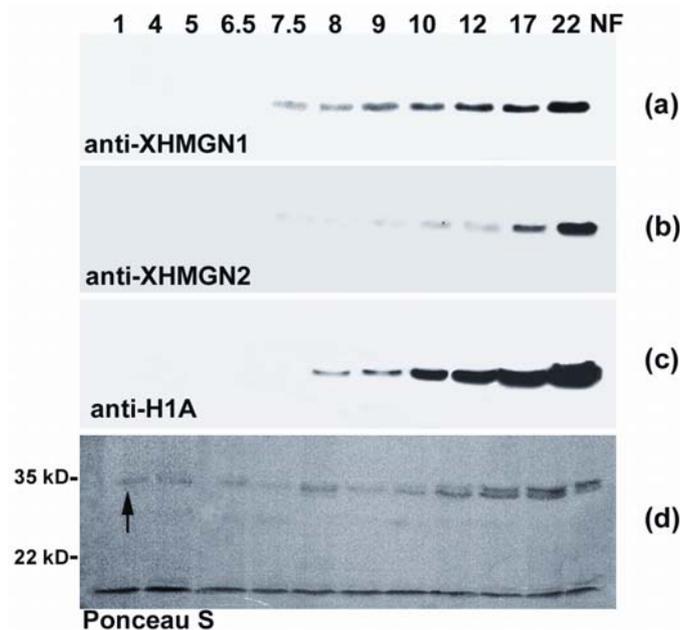
**Abb.27:** Northern Blot zur Analyse der *XHMGN*-Expression während der frühen embryonalen Entwicklung von *Xenopus laevis*. Hybridisiert wurde der Blot mit einer Digoxigenin-markierten Antisense-*XHMGN1*-RNA-Sonde (A) bzw. Antisense-*XHMGN2*-RNA-Sonde (B). In jeder Spur wurde RNA aus 5 Embryonen wie folgt aufgetragen: 2-Zell-Stadium, 4-Zell-Stadium, 16-Zell-Stadium, frühe Blastula (NF 6,5), Blastula (NF 8), Gastrula (NF 11), Neurula (NF 19) und Embryos (NF25/26). Als Beladungskontrolle dient die 18s ribosomale RNA des ethidiumbromidgefärbten Agarosegels. Beide *HMGN* Transkripte können erst ab dem Blastulastadium in größeren Mengen detektiert werden.

#### 4.3.2.3 Expressionsanalyse der *XHMGN* Proteine während der frühen Embryogenese

Mit Hilfe der unter 4.2. beschriebenen Antikörper wurde die Expression der *XHMGN* Proteine während der frühen Embryogenese untersucht. Dazu wurden sowohl Western-Blot-Analysen embryonaler Proteine als auch immunhistochemische Analysen an Paraffinschnitten durchgeführt.

#### 4.3.2.3.1 Analyse der XHMGN-Expression im Western Blot

Zur Analyse der XHMGN Proteine wurden je 15 Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien gesammelt und mit 5% PCA extrahiert. Analysiert wurden die PCA löslichen Proteine der Embryonalstadien NF1, 4, 5, 6.5, 7.5, 8, 9, 10, 12, 17 und 22 (bestimmt nach Nieuwkoop und Faber, 1975). Die PCA löslichen Proteine wurden gefällt, in SDS-Probenpuffer aufgenommen und in einem 15%igen SDS-Acrylamidgel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und der Transfer mit Ponceau S überprüft. Die Nitrozellulosemembran wurde dann nacheinander mit anti-XHMGN1 (S120), anti-XHMGN2 (S388) und als Kontrolle mit anti-Histon H1A inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mit Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörpern und ECL detektiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 gezeigt.



**Abb.28:** XHMGN-Expressionsanalyse im Western Blot. PCA-lösliche Proteine aus je 15 Embryonen wurden im SDS-Acrylamidgel (15%) gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die gleiche Membran wurde nacheinander nach zwischenzeitlichem „Strippen“ mit einem gegen *Xenopus* XHMGN1 (a), XHMGN2 (b) und Histon H1A gerichteten Antikörper inkubiert. Analysiert wurden PCA-lösliche Proteine der Embryonenstadien NF1, 4, 5, 6.5, 7.5, 8, 9, 10, 12, 17 und 22. Als Beladungskontrolle ist die Ponceau S gefärbte Nitrozellulosemembran gezeigt (d). Die Proteinbanden bei 33 kD (Pfeil) repräsentieren Nucleoplamin (Hock et al. 1993). Die unteren Banden bei ca. 13 kD repräsentieren sehr wahrscheinlich PCA extrahierte nukleosomale Histone (Kleinschmidt et al. 1983).

XHMGN Proteine waren erst ab dem Blastulastadium (NF7,5) nachweisbar (Abb. 28) und ihr Erscheinen korreliert mit der Transkriptionsaktivierung des embryonalen Genoms während der Midblastula Transition. Ein ähnliches Expressionsmuster wurde für die somatische Histon H1A-Variante beschrieben (Dimitrov et al., 1993; Hock et al., 1993; Dworkin-Rastl et al., 1994). In Übereinstimmung mit diesen Studien wurde in der Kontrolle Histon H1A erst nach der Blastula detektiert (Abb. 28). Die Ponceau S Färbung der Nitrozellulose (Abb. 28) zeigte die gleichmäßige Beladung des Gels mit PCA löslichen embryonalen Proteinen.

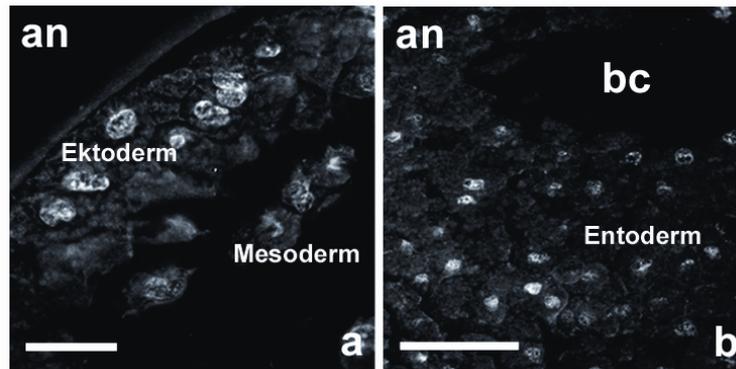
#### **4.3.2.4 Gewebsspezifische Expression von XHMGN1 und XHMGN2**

Die Northernblot-Experimente (4.3.2.2.) legen nahe, dass die *XHMGN*-Expression stadienspezifisch reguliert wird. Als nächstes stellt sich die Frage, ob neben dieser stadienspezifischen Expression auch eine gewebsspezifische Expression von *XHMGN1* und *XHMGN2* erfolgt. Dies wurde mittels Immunfluoreszenz Mikroskopie an Paraffinschnitten, Whole-mount *in situ*-Hybridisierungen und der RT-PCR-Methode mit verschiedenen Gewebeproben untersucht.

##### **4.3.2.4.1 Immunfluoreszenz Mikroskopie an Paraffinschnitten**

Als erste Methode zur Überprüfung der möglichen gewebsspezifischen Verteilung von XHMGN wurde eine Immunfluoreszenz Mikroskopie an Paraffinschnitten durchgeführt, um XHMGN Proteine in verschiedenen Keimblättern zu lokalisieren.

Zur Paraffineinbettung wurden den Embryonen die Vitellinmembran entfernt und mindestens 3 Stunden in Carnoy (75% Methanol und 25% Essigsäure) bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden sie 2 h in 100% Ethanol bei Raumtemperatur dehydriert, 1 Stunde bei 40 °C mit tertiären Butanol behandelt und anschließend über Nacht in Paraffin bei 60 °C inkubiert. Nach dem Einbetten der Embryonen in Paraffinblöcke, wurde von den Präparaten 7 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger überführt und getrocknet. Die getrockneten Schnitte wurden über eine Rotihistol-/Alkoholreihe deparaffiniert, rehydriert und mit einer Antigen „Unmasking“ Lösung behandelt. Nun wurden die Paraffinschnitte mit Serum S388 (*XHMGN2*; Verdünnung 1:150) über Nacht inkubiert, anschließend gewaschen und die gebundenen Antikörper mit einem Texas-Red-gekoppelten sekundären Antikörper detektiert. Die Präparate wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert und die Immunfluoreszenzen mit einer digitalen Kamera aufgenommen (Zeiss Axiophot ausgestattet mit PixelFly).

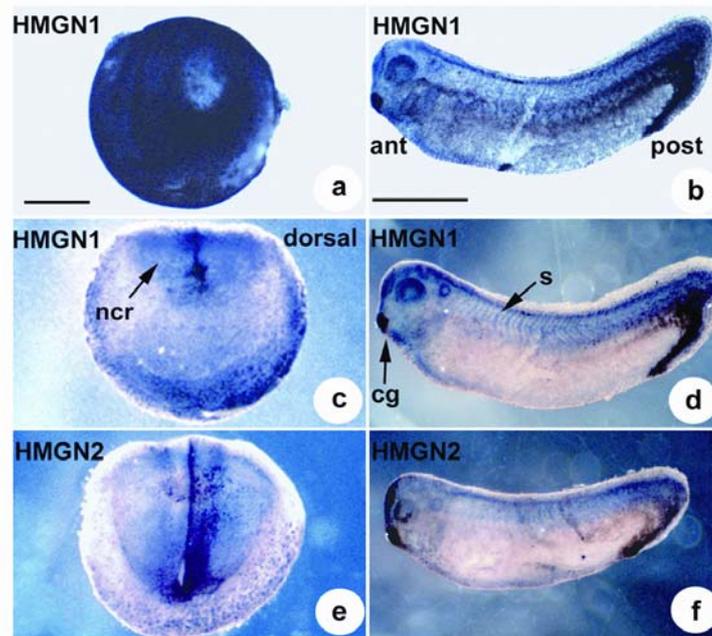


**Abb.29:** Immunfluoreszenz Mikroskopie an Paraffinschnitten von *Xenopus* Embryonen im Blastulastadium mit einem spezifischen XHMGN2 Antikörper (S388; a, b). In allen Zellkernen des Gastrulastadiums ist XHMGN2 detektierbar (a: Ektoderm, Mesoderm; b: Entoderm). Blastocoel (bc); Animaler Bereich (an). Eichstrich: 20µm (a); 60µm (b).

Die immunhistochemische Analyse bestätigte die Ergebnisse der Westernblotanalyse. Eine positive Immunfluoreszenz konnte nur in Embryonen ab dem Blastulastadium gefunden werden. Exemplarisch ist eine Immunfluoreszenz mit anti-XHMGN2 bei Gastrulambryonen in Abb. 29 gezeigt. Eine gewebsspezifische Verteilung von XHMGN kann man nicht erkennen, da ab der Gastrula eine Fluoreszenz in allen Kernen der verschiedenen Keimblätter zu finden war (Abb. 29a, b). Mit dieser Methode kann man über die Mengen an HMGN Proteinen in den verschiedenen Keimblättern keine Aussage treffen.

#### 4.3.2.4.2 Analyse der *XHMGN*-Expression durch Whole-mount *in situ*-Hybridisierung

Eine aussagekräftige Methode, um eine gewebsspezifische *XHMGN*-Expression im *Xenopus*-Embryo zu untersuchen, ist die Whole-mount *in situ*-Hybridisierung. Die Whole-mount *in situ*-Hybridisierung von Embryonen wurde nach einer modifizierten Methode von Harland (1991) mit einer Digoxigenin-markierten *XHMGN1* bzw. *XHMGN2*-RNA-Sonde durchgeführt. Die Formaldehyd-fixierte Embryonen wurden zunächst 2 Stunden bei 55°C prähybridisiert. Die Hybridisierung mit 100 ng Digoxigenin-markierter Sonde pro Embryo erfolgte über Nacht bei 55°C. Nach dem Waschen der Embryonen wurde die Sonde mit einem alkalisch-Phosphatase-gekoppelten Antikörper (Verdünnung: 1:5000) detektiert. Die gebundenen Antikörper wurden dann mit NBT/BCIP nachgewiesen. Nach der Detektion wurden die Embryonen in BA/BB (Benzylalkohol/Benzylbenzoat 2:1) aufgehellt und im Durchlicht unter einem Binokular fotografiert (Abb. 30a, b) oder direkt im Auflicht (Abb.30c-d) aufgenommen. Die Aufnahmen wurden mit einer Digitalkamera (Pixera) aufgenommen.



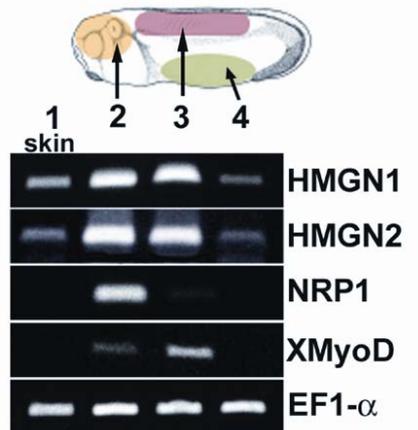
**Abb.30:** Whole-mount *in situ*-Hybridisierung mit einer XHMG1-Antisense-RNA-Sonde (a, b, c, d) bzw. XHMG2-Antisense-RNA-Sonde (e, f). Es sind Embryonen im Neurula Stadium (NF13; a, c, e) bzw. im Schwanzknospenstadium (b, d, f) gezeigt. Zu sehen sind Hellfeldaufnahmen von BA/BB-behandelten Embryonen (a, b) und Aufsichtaufnahmen von BA/BB-unbehandelten Embryonen (c-f). *XHMG1* und *XHMG2* werden in allen Geweben exprimiert, aber eine besonders erhöhte Expression ist in mesodermalen und neuroektodermalen Regionen zu finden. Abkürzungen: ncr, neural crest; s, Somiten; cg, Haftdrüse; ant, anterior; post, posterior. Eichstrich: 0,5 mm (a); 1,3 mm (b).

Die Whole-mount *in situ*-Hybridisierungen ergaben, dass *XHMG1*- und *XHMG2*-Gene in allen Geweben von Post-Blastula Embryonen exprimiert werden. (Abb. 30a, b). Die stärkere Farbreaktion in Somiten und im Kopfbereich (Abb. 30c-f) deutet eine erhöhte Expression in mesodermalen und neuroektodermalen Regionen an. Im Kopfbereich zeigte sich vor allem in der Ohrplakode, den Augen und im Gehirn eine starke Farbreaktion. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass *XHMG1* bzw. *XHMG2* gewebsspezifisch exprimiert werden.

#### 4.3.2.5 Analyse der gewebsspezifischen Expression mittels RT-PCR

Um die Ergebnisse aus der Whole-mount *in situ*-Hybridisierung zu überprüfen, wurden verschiedene Gewebeproben aus Embryonen (NF 25 / 26) herauspräpariert. Wie aus der Skizze in Abbildung 31 zu entnehmen ist, wurden Gewebeproben von der Haut (Ektoderm), vom Gehirn bzw. Kopf (Neuroektoderm), von Somiten (Mesoderm) und vom Bauch (Entoderm) entnommen. Aus diesen Gewebeproben wurde die RNA isoliert, eine Reverse Transkription durchgeführt und anschließend mittels PCR die Expression der *XHMGN*-Gene untersucht. Die Reinheit der Gewebeproben wurde mit der Expression spezifischer Markergene kontrolliert. Als Markergen für Kopf/Gehirn diente das pan-neurale exprimierte Gen *NRP1*, für Mesoderm diente der Mesoderm-spezifisch exprimierte Transkriptionsfaktor

*XMyoD*. Die Expression von *EF1-α* als ubiquitär exprimiertes Gen diente zur Kontrolle der Reversen Transkription.



**Abb.31:** RT-PCR aus verschiedenen Gewebeproben von Embryonen (NF 25 / 26). Wie aus der Skizze zu sehen ist, wurden Gewebeproben von der Haut (Ektoderm), vom Gehirn bzw. Kopf (Neuroektoderm), von Somiten (Mesoderm) und vom Bauch (Endoderm) entnommen. Die RNA wurde aus den Geweben isoliert und mittels einer RT-PCR wurde die Expression von HMGN1 (1. Reihe) und HMGN2 (2. Reihe) analysiert. Die Expression des pan-neuralen Markers *NRP1* (3. Reihe) und dem mesodermalen Marker *XmyoD* (4. Reihe) wurde benutzt, um nachzuweisen, dass die Gewebstücke auch ihrem Ursprung entsprechen. Als Kontrolle wurde der konstant exprimierte Translations Elongations Faktor *EF1-α* (5. Reihe) ausgewählt.

Der pan-neurale Marker *NRP1* ist nur in der Gewebeprobe Gehirn / Kopf zu finden. Auch der mesodermale Marker *XmyoD* zeigt die stärkste Bande in den Somiten. Dies bestätigt, die gelungene Anreicherung dieser Gewebe. Auffällig war die erhöhte Expression von *XHMGN1* und *XHMGN2* in den Regionen Mesoderm (Somiten) und Neuroektoderm (Gehirn, Kopf) im Vergleich zu Ektoderm (Haut) und Entoderm (Bauch) (Abb. 31). Damit wurde die durch Whole-mount *in situ*-Hybridisierungen gefundene gewebsspezifische Expression der *XHMGN*-Gene bestätigt.

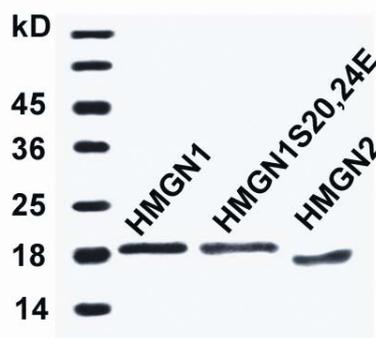
#### 4.4 Manipulation der HMGN-Proteinmengen während der frühen Embryonalentwicklung

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigten, dass die Expression der *XHMGN*-Gene während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* reguliert wird. Dies deutet an, dass *XHMGN* Proteine eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* spielen können. Um dies zu überprüfen, wurden die HMGN Proteinmengen in *Xenopus* Embryonen manipuliert und die Konsequenzen für die Embryonalentwicklung untersucht. Dazu wurden Zygoten von *Xenopus laevis* entweder mit rekombinanten HMGN Proteinen (Überexpression) oder mit Morpholino-Antisense-Oligonukleotiden (knock-down) mikroinjiziert und deren Entwicklung mit der Normalentwicklung verglichen.

#### 4.4.1 Injektion rekombinanter Proteine

Um zunächst zu überprüfen, ob eine regulierte XHMGN Proteinmenge eine Voraussetzung für eine korrekte Entwicklung bei *Xenopus laevis* ist, wurde rekombinantes HMGN1 und HMGN2 Protein in verschiedenen Konzentrationen in die Zygoten injiziert. Für die Versuche standen hochreine rekombinante menschliche HMGN Proteine (hHMGN) zur Verfügung. Wie schon in der Einleitung beschrieben, sind HMGN Proteine hoch konserviert. Alle funktionellen Domänen, das zweigeteilte Kernlokalisierungssignal, die nukleosomale Bindungsdomäne und die Chromatin Aktivierungsdomäne sind in allen Spezies nahezu identisch (siehe Abb. 16). Zudem haben andere Arbeiten gezeigt, dass alle benötigten Faktoren für einen Zellkernimport von menschlichem HMGN Proteinen im *Xenopus* Eiextrakt vorhanden sind und dass das menschliche rekombinante HMGN1 und HMGN2 Protein an Chromatin im Eiextrakt binden kann (Trieschmann et al., 1995a; Hock et al., 1998b). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die menschlichen Proteine auch in *Xenopus* funktionell sind.

Als Kontrolle wurde zusätzlich ein punktmutiertes Protein verwendet, bei dem zwei für die Chromatinbindung wichtige Serine durch Glutaminsäure ersetzt wurden (HMGN1S20,24E). Durch diese Punktmutationen ist die HMGN1S20,24E-Variante nicht mehr funktionell, da die Bindung an die Nukleosomen unterbleibt (Prymakowska-Bosak et al., 2001). Die gereinigten Proteine wurden von M. Bustin zur Verfügung gestellt. Die Reinheit der verwendeten Proteine wurde zunächst in einem SDS Polyacrylamidgel (15%), welches Coomassie gefärbt wurde, überprüft (Abb. 32).

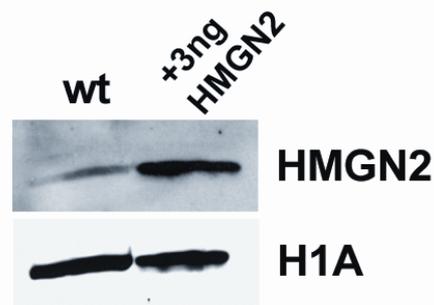


**Abb.32:** Coomassie-gefärbtes SDS Acrylamidgel (15%). Es wurde je 1  $\mu$ g der jeweiligen rekombinanten Proteine aufgetragen. Gezeigt wird die Reinheit der Proteine HMGN1, HMGN2 und HMGN1S20, 24E. Die Molekulargewichte des Molekulargewichtsmarkers (MBI) sind links angegeben.

#### 4.4.2 Stabilität der injizierten Proteine im Embryo

Als nächstes wurde überprüft, ob die in die Zygote injizierten Proteine auch in späteren Embryonalstadien für eine erhöhte HMGN Menge sorgen können, oder ob diese im Verlauf der Entwicklung degradiert werden. Dazu wurden die Proteine von je 30 Gastrulae, die jeweils entweder mit 3 ng rekombinantem menschlichem HMGN oder mit PBS injiziert

waren, mit 5% PCA extrahiert. Die PCA-löslichen Proteine wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Westernblot analysiert. Zum gleichzeitigen Nachweis des injizierten humanen Proteins und der endogenen XHMGN Proteine wurde ein Antikörper verwendet, der gegen die konservierte nukleosomale Bindungsdomäne gerichtet ist und so beide Proteine erkennen kann. HMGN1 wird von diesem Antikörper allerdings schwächer erkannt (Hock et al., 1998). Als Kontrolle für die Beladung des Gels wurde zusätzlich Histon H1A detektiert.

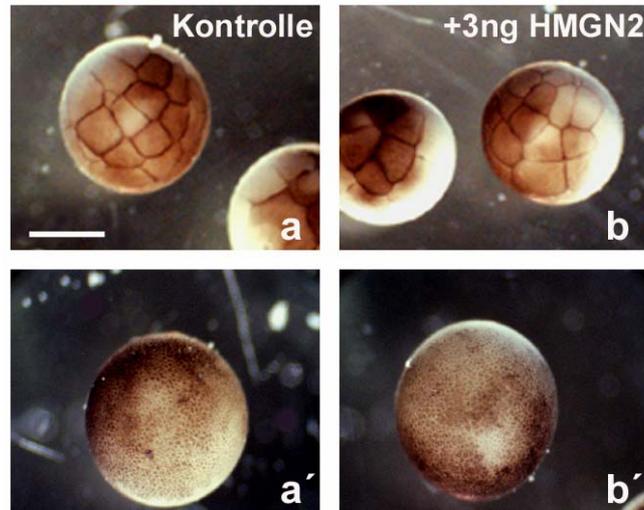


**Abb.33:** Western Blot Analyse zur Untersuchung der HMGN2 Menge in HMGN2-injizierten Embryonen. Nach Injektion von 3 ng menschlichem HMGN2 oder 25 nl PBS (WT) wurde aus je 30 Gastrulae (NF12) die PCA-löslichen Proteine im SDS-Acrylamidgel (15%) gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde dann mit einem Antikörper inkubiert der gegen die konservierte nukleosomale Bindungsstelle gerichtet war. Dieser Antikörper erkennt sowohl das endogene HMGN2, als auch die injizierte rekombinante menschliche Variante. Die Detektion von Histon H1A diente als Beladungskontrolle. Injektion von 3 ng menschlichem HMGN2 erhöht die HMGN2 Menge noch in der Gastrula.

Wie der Westernblot in Abbildung 33 zeigt, resultierte die Injektion von je 3ng HMGN2 in die Zygote von *Xenopus laevis* noch in der Gastrula in einer deutlich erhöhten Proteinmenge im Vergleich zu unbehandelten Embryonen (Wildtyp). Dieses Ergebnis zeigt auch, dass ein Großteil des injizierten Proteins zunächst bis zur Gastrula stabil bleibt und nicht degradiert wird.

#### 4.4.3 Analyse der Phänotypen vor der Midblastula Transition nach Injektion von rekombinantem HMGN Protein

Wie unter 4.4.2 beschrieben, erhöht die Injektion von 3 ng hHMGN2 die HMGN Proteinmenge auch in späteren Entwicklungsstadien deutlich. Die Konsequenz einer derartigen Veränderung für die Embryonalentwicklung wurde zunächst mit Zeitrafferaufnahmen verfolgt und einzelne Entwicklungsstadien dokumentiert (Abb. 34). Bis zur Blastula konnten keine Veränderungen im Zeitablauf der Furchungen beobachtet werden. Sowohl die HMGN2-injizierten Embryonen (+HMGN2), als auch die mit Puffer (PBS) injizierten Embryonen (+Puffer) entwickelten sich synchron (Abb. 34). Das gleiche gilt, hier nicht gezeigt, auch für HMGN1-injizierte Embryonen (+HMGN1)



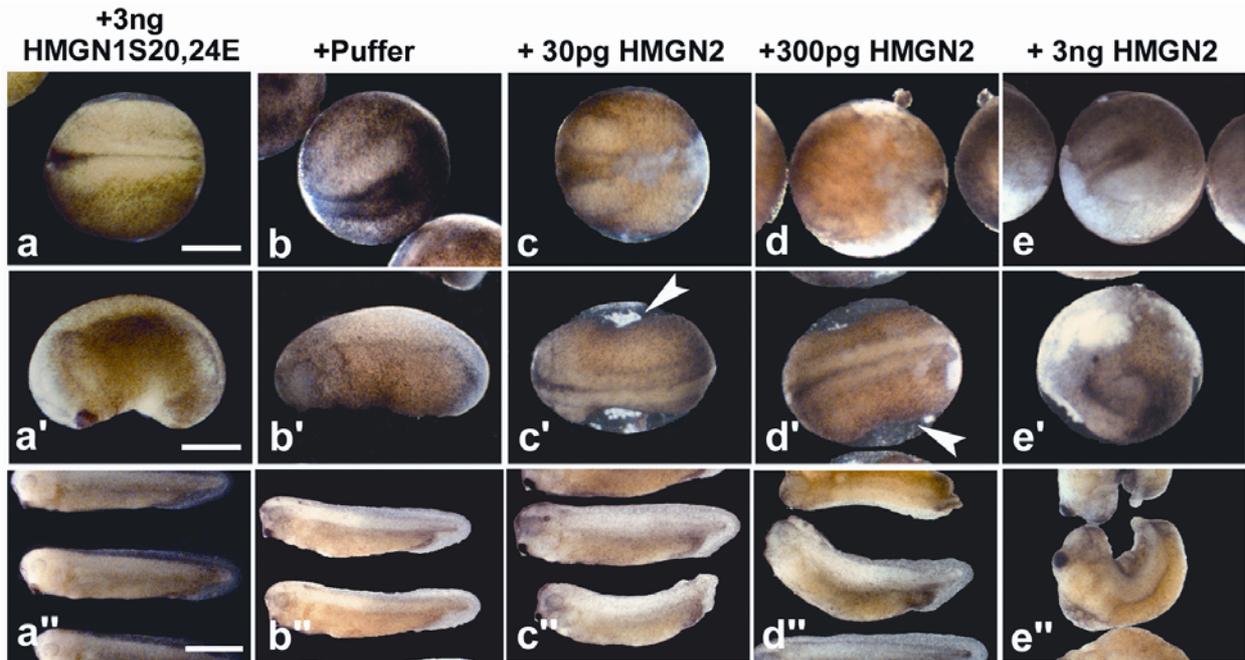
**Abb.34:** Exemplarische Aufnahmen von Furchungsstadien (a, b; NF6) und späte Blastulastadien (a', b'; NF9). Kontrolle nach Injektion von 25 nl PBS (a, a') und parallel entwickelte Embryonen nach Injektion von 3 ng HMGN2 (b, b'). Eichstrich: 0,6 mm.

#### 4.4.4 Konsequenzen der HMGN-Injektion für die Embryonalentwicklung nach der Midblastula Transition

Wie die Zeitrafferanalysen späterer Embryonen zeigten, verursachte die HMGN Injektion Missbildungen in einem signifikanten Ausmaß (Tabelle 4.1). Defekte in der Entwicklung HMGN-injizierter Embryonen waren ab dem späten Gastrulastadium (NF13) zu beobachten. Sowohl die Injektion von HMGN1 als auch HMGN2 Protein führten gleichermaßen zu Missbildungen der Embryonen (Tabelle 4.1). In den folgenden Abschnitten ist eine Analyse dieser Missbildungen beschrieben.

##### 4.4.4.1 Analyse der Phänotypen nach Injektion von rekombinantem HMGN Protein

HMGN-injizierte Embryonen, die das Stadium NF 30 erreichten, wiesen deutliche entwicklungsgestörte Phänotypen auf (Abb. 35). Die meisten Missbildungen beeinträchtigten die Kopfreion und die Körperachse. Die Körperachse der HMGN2-injizierten Embryonen ist stark verkürzt und gebogen (Abb. 35d'', e''). In der Kopfreion ist eine gestörte Entwicklung der Augen und eine abgeflachte Stirn zu beobachten (Abb. 35e''). Insgesamt ist der zu kleine Kopf (Mikrocephalie) HMGN2-injizierter Embryonen sehr auffallend, der auf eine Störung der Gehirnentwicklung hinweist. Auch ist bei den meisten HMGN2-injizierten Embryonen ein offener Rücken zu beobachten („Spina bifida“-Phänotyp), der wahrscheinlich durch eine unvollkommene Schließung des Blastoporus während der Gastrulation entstanden ist.



**Abb.35:** Phänotypen nach Injektion von rekombinanten HMGN2 Proteinen. Gezeigt sind Neurulae (NF17, a-e), frühe Schwanzknospenstadien (NF22, a'-e') und Schwanzknospenstadien (NF 33-34, a''-e'') von kontrollinjizierten (25 nl PBS) und HMGN2-injizierten Geschwister-Embryonen. Charakteristisch für HMGN2-injizierte Embryonen sind Zellgruppen, die zwischen dem Embryo und der Vitellinmembran erkennbar sind (siehe Pfeil c' und d'). Die mit Puffer Kontroll-injizierten Embryonen entwickelten sich normal (b-b''). Embryonen nach Injektion von HMGN1S20,24E Protein, welches keine funktionelle nukleosomale Bindungsdomäne hat, wiesen keine Missbildungen auf (a-a''). Das Maß der Missbildungen korrelierte mit der Menge an injiziertem HMGN2 Protein (Proteinmengen sind über den Bildern angegeben). Eichstrich: 0,5 mm (a, a') und 1 mm (a'').

In frühen Neurulastadien HMGN-injizierter Embryonen (NF17) sind Zellen zwischen dem Embryo und der Vitellinmembran zu erkennen (Abb. 35, Pfeil in c' und d'). Diese externen Zellen sind wahrscheinlich tote Zellen, die entweder apoptotischen oder nekrotischen Ursprungs sein können. Das Ausmaß dieser Erscheinung korrelierte mit der Menge an injiziertem HMGN2 Protein (Abb. 35c', d', e'). Dieses Phänomen wird in einem folgenden Abschnitt näher untersucht.

Die Phänotypen der HMGN-injizierten Embryonen sind, wie man der Tabelle 4.1 entnehmen kann, spezifisch, da Kontroll-Embryonen (Injektion von 25 nl PBS) bzw. unbehandelte Embryonen eine normale Entwicklung aufwiesen (Abb. 35b-b''). Die Kontroll-Embryonen stammten aus ein und derselben *in-vitro* Befruchtung wie die HMGN-injizierten Embryonen. Noch deutlicher wurde dies durch Injektion der HMGN1S20,24E Punktmutante, welche keine funktionelle nukleosomale Bindungsdomäne besitzt und auch keine Missbildungen (Tabelle 4.1; Abb. 35a-a'') verursachte. Da diese Punktmutante nicht an das Chromatin binden kann, deutet dies darauf hin, dass die Interaktion zwischen HMGN Proteinen und dem Chromatin verantwortlich ist für die entstandenen Phänotypen und nicht die Anwesenheit der HMGN Proteine per se.

Interessant ist auch die Beobachtung, dass das Ausmaß der Missbildungen von HMGN2-injizierten Embryonen mit der Menge an injiziertem Protein korrelierte. Bereits bei einer Injektion von 30pg kann man Effekte beobachten, wie zum Beispiel die gebogene Körperachse und die externen Zellen (Abb. 35c-c''). Bei einer Erhöhung der Injektionsmenge (300pg bzw. 3ng HMGN2) werden die Missbildungen aber ausgeprägter (Abb. 35d-d'' und e-e''). Man kann also daraus schließen, dass die auftretenden Phänotypen abhängig von der HMGN Proteinmenge sind.

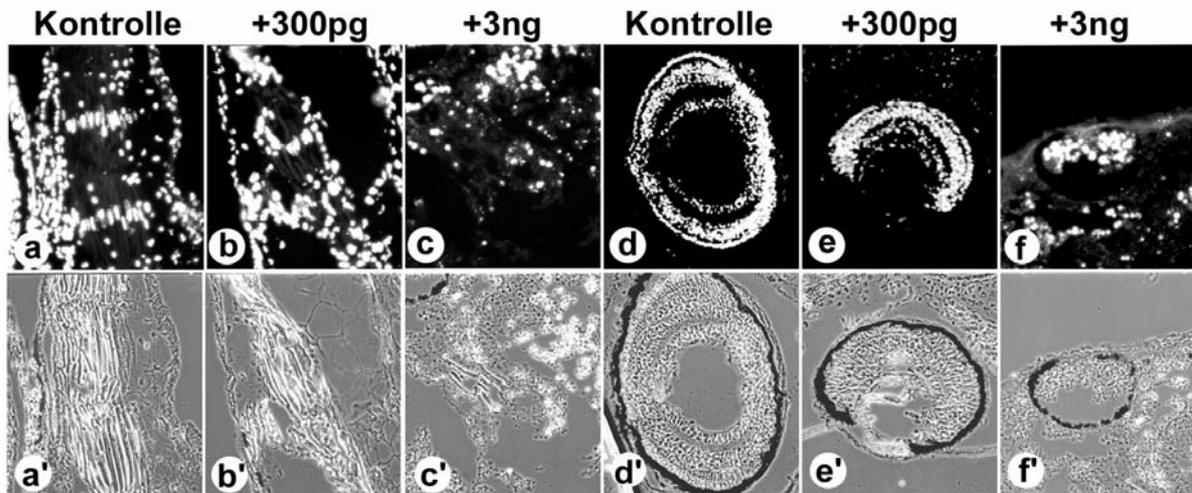
Injektion pro Zygote	Gesamtanzahl der untersuchten Embryonen	Anzahl der Embryonen, die NF 35 erreichten	Anzahl der Embryonen mit Missbildungen (NF35)	Anzahl der Embryonen ohne Missbildungen (NF35)
3ng HMGN1	<b>104</b>	<b>61</b>	<b>61 (100%)</b>	<b>0</b>
3ng HMGN1S20,24E	<b>81</b>	<b>69</b>	<b>0</b>	<b>69 (100%)</b>
3ng HMGN2	<b>198</b>	<b>164</b>	<b>101 (62%)</b>	<b>63 (38%)</b>
Injektion von 25nl Puffer (PBS)	<b>45</b>	<b>41</b>	<b>2 (5%)</b>	<b>39 (95%)</b>
Unbehandelt	<b>485</b>	<b>422</b>	<b>21 (5%)</b>	<b>401 (95%)</b>

**Tabelle 4.1:** Häufigkeit der Phänotypen nach Injektion von HMGN Protein in die Zygote von *Xenopus*.

#### 4.4.4.2 Histologische Analyse der HMGN-injizierten Embryonen

Um die Phänotypen von HMGN-injizierten Embryonen näher zu charakterisieren, wurden manipulierte wie auch unbehandelte Embryonen einer histologischen Analyse unterzogen. Dazu wurden wildtypische und HMGN2-injizierte Embryonen wie unter 4.3.2.4.1 beschrieben in Paraffin eingebettet, Paraffinschnitte angefertigt und nach Deparaffinierung und Rehydrierung zur besseren Identifizierung einzelner Organe mit Hoechst angefärbt. Die mikroskopische Analyse der Paraffinschnitte ließ erkennen, dass nach Injektion von HMGN Proteinen in die Zygote die neuronale Entwicklung und die Entwicklung der Myotome extrem gestört waren. Die lose Anordnung der Muskelfasern, wie in Abb. 36b und c gezeigt, deutet an, dass eine Störung in der Myotom-Entwicklung bei HMGN2-injizierten Embryonen auftritt. In den unbehandelten Embryonen dagegen zeigen die Muskelfasern eine korrekte segmentierte Anordnung (Abb. 36a). In den Paraffinschnitten ebenfalls deutlich zu erkennen war eine fehlerhafte Augenentwicklung der HMGN2-injizierten Embryonen (Abb. 36e, f). Nach Injektion von 3 ng HMGN2 ist fast nur noch die Pigmentschicht zu sehen, die Retina ist so gut wie nicht ausgebildet (Abb. 36f). Insgesamt kann man auch an den Paraffinschnitten anhand der Myotom-Entwicklung und der Augenentwicklung eine Korrelation zwischen der

injizierten HMGN2 Proteinmenge und der daraus resultierenden Stärke der Missbildungen erkennen.

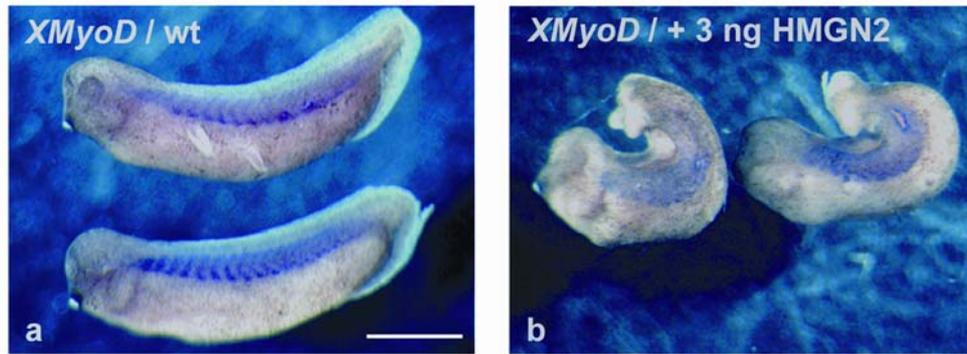


**Abb.36:** Paraffinschnitte von HMGN2-injizierten Embryonen (Stadium NF42) zeigen eine gestörte Anordnung der lateralen Muskelfasern (b, c) und eine unvollkommene Augenentwicklung (e, f). Die Embryonen wurden mit 300 pg bzw. 3 ng (wie oben angegeben) rekombinatem HMGN2 Protein injiziert. Paraffinschnitte von unbehandelten Embryonen (Kontrolle) sind in Bild a und d gezeigt. Die DNA-Färbung mit Hoechst ist in der oberen Reihe (a-f), die entsprechenden Phasenkontrastbilder sind in der unteren Reihe (a'-f') gezeigt.

#### 4.4.4.3 Expression eines mesodermalen Markergens (*XMyoD*) in HMGN-injizierten Embryonen

Um die Entwicklung des Mesoderms (Muskulatur) in HMGN-injizierten Embryonen näher zu untersuchen, wurde die Expression des mesodermalen Markergens *XMyoD* mit Whole mount *in situ*-Hybridisierung in HMGN-injizierten Embryonen und Kontrollembryonen verglichen. Dazu wurde Embryonen, die entweder mit 3 ng HMGN2 oder mit 25 nl PBS als Kontrolle injiziert wurden, mit Formaldehyd (MEMFA) fixiert und anschließend mit einer Digoxigenin-markierten *XmyoD* Antisense-RNA-Sonde einer Whole mount *in situ*-Hybridisierung unterzogen. Die Formaldehyd-fixierten Embryonen wurden zunächst 2 Stunden bei 55°C prähybridisiert. Die Hybridisierung mit 100 ng Digoxigenin-markierter Sonde pro Embryo erfolgte über Nacht bei 55°C. Nach dem Waschen der Embryonen wurde die Sonde mit einem alkalisch-Phosphatase-gekoppelten Antikörper (Verdünnung: 1:5000) detektiert. Die gebundenen Antikörper wurden dann mit NBT/BCIP nachgewiesen, und nach der Detektion mit einer Digitalkamera (Pixera) aufgenommen.

Wie man in Abb. 37 sehen kann, besitzen die Kontrollembryonen segmentierte Myotome, die eine klare Abgrenzung aufweisen. HMGN2-injizierte Embryonen dagegen besitzen deutlich weniger Myotome mit einer unsegmentierten, diffusen Anordnung. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der histologischen Analyse von Paraffinschnitten (4.4.4.2). Das veränderte Expressionsmuster von *XMyoD* jedenfalls deutet an, dass HMGN Proteine mit der Expression Mesoderm-spezifischer Gene interferieren könnten.

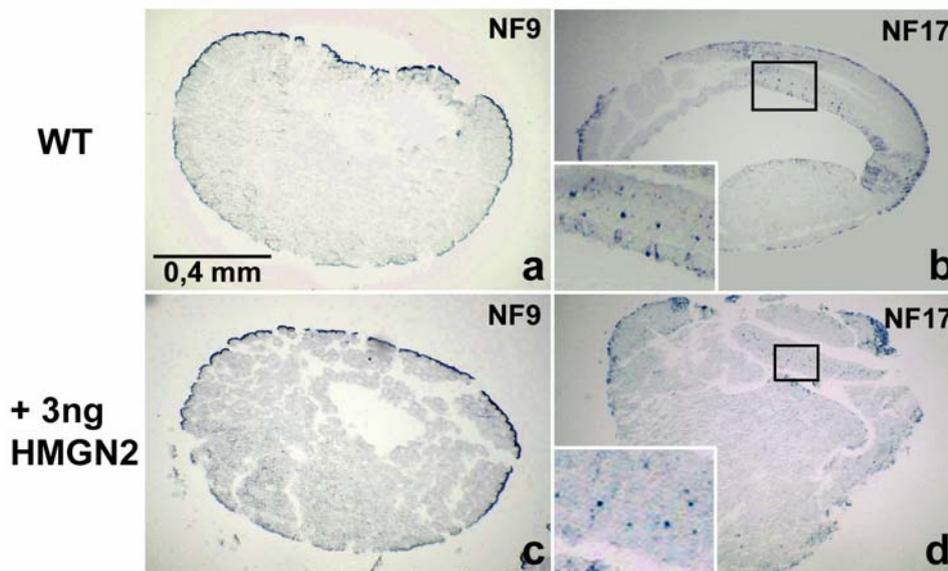


**Abb.37:** Whole-mount *in situ*-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierter *XMyoD* Antisense-RNA-Sonde in Wildtyp- (a) und in HMGN2-injizierten Embryonen (NF35; b). Im Vergleich zu den Kontrollembryonen ist in den HMGN2-injizierten Embryonen ein verändertes *XMyoD*-Expressionsmuster zu erkennen. In den HMGN2-injizierten Embryonen sind weniger Myotome und es fehlt eine klare Segmentierung der Myotome. Eichstrich: 1,3 mm (a).

#### 4.4.4.4 Whole-mount TUNEL-Assay von HMGN-injizierten Embryonen

Wie in 4.4.4.1 beschrieben, wurden externe Zellen zwischen der Vitellinmembran und dem Embryo ab dem Neurulastadium in HMGN2-injizierten Embryonen beobachtet (Abb. 35, siehe Pfeil c' und d'). Diese Zellen könnten sowohl apoptotischen (Grammer et al. 2000) als auch nekrotischen Ursprungs sein. Um dies zu klären, wurde ein Whole-mount TUNEL-Assay mit HMGN-injizierten Embryonen und Kontrollembryonen durchgeführt. Mit Hilfe des Whole-mount TUNEL-Assay lassen sich während der Embryonalentwicklung auftretende apoptotische Zellen lokalisieren (Hensey und Gautier et al., 1998). Dieser Test beruht auf der Tatsache, dass in apoptotischen Zellen, im Gegensatz zu intakten Zellen, die DNA fragmentiert vorliegt. Mit dem Whole-mount TUNEL-Assay werden die 3'-OH-Enden von DNA-Fragmenten mittels der terminalen Desoxynukleotidyl-Transferase und Digoxigenin-markiertem dUTP markiert und anschließend nachgewiesen.

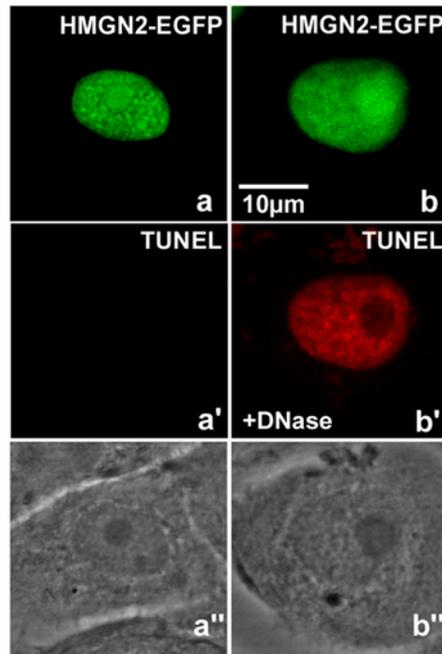
Formaldehyd-fixierte Embryonen im Stadium NF35 wurden zunächst rehydriert und mit Proteinase K (10 µg/ml) behandelt, gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd refixiert. Nach erneutem Waschen wurden sie 1 h bei 65°C in Hybridisierungspuffer inkubiert, wieder gewaschen und schließlich 2 h bei 37°C in einer Markierungslösung, welche die terminale Desoxynukleotidyl-Transferase und Digoxigenin-markiertes dUTP enthielt, inkubiert. Detektiert wurde mit einem gegen Digoxigenin gerichteten alkalischen Phosphatasegekoppelten Antikörper und NBT/BCIP als Substrat. Schließlich wurden die Embryonen erneut Formaldehyd-fixiert und wie unter 4.3.2.4.1 beschrieben in Paraffin eingebettet und 7 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger überführt und getrocknet. Die getrockneten Schnitte wurden dann über eine Rotihistol-/Alkoholreihe deparaffiniert, rehydriert und in Mowiol eingebettet. Schließlich wurden die Präparate im Hellfeld am Mikroskop analysiert und mit einer digitalen Kamera aufgenommen (Zeiss Axiophot ausgestattet mit PixelFly).



**Abb.38:** Paraffinschnitte von Embryonen, die dem Whole-mount TUNEL-Assay unterzogen wurden. Embryonen aus einer *in-vitro* Befruchtung wurden mit 3 ng HMGN2-injiziert (c, d) oder blieben unbehandelt (a, b). Im Blastulastadium (NF9) sind keine apoptotischen Zellen zu erkennen (a, c). Im Neurulastadium (NF17) treten apoptotische Zellen (siehe Fenster) bei HMGN2-injizierten (b) wie auch unbehandelten Embryonen (d) auf. Es ist kein signifikanter Unterschied in der Verteilung und Anzahl der apoptotischen Zellen in wildtypischen und HMGN-injizierten Embryonen zu finden.

Der Whole-mount TUNEL-Assay wurde an je 15 Embryonen (HMGN-injizierte und unbehandelte Embryonen) durchgeführt. Sowohl bei den HMGN2-injizierten wie auch bei den unbehandelten Embryonen wurden keine apoptotischen Zellen im Stadium NF 9 (Blastula) entdeckt (Abb. 38a, c). Im Stadium NF17 (Neurula) dagegen konnten apoptotische Zellen im mesodermalen Bereich bei HMGN2-injizierten wie auch bei unbehandelten Embryonen detektiert werden (Abb. 38b, d). Insgesamt konnte aber kein signifikanter Unterschied in der Verteilung und Anzahl der apoptotischen Zellen in HMGN-injizierten und Kontrollembryonen festgestellt werden.

Um ausschließen zu können, dass eine HMGN-Überexpression Apoptose verursacht, wurde ein HMGN2-EGFP Fusionsprotein in *Xenopus* A6-Zellen überexprimiert. Anschließend wurde ein TUNEL-Assay an diesen Zellen durchgeführt. Der TUNEL-Assay mit Zellen funktioniert ähnlich wie der Whole mount TUNEL-Assay, nur dass das zur Markierung der freien 3'-OH-Enden der fragmentierten DNA Dig-dUTP mit einem Texas-Red gekoppelten gegen Digoxigenin gerichteten Zweitantikörper (Verdünnung: 1:100) eingesetzt wurde.



**Abb.39:** TUNEL-Assay an *Xenopus* A6-Zellen, die das HMGN2-EGFP Fusionsprotein exprimieren. Gezeigt wird die Immunfluoreszenz des HMGN2-EGFP Fusionsprotein (a, b), die Fluoreszenz von apoptotischen Zellen (a', b') und die entsprechende Phasenkontrastaufnahme (a'', b''). Als Kontrolle wurden Zellen mit DNase I behandelt (b'). Dadurch wird die DNA fragmentiert, wie es auch bei apoptotischen Zellen der Fall ist. Bei einer Überexpression des HMGN2-EGFP Fusionsproteins konnten keine TUNEL-positiven Zellen detektiert werden.

Durchgeführt wurde der TUNEL-Assay für Zellkulturen nach dem Protokoll aus dem Kit von Oncor Appligene (Heidelberg). Die Zellen wurden mit 2% Formaldehyd und 0,1% Triton in PBS 10 min fixiert und in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einem Puffer äquilibriert und 1 h bei 37°C in einer Markierungslösung, welche die Terminale-Desoxynukleotidyl-Transferase und Digoxigenin-markiertes dUTP beinhaltet, inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 0,5 M EDTA abgestoppt und in PBS gewaschen. Schließlich wurden die Zellen 30 min mit dem Zweitantikörper (anti-Digoxigenin-Texas-Red; 1:100) und Hoechst (5 min) inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Zellen in Mowiol eingebettet, die Präparate mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert und die Immunfluoreszenzen mit einer digitalen Kamera (Zeiss Axiophot ausgestattet mit PixelFly) aufgenommen. Als Kontrollen wurden Zellen mit DNase I behandelt. Dadurch wird die DNA fragmentiert und freie 3'-OH-Enden erzeugt, wie es auch bei apoptotischen Zellen der Fall ist. Die Zellen, die als Positivkontrollen fungierten, wurden vor der Markierungsreaktion 5 min mit 0,2 U/µl DNase I behandelt und anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 M EDTA abgestoppt.

Eine Überexpression des HMGN2-EGFP Fusionsproteins in *Xenopus* A6-Zellen ergab kein Signal nach Durchführung des TUNEL-Assay (Abb. 39a'). Die parallel durchgeführte DNase-Kontrolle zeigte, dass der TUNEL-Assay funktionierte (Abb. 39b-b''). Aufgrund dieser

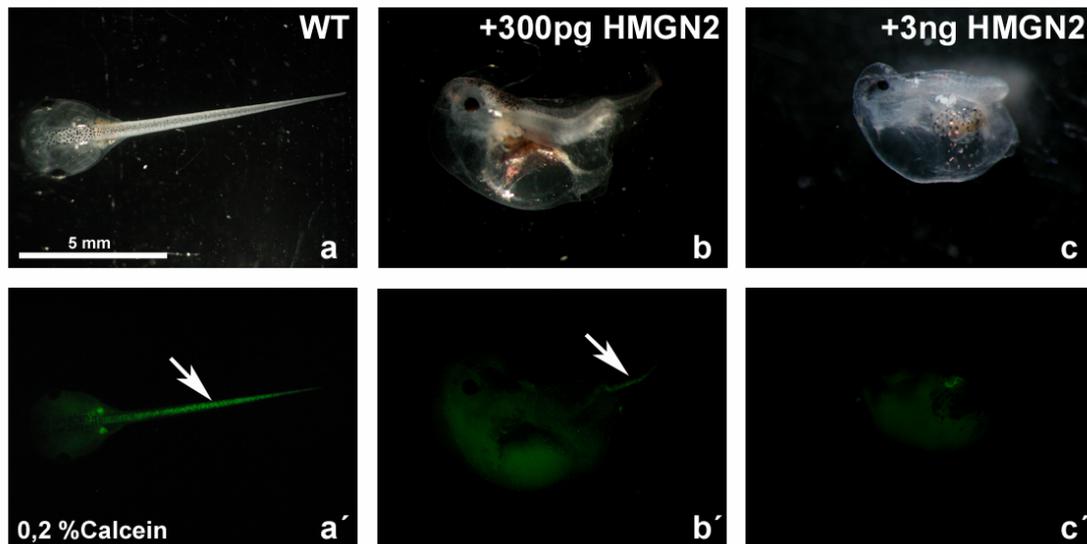
Ergebnisse kann man eine Induktion der Apoptose durch eine erhöhte HMGN Proteinmengen ausschließen.

Zusammengenommen zeigen die TUNEL-Experimente, dass die nach einer Injektion von HMGN2 zwischen der Vitellinmembran und dem Embryo auftretenden externen Zellen eher nicht auf Apoptose zurückzuführen sind. Da ein weiteres Kennzeichen der HMGN manipulierten Embryonen der offene Rücken darstellt, ist davon auszugehen, dass erhöhte HMGN Proteinmengen die Gastrulationsbewegungen stören, was letztendlich zu einer unvollkommenen Schließung des Blastoporus führt. Durch diese unvollkommene Schließung des Blastoporus kommt es zur Nekrose von mesodermalen und endodermalen Zellen in der Umgebung, die sich schließlich unterhalb der Vitellinmembran ansammeln. Diese Interpretation wird durch die Beobachtung gestützt, dass die externen Zellen erst ab der Neurula auftreten.

#### **4.4.4.5 Calcein-Färbung zur Analyse der Knochenbildung bei HMGN-injizierten Embryonen**

Zur weiteren Analyse der HMGN-injizierten Phänotypen wurde die Knochenbildung von älteren Embryonen (5 Tage) mittels Calcein, einem fluoreszierendem Chromophor, das spezifisch an verknöcherte Skelettstrukturen bindet, untersucht. Dazu wurden lebende HMGN2-injizierte und unbehandelte Embryonen bei Raumtemperatur für 5 min in 0,2% Calcein in 5%MMR und anschließend für mindestens 2 Stunden in Calceinfreiem 5% MMR gehalten. Die Embryonen nehmen den Farbstoff aus der Flüssigkeit auf. Durch das anschließende Waschen in Calcein-freiem Puffer scheidet der Embryo den Großteil des aufgenommenen Calceins wieder aus und lediglich das an Knochenstrukturen gebundene Calcein verbleibt. Zur Erleichterung der Analyse wurden die lebenden Embryonen mit verdünntem MS222 (0,2%) ruhig gestellt. Die Knochenbildung der Embryonen wurde unter einem Fluoreszenzbinokular (Zeiss) untersucht und miteinander verglichen.

Die Wirbelsäule unbehandelter Embryonen ist 5 Tage nach der Befruchtung bereits ausgebildet (Abb. 40a'). Bei einer Injektion von 300 µg HMGN2 Protein kann man noch rudimentär die Wirbelsäule erkennen (Abb. 40b'). Keinerlei Knochenstrukturen sind dagegen bei einer Injektion von 3 ng HMGN2 Protein nachzuweisen (Abb. 40c').



**Abb.40:** Calcein-gefärbete Embryonen (5 Tage). HMGN2-injizierte (b, b', c, c') und unbehandelte (a, a') Embryonen wurden in 0,2% Calcein zur Anfärbung der Knochenstrukturen gehalten. Zu sehen sind die Embryonen im Hellfeld (a-d) und Fluoreszenzaufnahmen zum Nachweis des an verknöcherten Skelettstrukturen gebundenen Calceins (a'-d'). Die Pfeile zeigen die Wirbelsäule der Kaulquappen an (a', b'). Durch die Manipulation der HMGN Proteinmenge unterbleibt die Ausbildung der Wirbelsäule (c') bzw. sie wird nur rudimentär ausgebildet (b').

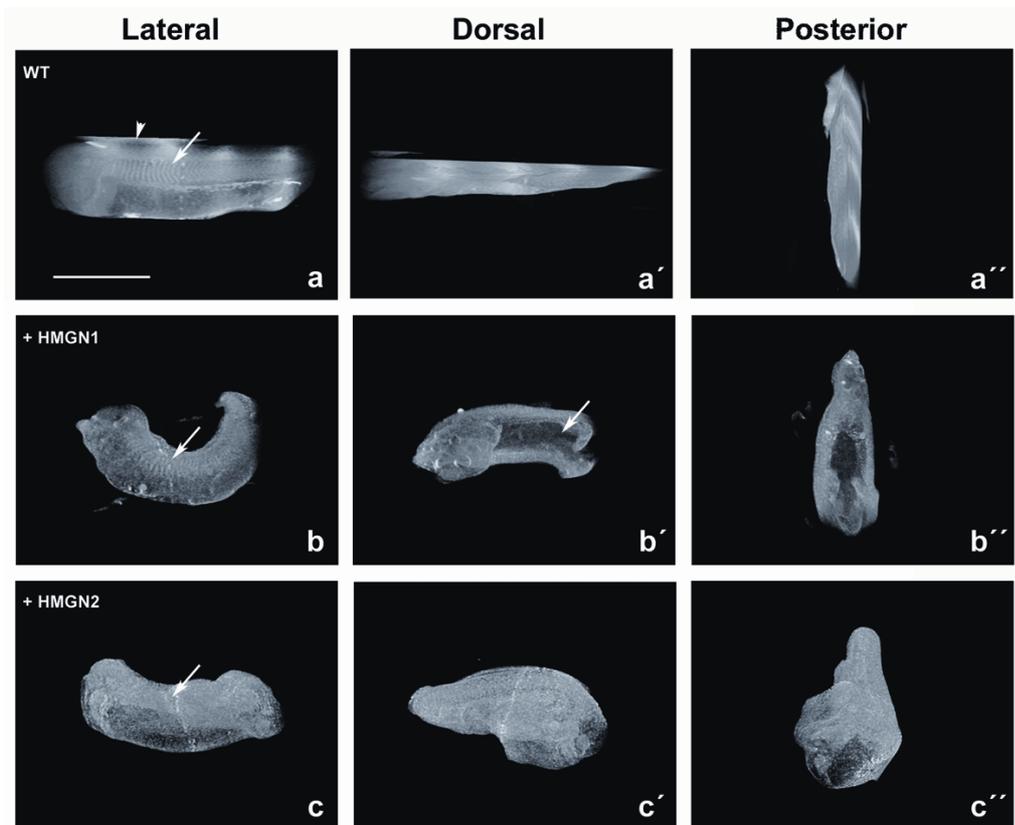
Zusammenfassend zeigt dies, dass eine erhöhte HMGN Proteinmenge die Entwicklung der Knochenbildung bei *Xenopus laevis* stört. Auch hier kann man eine Korrelation zwischen HMGN Proteinmengen und den daraus entstandenen Missbildungen beobachten. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass nur wenige der injizierten Embryonen ein Alter von 5 Tagen erreichten.

#### 4.4.4.6 Analyse der embryonalen Morphologie mittels Magnetresonanztomographie

Eine neue Möglichkeit, Phänotypen manipulierter Embryonen zu analysieren, ist die magnetische Kernresonanztomographie. Diese Methode bietet gegenüber der klassischen Histologie einige Vorteile: 1.) Die Embryonen bleiben vollständig intakt. 2.) Aus den Messdaten der magnetischen Kernresonanztomographie können dreidimensionale Modelle erstellt werden, die es erlauben, den gleichen Embryo in allen drei Raumachsen virtuell zu schneiden. 3.) Die Lage und Entwicklung einzelner Organe lässt sich in ihrer Raumordnung analysieren und zueinander ins Verhältnis setzen. 4.) Einzelne Strukturen lassen sich aufgrund ihrer Anordnung im Raum, insbesondere bei missgebildeten Embryonen, leichter identifizieren. 5.) Die Analyse ist im Vergleich zur herkömmlichen Histologie mit deutlich geringerem Zeitaufwand verbunden. 6.) Fehldeutungen, die durch Einbettung für die Histologie, durch verschobene bzw. gefaltete Schnitte oder durch verdrehte Schnittebenen entstehen können, werden vermieden.

Durch eine Kooperation mit Armin Perea und Andrew Webb vom Lehrstuhl Biophysik der Universität Würzburg bot sich die Möglichkeit, manipulierte Embryonen mittels

Magnetresonanz Mikroskopie zu analysieren. Dazu wurden HMGN1- oder HMGN2-injizierte und unbehandelte Embryonen (NF35) in Formaldehyd fixiert (MEMFA) und mit EtOH dehydriert. Vor der Messung wurden die Embryonen über eine Ethanolreihe und letztendlich in PBS rehydriert und in eine Glaskapillare mit protonenfreiem Medium überführt. Die Messung wurde von Armin Porea (Biophysik, Universität Würzburg) durchgeführt. Nach Interpolation der Messdaten erfolgte die Analyse der Daten mit dem Softwarepaket Amira™ 3.0, welches die dreidimensionale Rekonstruktion der Embryonen ermöglicht. Beispiele solcher 3D-rekonstruierter Embryonen sind auf der beigelegten CD vorhanden und können in einer animierten Version eingesehen werden. In Abb. 41 sind Momentaufnahmen von Embryonen in einer lateralen, dorsalen und posterioren Ansicht zu sehen.

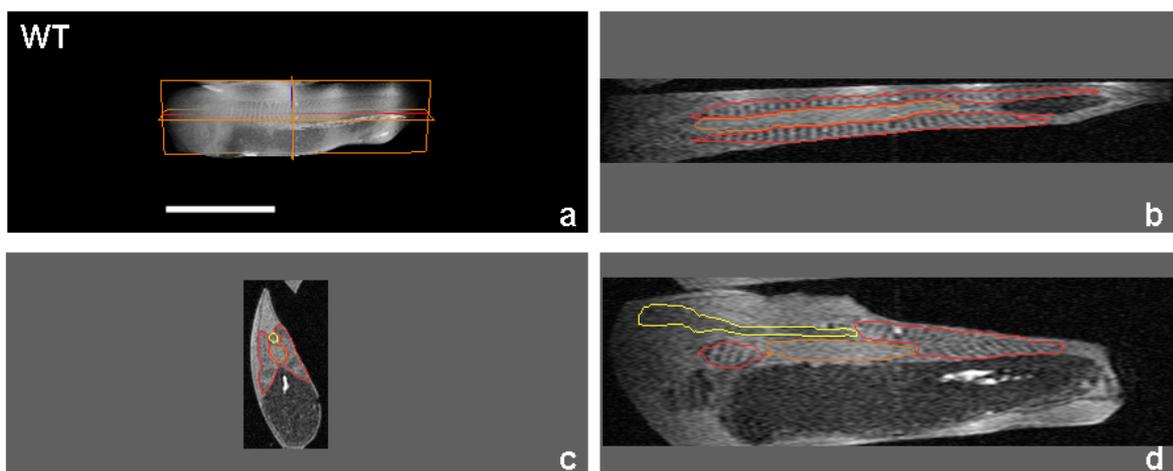


**Abb.41:** Momentaufnahmen von dreidimensionalen Bildern von HMGN1-injizierten (b-b''), HMGN2-injizierten (c-c'') und unbehandelten Embryonen (a-a''), die durch Auswertung der Daten aus einer Magnetresonanz Mikroskopie gewonnen wurden. Gezeigt sind die Embryonen aus lateraler (a, b, c), dorsaler (a', b', c') und posteriorer (a'', b'', c'') Ansicht. Die Myotomanordnung der unbehandelten Embryonen ist deutlich zu sehen (a, Pfeil), im Gegensatz zu den HMGN1- bzw. HMGN2-injizierten Embryonen, bei denen die Myotome keine klaren Abgrenzungen aufweisen (b, Pfeil) bzw. keine Myotome mehr erkennbar sind (c, Pfeil). Deutlich ist der offene Rücken des HMGN1-injizierten Embryos zu sehen (b', Pfeil). Anzumerken ist, dass bei der Messung des unbehandelten Embryos eine Bildverschiebung auftrat und deshalb ein Teil des dorsalen Bereiches auf der posterioren Seite hinzugefügt wurde (a, Pfeilkopf). Die Streifung des Kontroll-Embryos beruht auf einem Artefakt, bei dem sich die Wicklung der Magnetspule abgebildet hat. Eichstrich: 1,2 mm (a).

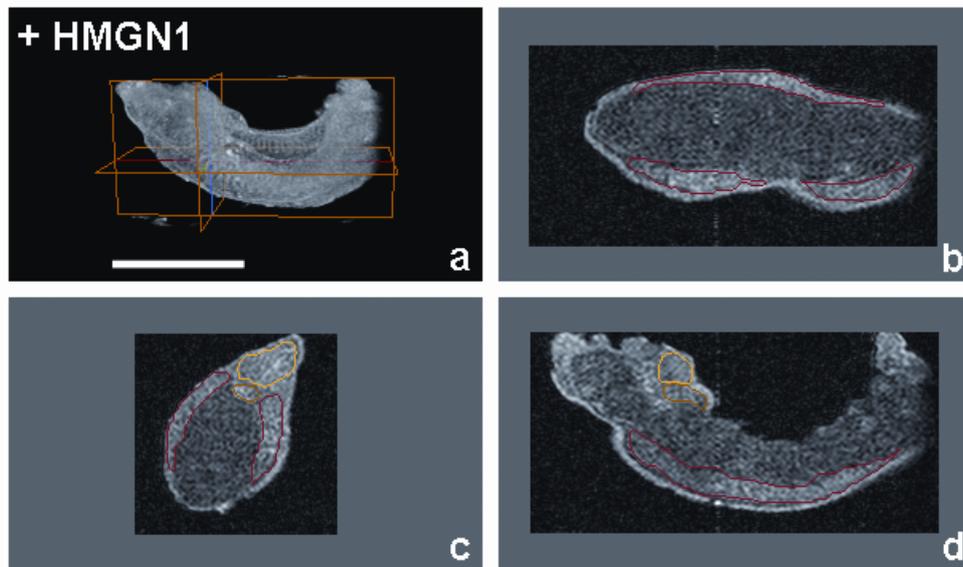
Zur weiteren Analyse der Messdaten wurde das Segmentierungswerkzeug von Amira™ 3.0 verwendet. Mit Hilfe virtueller Schnitte in allen drei Raumrichtungen in parallelen Beobachtungsfenstern ließen sich in den Kontroll-Embryonen Strukturen wie Gehirn, Augen, Ohrplakode, Neuralrohr, Chorda dorsalis, Myotome, Herz, Pronephros und Schlund erkennen. Beeindruckend war die gute Auflösung der Myotomsegmentierung. Die Strukturen wurden aufgrund ihrer räumlichen Lage und mit Hilfe histologischer Tafeln identifiziert (Hausen und Ribesell, 1991; Bernardini et al, 1999; Dale und Slack, 1987). Beispiele virtueller Schnitte des Kontroll-Embryos sind in Abb. 42 gezeigt. Identifizierte Organe sind dort mit einer Farbumrandung gekennzeichnet. Die durch Magnetresonanz Mikroskopie erhaltenen Daten von HMGN1- und HMGN2-injizierten Embryonen wurden in gleicher Weise bearbeitet und mit dem Kontroll-Embryo verglichen (Abb. 43 und 44).

Eindeutig zu erkennen sind die gebogene Körperachse, die rudimentäre Kopfentwicklung (Abb. 43a, d und 44a, d), der offene Rücken im posterioren Bereich des Embryos mit einem Fehlen der Chorda und dem Neuralrohr und die nicht-segmentierte Anordnung und Organisation der Myotome (vergleiche Abb. 42 mit Abb. 43 und 44). Die Analysen bestätigen somit die histologischen Ergebnisse (4.4.4.2) einer Fehlentwicklung durch erhöhte HMGN Proteinmengen.

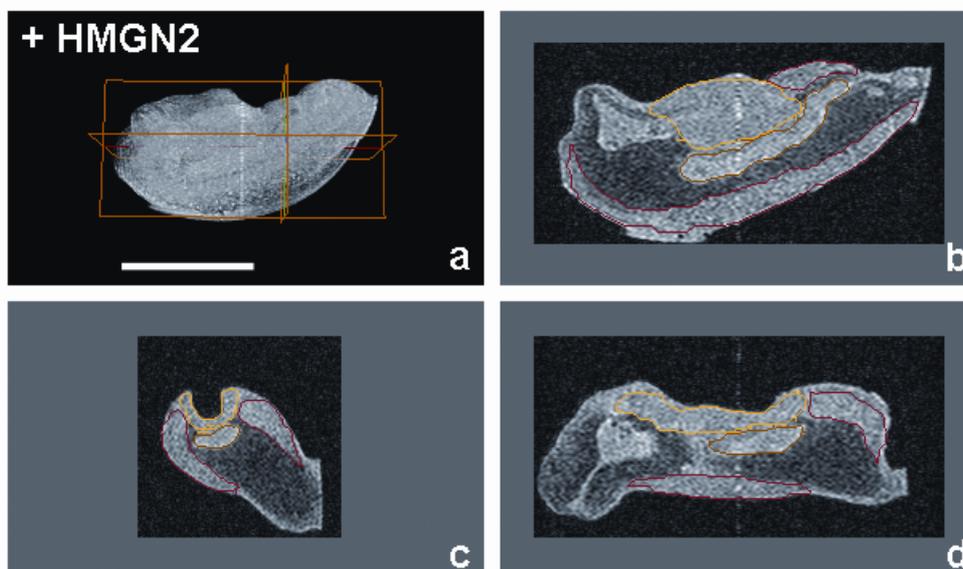
Bislang wurden noch nie ältere *Xenopus*-Embryonen mit Hilfe der Magnetresonanz-Bildgebung untersucht. Die Daten belegen, dass diese Methode bestens geeignet ist, morphologische Studien an unbehandelten und manipulierten *Xenopus*-Embryonen durchzuführen.



**Abb.42:** Virtuelle Schnitte eines 3D-rekonstruierten unbehandelten Embryos. Gezeigt ist der gesamte Embryo mit allen Schnittebenen (a), ein horizontaler Schnitt (b), ein transversaler Schnitt (c) und ein sagittaler Schnitt (d). Die Myotome sind Rot, das Nervensystem Gelb und die Chorda Orange markiert. Die MRI-Daten wurden mittels des Softwarepakets Amira™ 3.0 bearbeitet. Im horizontalen Schnitt sind die Somiten deutlich segmentiert zu sehen (b). Im transversalen Schnitt sind die Chorda, das zentrale Nervensystem und Somiten zu erkennen. Im transversalen Schnitt wurden das zentrale Nervensystem und die segmentierten Somiten identifiziert. Eichstrich: 1,2 mm (a).



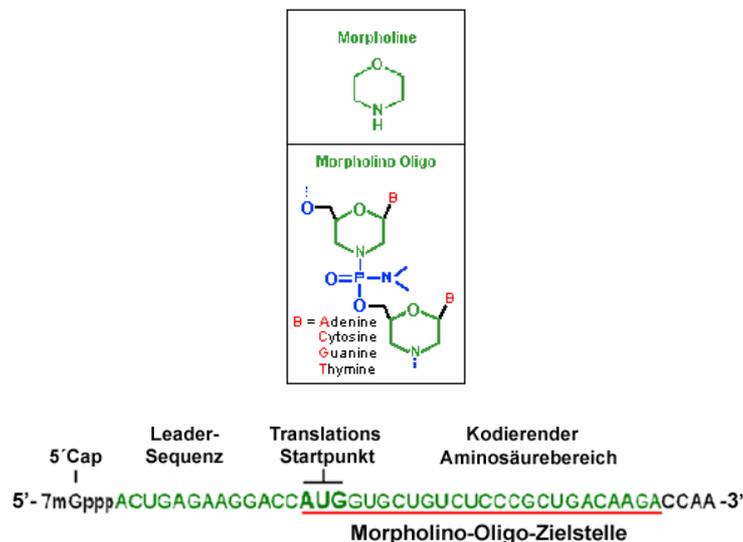
**Abb.43:** Virtuelle Schnitte eines 3D-rekonstruierten HMGN1-injizierten Embryos. In (a) ist der gesamte Embryo abgebildet zusammen mit den verschiedenen Schnittebenen, in (b) ein horizontaler Schnitt, in (c) ein transversaler Schnitt und in (d) ein sagittaler Schnitt. Farblich markiert sind die Myotome (Rot), das Nervensystem (Gelb) und die Chorda (Orange). Die MRI-Daten wurden mittels des Softwarepakets Amira™ 3.0 bearbeitet. In HMGN1-injizierten Embryonen fehlt eine Segmentierung und paketartige Anordnung der Myotome (b). Im transversalen Schnitt wurden die Chorda, das zentrale Nervensystem und die paarigen Somiten identifiziert. Im sagittalen Schnitt sind das zentrale Nervensystem, die Chorda und die Somiten zu erkennen. Die Chorda ist im Vergleich zum Wildtyp nur im Kopfbereich ausgebildet und das zentrale Nervensystem ist stark reduziert. Eichstrich: 1,2 mm (a).



**Abb.44:** Virtuelle Schnitte eines 3D-rekonstruierten HMGN2-injizierten Embryos. Gezeigt sind der gesamte Embryo zusammen mit allen Schnittebenen (a), ein horizontaler Schnitt (b), ein transversaler Schnitt (c) und ein sagittaler Schnitt (d). Die farbliche Markierung zeigt Myotome (Rot), das Nervensystem (Gelb) und die Chorda (Orange) an. Die MRI-Daten wurden mittels des Softwarepakets Amira™ 3.0 bearbeitet. Im transversalen Schnitt sind die Chorda, die paarigen Myotome und das zentrale Nervensystem erkennbar. Der offene Rücken ist durch diese Schnittebene gut verdeutlicht (c). Im transversalen Schnitt waren das zentrale Nervensystem, die Chorda und die Myotome (Somiten) zu identifizieren. Wie in HMGN1-injizierten Embryonen fehlt die segmentierte Anordnung der Myotome. Die Anordnung der Somiten ist im Vergleich zum Wildtyp völlig verschoben. Eichstrich: 1,2 mm (a).

#### 4.4.5 „Knock-down“-Experimente mit Morpholino-Oligonukleotiden

Eine weitere Manipulations-Möglichkeit der HMGN Proteinmenge ist der Einsatz von Antisense-Morpholino-Oligonukleotiden (im Nachfolgenden „Morpholinos“ abgekürzt). Diese verhindern durch Bindung an die messenger RNA die Translation und führen so zum Synthese-Stopp des entsprechenden Proteins (Abb. 45). In den Nukleotiden der Morpholinos ist die Ribose durch das Morpholin ersetzt (Abb. 45). Diese Modifikation verhindert den Abbau durch Ribonukleasen. Morpholinos bleiben dadurch länger stabil als herkömmliche Antisense-RNA. Dies ist gerade bei „knock-down“-Experimenten in *Xenopus*-Embryonen von Vorteil, denn in die Zygote injiziert, muss das Antisense-Oligonukleotid mindestens bis zur Midblastula Transition stabil bleiben, um einen Effekt auf neusynthetisierte mRNAs zu haben. Wie oben gezeigt, wird die Hauptmenge der *HMGN*-mRNAs erst ab der Midblastula Transition synthetisiert und translatiert.

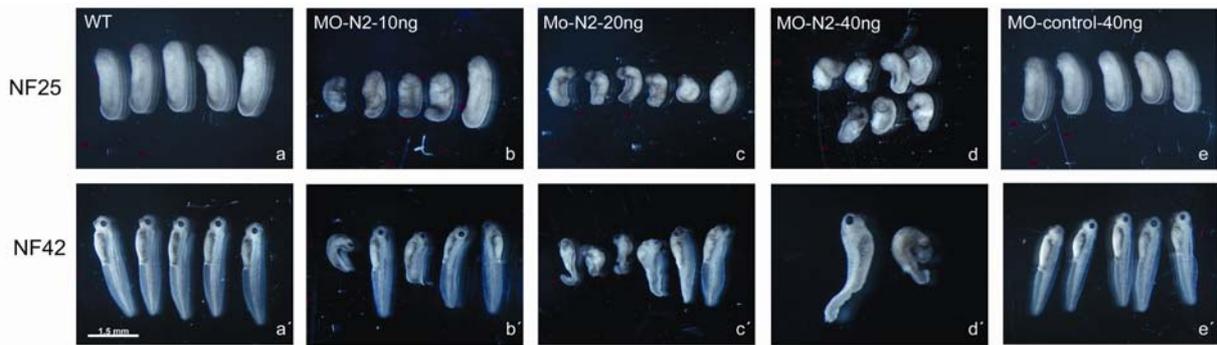


**Abb.45:** Dargestellt sind ein Morpholin-Molekül und ein Ausschnitt aus einer Morpholino-Oligonucleotid-Sequenz (oben; GeneTool, LLC, [www.gene-tools.com](http://www.gene-tools.com)) sowie eine mögliche Bindungsstelle eines Morpholino-Oligonukleotids an einer mRNA, gezeigt an einer Beispielsequenz (unten; modifiziert aus GeneTool, LLC, [www.gene-tools.com](http://www.gene-tools.com)).

##### 4.4.5.1 Injektion von Morpholino-Oligonukleotiden in die Zygote von *Xenopus laevis*

Zum Testen der Antisense-Morpholino-Oligonukleotide gegen *HMGN2* mRNAs (MO-*HMGN2*, GeneTool, LLC) wurden verschiedene Mengen (10ng, 20ng, 40 ng MO-N2 gelöst in je 25nl PBS) in die Zygote von *Xenopus laevis* injiziert (Abb. 46). Zur Kontrolle wurden unspezifische Morpholinos (MO-control, 40 ng) injiziert, die zeigen sollten, dass die Morpholinos nicht toxisch für den Embryo sind (Abb. 46). Mit diesem Vorversuch sollte herausgefunden werden, welche Morpholino-Konzentrationen am besten für die „knock-down“-Experimente geeignet sind (Abb. 46).

## Ergebnisse



**Abb.46:** Phänotypen nach Injektion von 10, 20 und 40ng Morpholino-Antisense-Oligonukleotiden. Gezeigt sind frühe Schwanzknospenstadien (NF25, obere Reihe) und späte Schwanzknospenstadien (NF42, untere Reihe) von MO-N2-injizierten Embryonen (b-d und b'-d'), MO-control-injizierten Embryonen (e, e') und Kontroll-Embryonen (a, a'), die alle aus ein und derselben *in-vitro* Befruchtung stammen. Die MO-HMGN2-injizierten Embryonen zeigen alle starke Missbildungen (b-d und b'-d'). Die Kontroll-Embryonen (a, a') und die mit einem Kontroll-Morpholino (MO-control) injizierten Embryonen (e, e') dagegen zeigen keine Entwicklungsstörung. Eichstrich: 1,5mm.

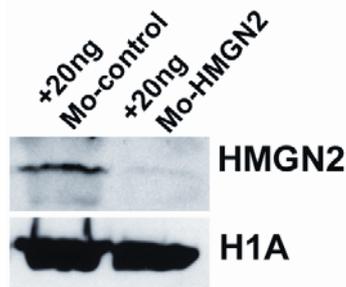
Unbehandelte Embryonen genauso wie die Kontroll-Morpholino-injizierten Embryonen entwickelten sich normal (Abb. 46a, a' und e, e'), Dies beweist, dass die Morpholinos an sich nicht toxisch für den Embryo sind. Die MO-HMGN2-injizierten Embryonen dagegen zeigten schwere Missbildungen. Die schwersten Missbildungen waren bei der Injektion von 40 ng MO-HMGN2 zu sehen, wobei nur 2 Embryonen von 8 das späte Schwanzknospenstadium erreichten (Abb. 46d, d'). Nach Injektion von 10 ng MO-HMGN2 waren leichte Missbildungen zu beobachten und einige zeigten keinerlei Störungen in der Entwicklung (Abb. 46b, b'). Nach Injektion von 20 ng MO-HMGN2 zeigten sich schwere Missbildungen an den Embryonen und dennoch erreichten alle das späte Schwanzknospenstadium (Abb. 46c, c'). Da die Missbildungen auch in späteren Entwicklungsstadien analysiert werden sollten, stellte sich die Injektion von 20 ng MO-HMGN2 pro Embryo als die am besten geeignete Menge für die „knock-down“ Experimente heraus.

Injektion pro Zygote	Gesamtanzahl der untersuchten Embryonen	Anzahl der Embryonen, die NF 35 erreichten	Anzahl der Embryonen mit Missbildungen (NF35)	Anzahl der Embryonen ohne Missbildungen (NF35)
10ng MO-N2	<b>45</b>	<b>42</b>	<b>17 (40%)</b>	<b>25 (60%)</b>
20ng MO-N2	<b>183</b>	<b>152</b>	<b>123 (80%)</b>	<b>29 (20%)</b>
40ng MO-N2	<b>45</b>	<b>20</b>	<b>20 (100%)</b>	<b>0</b>
20 ng MO-control	<b>175</b>	<b>154</b>	<b>6 (4%)</b>	<b>148 (96%)</b>
40ng Mo-control	<b>45</b>	<b>42</b>	<b>0</b>	<b>42 (100%)</b>
Unbehandelt	<b>485</b>	<b>422</b>	<b>21 (5%)</b>	<b>401 (95%)</b>

**Tabelle 4.2:** Häufigkeit der Phänotypen nach Injektion von Morpholino-Oligos in die Zygote von *Xenopus laevis*.

#### 4.4.5.2 Überprüfung der Wirksamkeit der Morpholino-Injektionen durch Western Blot Analyse

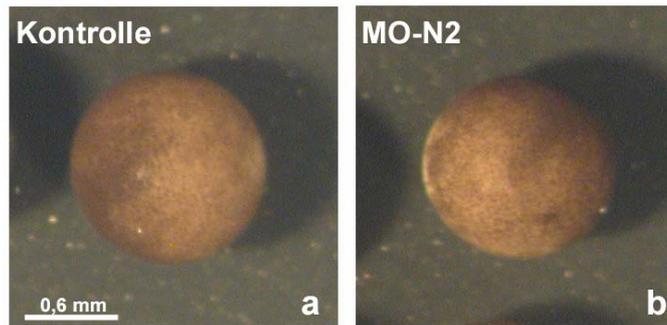
Um zu überprüfen, ob eine MO-HMGN2 Injektion tatsächlich eine verringerte HMGN2 Proteinmenge noch in Gastrulastadien verursacht, wurden jeweils 20 ng MO-HMGN2 oder 20 ng Kontroll-Morpholinos in die Zygote injiziert und aus Gastrulastadien (NF12) die PCA-löslichen Proteine extrahiert. Die Proteine wurden im SDS-Acrylamidgel (15%) gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem anti-XHMGN2-Antiserum S388 (Verdünnung 1:2000) inkubiert. Wie man aus der Abbildung 47 entnehmen kann, ist die HMGN2 Proteinmenge in Gastrula-Embryonen nach MO-HMGN2-Injektion deutlich niedriger als nach Injektion der MO-Kontrolle. Andere Proteine wie beispielsweise Histon H1 werden nicht reduziert, was auf die Spezifität der MO-HMGN2-Oligonukleotide hinweist. Die Western-Analysen zeigten, dass die endogene HMGN2 Proteinmenge in MO-HMGN2-injizierten Embryonen während der Gastrula deutlich erniedrigt ist.



**Abb.47:** Nachweis der verringerten HMGN2 Proteinmenge in MO-HMGN2-injizierten Embryonen (20ng) durch Western Blot Analyse. Als Kontrolle wurde ein Kontroll-Morpholino injiziert (20ng). Die in 5% PCA-löslichen Proteine aus je 30 MO-HMGN2-injizierten bzw. MO-control-injizierten Gastrulae wurden im SDS-Acrylamidgel (15%) gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde dann mit Antikörpern inkubiert, die gegen XHMGN2 und H1A gerichtet waren. Die untere Reihe zeigt, dass die Menge an Histon H1A auch nach Injektion von 20 ng MO-HMGN2 unverändert blieb (Beladungskontrolle).

#### 4.4.5.3 Phänotyp-Analyse von XHMGN2 „knock-down“ Embryonen vor der Midblastula Transition

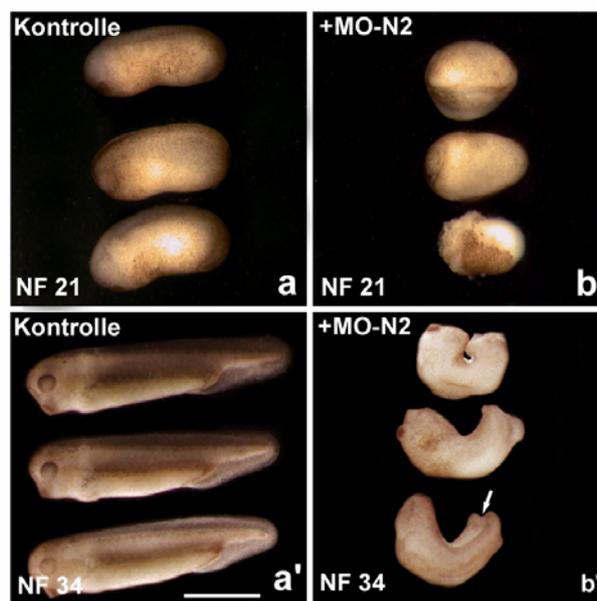
Zur näheren Analyse der XHMGN2 „knock-down“ Phänotypen wurden 20 ng MO-HMGN2 injiziert und die Entwicklung mit Zeitrafferaufnahmen verfolgt und einzelne Entwicklungsstadien dokumentiert (Abb. 48). Geschwisterembryonen, denen 25 nl PBS injiziert wurde (Kontrolle), wurden als Vergleich herangezogen. Die Entwicklung der MO-HMGN2-injizierten und der unbehandelten Embryonen verlief synchron, wie schon bei HMGN-injizierten Embryonen beobachtet wurde (4.4.3). Es gab keine Veränderung im Zeitablauf der Furchungen und der frühen embryonalen Entwicklung. Da die Translation der mRNA von HMGN erst nach der Midblastula Transition beginnt und die Morpholinos die Translation von HMGN mRNA verhindern soll, ist dieses Ergebnis auch zu erwarten.



**Abb.48:** Gezeigt sind späte Blastulastadien (a, b; NF9) nach Injektion von 20 ng MO-HMGN2 (b) in die Zygote. Die Kontrolle wurde mit Puffer injiziert (a). Die Injektion von MO-HMGN2 hat keinerlei Auswirkungen auf die Entwicklung bis zur Blastula.

#### 4.4.5.4 Phänotyp-Analyse von XHMGN2 „knock-down“ Embryonen nach der Midblastula Transition

Embryonen, die mit 20 ng MO-HMGN2 injiziert wurden, zeigten genau wie HMGN2-injizierte Embryonen erste Missbildungen ab der Gastrula. Doch anders als bei der Erhöhung der HMGN Proteinmenge hatten die MO-HMGN2-injizierten Embryonen im frühen Schwanzknospenstadium zunächst keine verdrehte Körperachse, sondern zeigten eine starke Dorsalisierung (Abb. 49b).



**Abb.49:** Phänotypen nach Injektion von 20ng Morpholinos. Gezeigt sind frühe Schwanzknospenstadien (NF21, a, b) und späte Schwanzknospenstadien (NF34, a', b') von MO-control-injizierten (a, a') und MO-HMGN2-injizierten Geschwisterembryonen (b, b'). Die Verringerung der HMGN2 Proteinmengen im sich entwickelnden Embryo führt zu Missbildungen. Es ist eine starke Dorsalisierung der Embryonen im Stadium NF21 zu beobachten (b). Eichstrich: 1,2mm (a).

Interessanterweise glichen sich die späten Schwanzknospenstadien (NF34) von MO-HMGN2-injizierten Embryonen und von HMGN2-injizierten Embryonen dann wieder (Abb. 49b', Abb. 35e'). Die MO-HMGN2-injizierten Embryonen wiesen im Schwanzknospenstadium einen offenen Rücken (Pfeil, Abb. 49b'), eine verkürzte und gebogene Körperachse sowie eine gestörte Kopf- und Augenentwicklung auf, genauso wie die HMGN2-injizierten Embryonen. Die MO-HMGN2-injizierten Embryonen zeigten allerdings im Vergleich zu HMGN2-injizierten Embryonen eine geringere Expressivität des Phänotyps. Dies macht deutlich, dass Wegnahme und Zugabe von HMGN Proteinen auf die Steuerung der gleichen Entwicklungsschritte Einfluss nehmen.

#### **4.4.5.5 Spezifität der Morpholino-induzierten Missbildungen – „rescue“ Experimente**

Um die Spezifität der Morpholino-induzierten Missbildungen zu belegen, wurde überprüft, ob sie durch gleichzeitige Injektion von HMGN Proteinen verhindert werden können. Es wurde also versucht, durch die Koinjektion von rekombinantem HMGN2 Protein die HMGN2 Proteinmengen im knock-down Embryo auf „Normalniveau“ zu halten um so den Embryo zu „retten“. Im Idealfall sollte sich der Kontrollphänotyp einstellen. Dies würde unterstreichen, dass die beobachteten Missbildungen allein durch die Verringerung der HMGN2 Proteinmengen entstanden sind. Die Menge an koinjiziertem rekombinantem HMGN2 Protein wurde aufgrund folgender Überlegung bestimmt: Eine Blastula, dem Entwicklungsstadium in dem die HMGN Proteinmenge kritisch zu sein scheint, besteht aus ca. 5000 Zellen. Eine *Xenopus*-Zelle enthält ca. 6 pg chromosomale DNA. Unter der Annahme eines DNA / Histon-Verhältnisses von 1:1 im Chromatin und eines Anteils von 1% HMGN Protein an den Histonproteinen, enthält eine Zelle 0,06 pg HMGN2. 5000 Zellen (Blastula) würden daher 300 pg HMGN2 enthalten.

Die Koinjektion von 300 pg HMGN Protein sollte somit die HMGN Proteinmenge einer knock-down Blastula annähernd normalisieren. In die Zygote von *Xenopus laevis* wurden deshalb 20 ng MO-N2 zusammen mit 300 pg rekombinantem menschlichem HMGN2 koinjiziert und die Entwicklung mit Zeitrafferaufnahmen verfolgt und einzelne Entwicklungsstadien dokumentiert (Abb. 50). Unter diesen Bedingungen waren die schweren Missbildungen, wie bei einer alleinigen Injektion von 20 ng MO-N2 zu beobachten, nicht mehr vorhanden (19 von 21 Embryonen). Die Embryonen hatten zwar einen leicht verkürzten Schwanz, jedoch waren keine verbogenen Körperachsen oder Deformationen im Kopfbereich wie in knock-down Embryonen zu erkennen (vergleiche Abb. 49b' mit Abb. 50b'). Man kann also sagen, dass durch eine Koinjektion von 300 pg rekombinantem HMGN2 Protein zusammen mit 20 ng MO-N2 die Embryonen vor schweren Missbildungen gerettet wurden. Dies zeigt eindeutig die Spezifität der MO-N2-induzierten Missbildungen. Interessanterweise wurde bei der

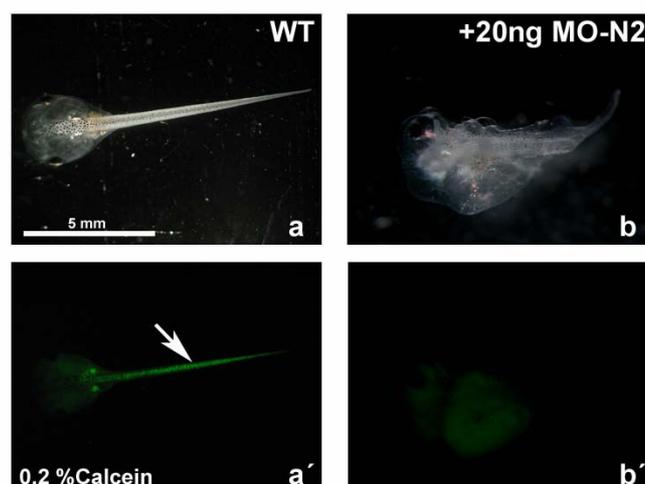
Koinjektion von 3 ng rekombinantem HMGN2 Protein zusammen mit 20 ng MO-HMGN2 ähnliche Phänotypen beobachtet wie bei einer alleinigen Injektion von 3ng rekombinantem HMGN2 (14 von 14 Embryonen). Zusammengenommen zeigen diese Resultate, dass die HMGN Proteinmenge für eine korrekte Entwicklung exakt reguliert sein muss und eine Erhöhung oder Erniedrigung der HMGN Proteinmenge zu schweren Entwicklungsdefekten führt.



**Abb.50:** Entwicklungsrettung von HMGN2 knock-down Embryonen. Injektion von 20 ng MO-HMGN2 zusammen mit 300 pg HMGN2 Protein (b) führt zu einer deutlichen Schwächung der Phänotypen im Vergleich zu einer alleinigen Injektion von MO-HMGN2 in die Zygote von *Xenopus* (vergleiche Abb. 49b'). Dagegen führt eine Injektion von 20 ng MO-HMGN2 zusammen mit 3 ng HMGN2 Protein zu ähnlichen Missbildungen wie für HMGN2-injizierte Embryonen gefunden (c, vergleiche Abb. 35e''). Als Kontrolle wurden 20 ng MO-control in die Zygote injiziert (a). Eichstrich: 1,2mm (a).

#### 4.4.5.6 Calcein-Färbung zur Analyse der Knochenbildung von MO-N2 injizierten Embryonen

Wie auch für HMGN-injizierte Embryonen (siehe 4.4.4.5) wurde eine nähere Analyse der knock-down Phänotypen mittels einer Calcein-Färbung durchgeführt, welche verknöcherte Skelettstrukturen hervorhebt.

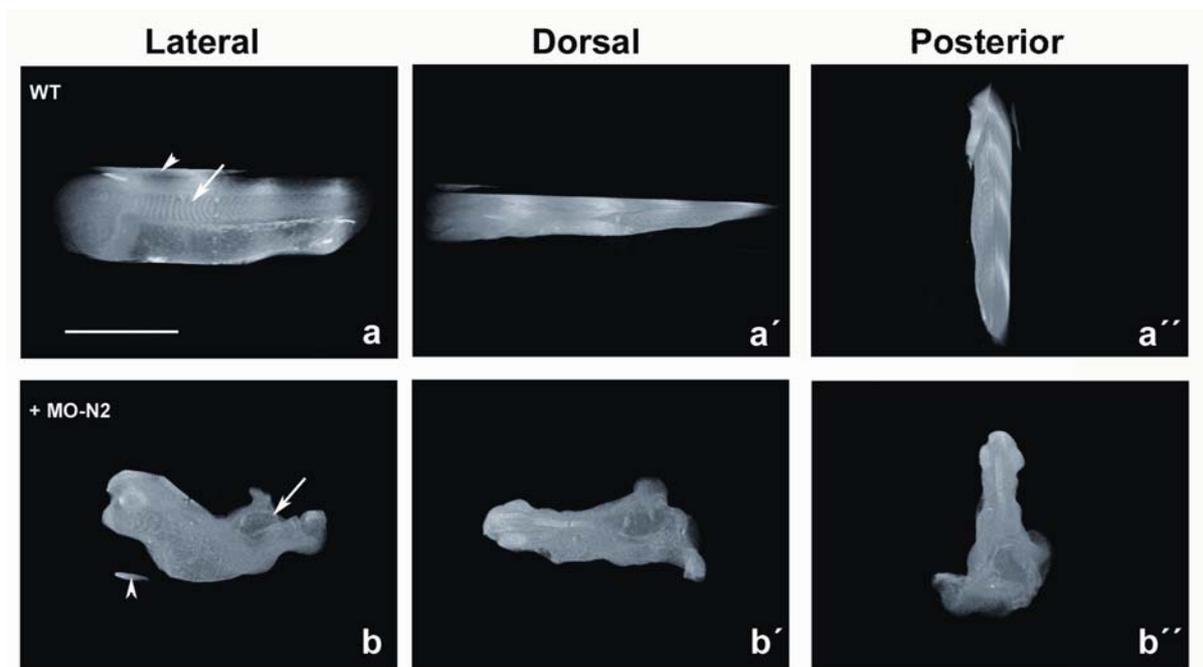


**Abb.51:** Knochenbildung in knock-down Embryonen. Unbehandelte (a, a') und MO-HMGN2-injizierte (b, b') Embryonen wurden in 0,2% Calcein inkubiert und anschließend gewaschen. Zu sehen sind die Embryonen im Hellfeld (a, b) und die Fluoreszenzaufnahmen des an verknöcherten Skelettstrukturen gebundenen Calceins (a', b'). Der Pfeil zeigt die Wirbelsäule der Kaulquappe an (a'). Durch die Verringerung der HMGN Proteinmenge unterbleibt die Ausbildung der Wirbelsäule (b').

Die Wirbelsäule der unbehandelten Embryonen ist 5 Tage nach der Befruchtung bereits ausgebildet (Abb. 51a'). Bei einer Injektion von 20 ng MO-HMGN2 ist dagegen eine Wirbelsäule nicht erkennbar (Abb. 51b'). Wie schon nach einer erhöhten HMGN Proteinmenge (siehe 4.4.4.5) kommt es auch nach einer Verringerung von HMGN Proteinen zu einer Störung der Knochenbildung (Abb. 51b').

#### 4.4.5.7 Phänotyp-Analyse von XHMGN2 „knock-down“ Embryonen mittels Magnetresonanz-Mikroskopie

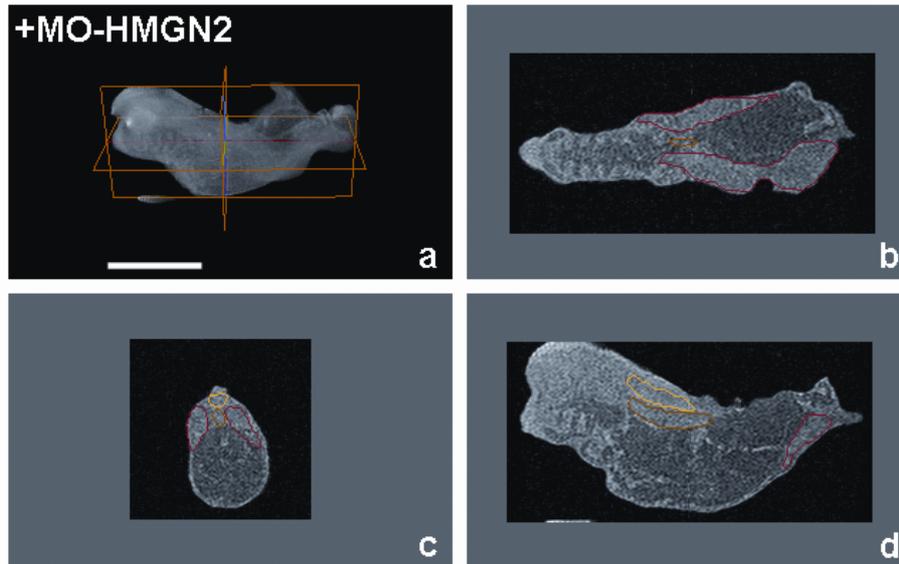
Um die Morphologie von MO-HMGN2-injizierten Embryonen dreidimensional darstellen zu können, wurden sie mittels der Magnetresonanz-Mikroskopie näher untersucht (HMGN1- bzw. HMGN2-injizierten Embryonen wurden in gleicher Weise analysiert, siehe Abb. 43 und 44). Dazu wurden MO-HMGN2-injizierte Embryonen wie unter 4.4.4.6 beschrieben vermessen und die Daten mit Amira™ 3.0 bearbeitet. Animierte Bilder der dreidimensional rekonstruierten knock-down Embryonen sind auf der beigelegten CD einsehbar. Momentaufnahmen verschiedener Ansichten sind in Abbildung 52 zu sehen.



**Abb.52:** Bilder von MO-HMGN2-injizierten (b-b'') und unbehandelten Embryonen (a-a''), die durch Magnetresonanz-Mikroskopie hergestellt wurden. Die Myotom-Segmentierung unbehandelter Embryonen ist deutlich zu sehen (a, Pfeil), im Gegensatz zu knock-down Embryonen, bei denen eine Myotom-Segmentierung fehlt. Deutlich ist der offene Rücken des knock-down Embryos zu sehen (b, Pfeil). Anzumerken ist, dass bei der Messung der Embryonen eine Datenverschiebung auftrat, die nicht korrigiert werden konnte (a, b, Pfeilkopf). Eichstrich: 1,2 mm (a).

Wie der Abbildung 51 zu entnehmen ist, ist die Myotomentwicklung der knock-down Embryonen gestört, da keine klare Segmentierung zu erkennen ist. Der charakteristische offene Rücken („Spina bifida“-Phänotyp), der bei HMGN-injizierten Embryonen schon zu beobachten war, ist auch hier zu erkennen. Ebenfalls weist der knock-down Embryo eine

stark verkürzte und gebogene Körperachse auf. Die virtuellen Schnitte der 3D-rekonstruierten Embryonen zeigen erneut, dass die Myotome in knock-down Embryonen zwar gebildet werden, aber ihre Anordnung im Vergleich zu Kontroll-Embryonen unsegmentiert und unorganisiert ist (Abb. 53). Die Chorda und das zentrale Nervensystem sind ebenfalls im Vergleich zu unbehandelten Embryonen verkümmert, zeigen aber im Vergleich zu HMGN-injizierten Embryonen weniger starke Missbildungen im Kopfbereich.



**Abb.53:** Virtuelle Schnitte eines 3D-rekonstruierten knock-down injizierten Embryos. Zu sehen sind der gesamte Embryo mit allen Schnittebenen (a), ein horizontaler Schnitt (b), ein transversaler Schnitt (c) und ein sagittaler Schnitt (d). Die Myotome sind Rot, das Nervensystem Gelb und die Chorda Orange markiert. Die Markierungen wurden mittels der Software Amira™ 3.0 generiert. (b) Die Lage des Myotombereichs ist noch zu erkennen, eine eindeutige Segmentierung aber fehlt. (c) Im transversalen Schnitt wurden die Chorda, die Lage der Myotome und das zentrale Nervensystem identifiziert. (d) Im transversalen Schnitt sind das zentrale Nervensystem, die Chorda und die Myotompackete zu erkennen. Die Anordnung der Myotome ist im Vergleich zu Kontrollen völlig verschoben (vergleiche Abb. 42). Eichstrich: 1,2 mm (a).

### 4.5 Analyse der molekularen Ursachen der HMGN-abhängigen Embryonaldefekte

Wie in 4.4.4 und 4.4.5 ausführlich dargestellt, verursacht sowohl eine Erhöhung als auch eine Erniedrigung der embryonalen HMGN Proteinmengen eine fehlerhafte Embryonalentwicklung mit zum Teil extremen phänotypischen Veränderungen. Insbesondere die „rescue“-Experimente belegen, dass die HMGN Proteinmengen während der frühen embryonalen Entwicklung von *Xenopus laevis* zu bestimmten Zeitpunkten exakt reguliert werden müssen, um eine korrekte Embryonalentwicklung zu gewährleisten. Welche molekularen Prozesse durch die erhöhte bzw. verringerte HMGN Proteinmenge während der frühen embryonalen Entwicklung gestört werden, war nun die nächste Frage. Die differentielle Genaktivität ist eine Grundlage von embryonalen Entwicklungsprozessen, wobei die Struktur und die Zusammensetzung des Chromatins eine sehr wichtige Rolle spielen

(zusammengefasst von Patterton und Wolffe, 1996). Da HMGN Proteine Architekturelemente des Chromatins darstellen und sie damit die Genexpression beeinflussen, könnte eine veränderte HMGN Proteinmenge die kontrollierte differentielle Genaktivität stören und die beobachteten Phänotypen hervorrufen. Bei Mäusen wurde durch eine Verdrängung der HMGN Proteine eine niedrigere RNA-Synthese während der frühen embryonalen Entwicklung festgestellt (Mohamed et al., 2001). Dies ist ein Hinweis auf eine mögliche Beeinflussung der embryonalen Genexpression durch HMGN Proteine.

### 4.5.1 Globale Veränderungen des Chromatins ?

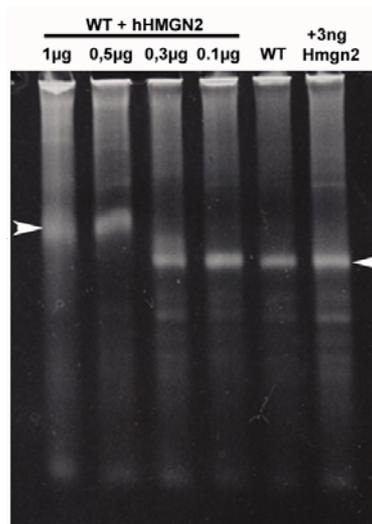
Eine mögliche Ursache für die beobachteten Embryonaldefekte nach Injektion von HMGN Protein bzw. MO-HMGN2 in die Zygote von *Xenopus laevis*, könnte eine globale Veränderung des Chromatins sein. In einer durchschnittlichen eukaryontischen Zelle befinden sich ca.  $1 \times 10^5$  HMGN1- und HMGN2-Moleküle. Damit sind weniger als 2% der Nukleosomen (ca.  $1-2 \times 10^6$ /Zelle) mit HMGN Proteinen assoziiert. Bei einer extrem erhöhten bzw. erniedrigten Proteinmenge könnte sich demnach die Zusammensetzung des gesamten Chromatins verändern. Bei einer Zugabe von 2  $\mu$ g HMGN2 Protein zu präparierten LBCs von *Xenopus laevis* wurde zum Beispiel beobachtet, dass sich das Chromatin der Lampenbürstenchromosomen stark kondensierte und die Schleifen retrahierten (siehe 4.3.1.4, Abb. 25). Die stark erhöhte HMGN Menge führte in diesem Fall also nicht zu einem Öffnen des Chromatins, sondern sogar zum gegenteiligen Effekt. Es musste also untersucht werden, ob die beobachteten Effekte in den manipulierten Embryonen durch eine globale Umstrukturierung der Chromatinarchitektur hervorgerufen wurden. Dies gilt insbesondere, da die in die Zygote injizierten HMGN Proteine schon während der Furchungsteilung präsent waren. Sie könnten demnach die globale Struktur des embryonalen Chromatins schon während der Furchungsteilungen so verändert haben, dass mit Beginn der Midblastula Transition fehlerhaft zusammengesetztes und damit nicht funktionelles Chromatin vorliegt und eine korrekte Entwicklung unmöglich macht. Es wurde deshalb die Struktur des embryonalen Chromatins auf drei Arten überprüft. Erstens wurde nach Überexpression von XHMGN2-EGFP Fusionsproteinen das Chromatin lichtmikroskopisch analysiert (4.5.1.1). Zweitens wurde versucht, die Zusammensetzung embryonaler Nukleosomen mit einem Nukleoprotein Assay zu untersuchen (4.5.1.2). Drittens wurde ein möglicherweise umstrukturiertes embryonales Chromatin auf seine Nuklease-Zugänglichkeit überprüft (4.5.1.3).



#### 4.5.1.2 Nukleoprotein-Assay

Der Nukleoprotein Assay ermöglicht es, die Zusammensetzung embryonaler Nukleosomen und nukleosomal gebundene Proteine nachzuweisen (Pennings, 1999). Dabei wird Chromatin durch die Micrococcus Nuklease verdaut, wobei Mononukleosomen und Polynukleosomen entstehen. Mit Hilfe dieses Ansatzes sollte versucht werden, an Nukleosomen gebundene HMGN Proteine in HMGN-injizierten Embryonen und in unbehandelten Embryonen nachzuweisen.

50 befruchtete Eizellen wurden mit 3 ng HMGN2 injiziert. Nach Erreichen des Blastula-Stadiums (NF9) wurden die Zellkerne isoliert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Geschwisterembryonen. Aus den isolierten Zellkernen wurden durch Verdau mit Micrococcus Nuklease (20U/mg, 25°C, 15 min) und mehreren Zentrifugationsschritten die Mononukleosomen und Polynukleosomen isoliert. Die Zusammensetzung des isolierten Chromatins wurde dann in einem nativen Polyacrylamidgel analysiert. Nukleosomen mit gebundenen HMGN Proteinen sollten im Vergleich zu HMGN-freien Nukleosomen langsamer laufen. Um die Empfindlichkeit des Ansatzes zu überprüfen, wurde isoliertes Chromatin aus unbehandelten Embryonen mit unterschiedlichen Mengen an rekombinantem hHMGN2 versetzt und vor der Gelelektrophorese 20 min auf Eis inkubiert.



**Abb.55:** Micrococcus Nuklease Verdau von isoliertem Chromatin aus unbehandelten (WT) und 3ng HMGN2-injizierten (+3ng HMGN2) Embryonen. Aus je 50 Embryonen im Stadium NF9 wurden die Zellkerne isoliert, das Chromatin mit 20 U/mg DNA Micrococcus Nuclease 10 min bei 24°C verdaut, mehrmals zentrifugiert und das Chromatin in einem nativen Polyacrylamidgel (15%) aufgetrennt. Als Kontrolle wurde wildtypisches Chromatin vor dem Beladen mit verschiedenen Konzentrationen an rekombinantem hHMGN2 (15 min; auf Eis) inkubiert (1µg, 0,5µg, 0,3µg und 0,1µg). Nach dem Lauf wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert. Bei Inkubation des wildtypischen Chromatins mit 1µg und 0,5µg hHMGN2 ist ein Shift der nukleosomalen Partikel zu erkennen, was durch die Bindung von hHMGN2 an den Nukleosomen entsteht. Bei einer Inkubation von 0,3µg und 0,1µg hHMGN2 mit dem wildtypischen Chromatin ist kein Shift mehr zu erkennen (linker Pfeil). Das wildtypische Chromatin und das Chromatin aus HMGN2-injizierten Embryonen zeigt nach einem Micrococcus Verdau keine erkennbaren Unterschiede (rechter Pfeil).

Wie Abbildung 55 zeigt, ist nach Zugabe von 0,5µg oder 1µg hHMGN2 zum Chromatin von 50 Embryonen ein im Vergleich zu unbehandeltem Chromatin retardiertes Laufverhalten der Nukleosomen zu erkennen. Dies deutet auf gebundene HMGN Proteine hin, die den Lauf der Nukleosomen verlangsamen (linker Pfeil, Abb. 55). Bei einer zugegebenen Menge von 300 bzw. 100ng hHMGN2 war bereits kein Shift mehr zu erkennen. Das wildtypische Chromatin und das Chromatin aus HMGN2-injizierten Embryonen zeigte nach einem Micrococcus Verdau keine erkennbaren Unterschiede (rechter Pfeil, Abb. 55). Da das Chromatin aus 50 Embryonen isoliert wurde, denen wiederum je 3 ng HMGN2 pro Embryo injiziert wurden, kann maximal 150ng HMGN2 mit dem aufgetragenen Chromatin assoziiert sein.

Nach den Ergebnissen der Konzentrationsreihen mit wildtypischen Chromatin muss man aber davon ausgehen, dass es nicht möglich ist mit diesem Ansatz Unterschiede der Nukleosomen zu erkennen. Diese Methode ist also nicht sensitiv genug, eine durch HMGN-Injektion hervorgerufene Veränderung des embryonalen Chromatins nachzuweisen.

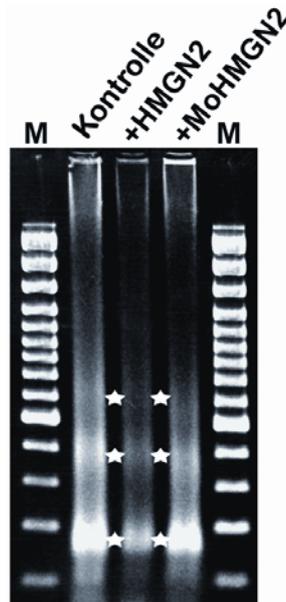
### **4.5.1.3 Micrococcus Nuklease Verdau von embryonalem Chromatin nach Manipulation der HMGN Proteinmengen**

Eine weitere Möglichkeit, Umstrukturierungen des embryonalen Chromatins zu überprüfen, beruht auf der Nuklease-Zugänglichkeit. Die Micrococcus Nuklease schneidet DNA nur an Positionen, an denen sie freien Zugang hat. Bei intaktem Chromatin entstehen so ca. 146 bp-Fragmente oder ein Vielfaches davon. Diese DNA-Fragmente sind in einem Agarosegel in einem typischen Leitemuster angeordnet. Ist das Chromatin durch assoziierte Proteine unzugänglicher bzw. werden Bereiche zugänglicher, beispielsweise durch Bindung von HMGN Proteinen oder durch erhöhte Transkriptionsaktivität, erhält man ein unterschiedliches Chromatin-Verdauungsmuster. Die Micrococcus Nuklease-Zugänglichkeit des embryonalen Chromatins wurde in Kontroll- und HMGN-manipulierten Embryonen verglichen.

Dazu wurden die Zellkerne aus je 50 unbehandelten, mit 3ng HMGN-injizierten oder mit 20 ng MO-HMGN2-injizierten Embryonen (Stadium NF9) isoliert. Die Kerne wurden mehrmals gewaschen, sedimentiert und im Nuklease-Verdau-Puffer resuspendiert. Das Chromatin der Kerne wurde dann mit 0,7 U/µl Micrococcus Nuklease 10 min bei 24°C verdaut. Die Reaktion wurde mit einem EDTA-Puffer (0,5 M) abgestoppt und anschließend mit RNase (10 µg) 30 min bei 37°C inkubiert. Schließlich wurden die Kerne noch 1 h bei 37°C mit 0,5 µg/µl Proteinase K verdaut. Mit einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die vor dem Verdau geschützte DNA isoliert und in einem 2%igen Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht mit einer Polaroidkamera fotografiert.

Abbildung 56 zeigt die isolierten DNA-Fragmente, die aus unbehandelten, HMGN2- oder MO-HMGN2 -injizierten Embryonen nach Micrococcus Nuklease Verdau erhalten wurden. Zu

erkennen ist die 146bp-DNA-Bande und vielfache davon (entspricht der nukleosomalen DNA aus Mono-, Di- und Trinukleosomen, Abb. 56, Sterne). Das Chromatin aus unbehandelten und HMGN-manipulierten zeigt ein gleichartiges Verdauungsmuster. Dies spricht gegen eine globale Veränderung der embryonalen Chromatinzusammensetzung nach Manipulation der HMGN Proteinmengen. Die Zugänglichkeit für Nukleasen (in diesem Fall die *Micrococcus* Nuklease) bei unbehandelten, HMGN2- oder MO-HMGN2-injizierten Embryonen blieb unverändert. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass HMGN Proteine das Chromatin nur lokal verändern, was durch diesen Ansatz nicht erfasst werden kann. Die Analyse zeigt allerdings klar, dass die Zusammensetzung des embryonalen Chromatins auf globaler Ebene durch veränderte HMGN Proteinmengen nicht beeinflusst wird.



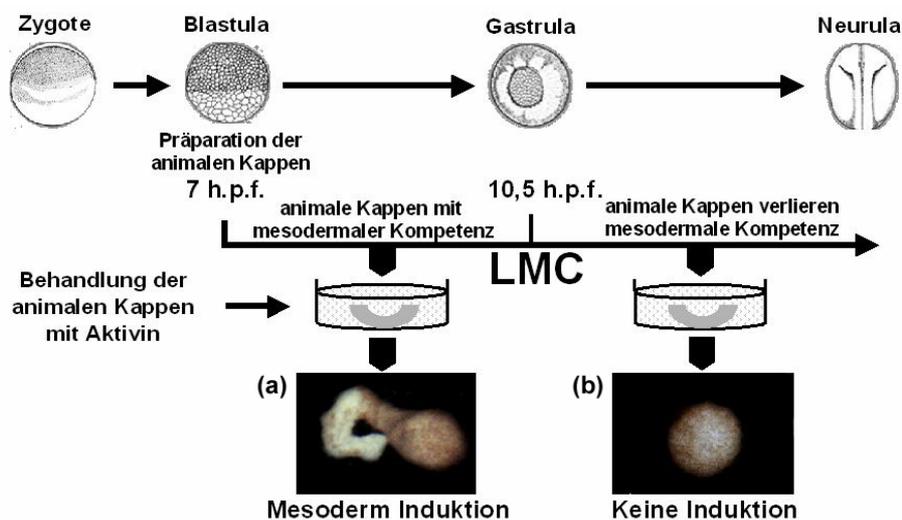
**Abb.56:** *Micrococcus* Nuklease Verdau von isoliertem Chromatin aus unbehandelten (Kontrolle), mit 3ng HMGN2-injizierten und 20 ng MO-HMGN2-injizierten Embryonen. Aus je 50 Embryonen im Stadium NF9 (späte Blastula) wurden die Zellkerne isoliert, das Chromatin mit 0,7 U/ $\mu$ l *Micrococcus* Nuklease 10 min bei 24°C verdaut, die vor dem Verdau geschützte DNA isoliert und in einem 2%igen Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert. Als Größenmarker wurde 1  $\mu$ g einer 100 bp DNA-Leiter (Spur M) aufgetragen. Die Sterne markieren isolierte DNA-Fragmenten aus Mono-, Di- und Trinukleosomen. Das gleichartige Chromatin-Verdauungsmuster von Chromatin aus Kontroll- und manipulierten Embryonen spricht gegen eine globale Veränderung des Chromatins nach Manipulation der HMGN Proteinmengen.

### 4.6 Mögliche Einflüsse auf die Expression spezifischer Gene

Obwohl keine globalen Veränderungen am Chromatin nach Erhöhung bzw. Erniedrigung der HMGN Proteinmengen festgestellt wurden, lassen sich lokale Veränderungen nicht ausschließen, die mit den angewendeten Methoden nicht detektierbar waren. Derartige lokale Veränderungen könnten direkten Einfluss auf die Expression entwicklungsrelevanter Gene haben. Es wurde deshalb untersucht, ob Veränderungen der HMGN Proteinmengen die Transkription bestimmter Gene beeinflussen.

#### 4.6.1 Einfluss der HMGN Proteine auf die Expression mesodermaler Gene im „animal cap assay“

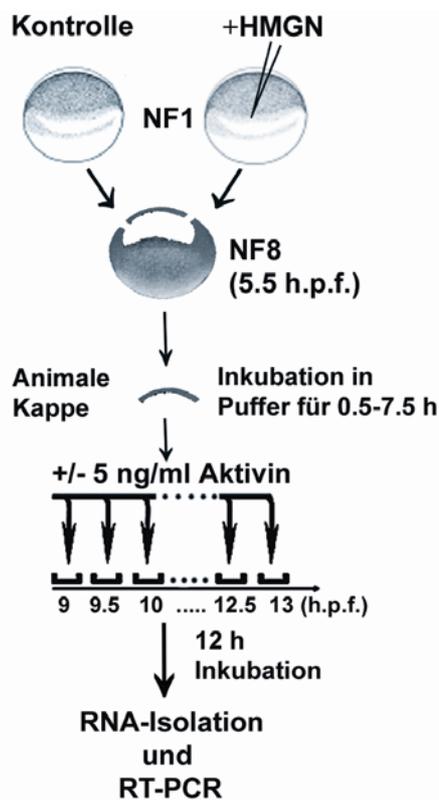
Die vorhergehenden Ergebnisse, wie die erhöhte Expression der HMGN Proteine im Mesoderm (4.3.2.4), die fehlerhafte Expression von *XMyoD* in HMGN-injizierten Embryonen (4.4.4.3), die reduzierte Entwicklung der Myotome (4.4.4.2 und 4.4.4.3) und die morphologischen Veränderungen, dargestellt durch die Magnetresonanz-Bildgebung (4.4.4.6 und 4.4.5.7), deuten auf einen Einfluss der HMGN Proteine auf die Expression Mesoderm-spezifischer Gene an. Um dies im Detail zu untersuchen, wurde der „animal cap assay“ durchgeführt. Dazu wird die animale Kappe einer Blastula (NF7) isoliert, die nur aus ektodermalen Zellen besteht. Isoliert entsteht aus einer animale Kappe eine Cilien-besetzte ektodermale Epidermiskugel. Gibt man aber innerhalb eines Induktionszeitfensters einen Wachstumsfaktor der TGF $\beta$ -Familie, wie beispielsweise Aktivin, zum Kulturmedium, wird die Expression von Mesoderm-spezifischen Genen induziert und die Zellen der animalen Kappe werden von ektodermalen zu mesodermalen Zellen umprogrammiert (Smith et al., 1990; Gurdon et al., 1994). 10,5 Stunden nach der Befruchtung ist auch mit Zugabe von Aktivin keine Induktion mehr möglich und die Fähigkeit der animalen Zellen, auf TGF $\beta$ -Wachstumsfaktoren zu reagieren, geht verloren. Dies wird als „loss of mesodermal competence“ bezeichnet (LMC, Jones und Woodland, 1987; Grainger und Gurdon, 1989; Abb. 57).



**Abb.57:** Schematische Darstellung des „animal cap assay“. Die animale Kappe besteht aus ektodermalen Zellen, die isoliert eine Cilien-besetzte Epidermiskugel bildet, also Ektoderm bleibt (b). Gibt man aber innerhalb eines Induktionszeitfensters TGF $\beta$ -Wachstumsfaktoren (Aktivin) zum Kulturmedium, kommt es zur Induktion von Mesoderm (a). Die Mesoderminduktion ist durch morphologische Veränderungen, wie lange Auswüchse, erkennbar. Diese Induktion kann aber nur in einem bestimmten Zeitfenster stattfinden. 10,5 Stunden nach der Befruchtung ist auch mit Zugabe von Aktivin keine Induktion mehr möglich, was als „loss of mesodermal competence“ (LMC) bezeichnet wird. (h.p.f. = hours post fertilisation).

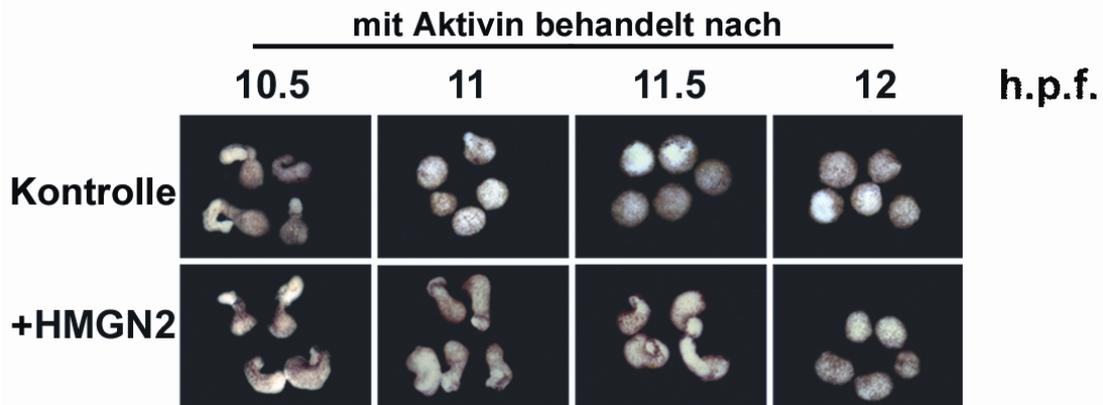
Dieser Ansatz bietet die Möglichkeit, den Einfluss von HMGN Proteinen auf die Expression Mesoderm-spezifischer Gene in einem Induktionsprozess zu verfolgen. Der „animal cap assay“ ist schematisch in Abbildung 57 dargestellt. Dazu wurden animale Kappen von unbehandelten und HMGN-injizierten Blastulae isoliert und für unterschiedliche Zeiten in Zellkultur-Medium gehalten, um sie schließlich mit 5 ng/ml Aktivin zu induzieren. Kontrollen und HMGN-injizierte Embryonen stammten stets aus der gleichen *in-vitro* Befruchtung.

Im Abstand von einer halben Stunde wurden aus den isolierten animalen Kappen je fünf in Zellkultur-Medium mit Aktivin umgesetzt und diese 12 Stunden bei 24°C inkubiert. Die Fähigkeit der animalen Zellen zur Mesoderminduktion wurde zunächst morphologisch bestimmt (siehe Abb. 59a; Symes und Smith, 1987). Weiterhin wurde aus den isolierten animalen Kappen die RNA isoliert und zur Expressionsanalyse Mesoderm-spezifischer Gene eine RT-PCR durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 58 veranschaulicht.



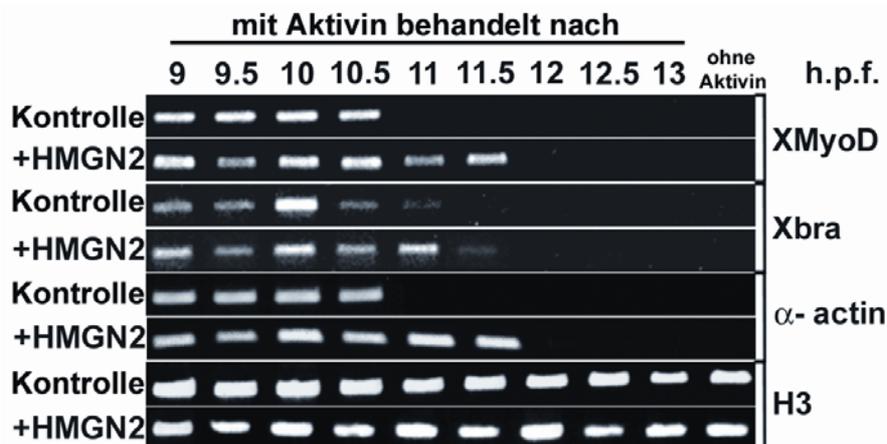
**Abb.58:** Animale Kappen wurden von unbehandelten bzw. HMGN-injizierten Geschwister-Blastulae isoliert. Nach einer Inkubation von 0,5 bis 7,5 Stunden in Puffer (ca. 6-13 Stunden nach der Befruchtung), wurde die Explantate für 12 Stunden 5 ng/ml Aktivin ausgesetzt. Die Analyse erfolgte einerseits unter Berücksichtigung morphologischer Kriterien, andererseits wurde aus den inkubierten animalen Kappen die RNA isoliert und die Expression Mesoderm-spezifischer Gene mittels RT-PCR untersucht (h.p.f. = hours post fertilisation).

Die morphologische Analyse der animalen Kappen wurde wie folgt durchgeführt. Findet eine Mesoderminduktion statt, kann man dies an Auswüchsen (Elongationen) der animalen Kappen erkennen. Wie erwartet wurden bei animalen Kappen aus Kontrollembryonen bis zu einem Alter von 10,5 Stunden nach der Befruchtung Auswüchse gefunden. Nach diesem Zeitpunkt verblieben die animalen Kappen rundlich, was mit dem Verlust der mesodermalen Kompetenz korreliert. Im Gegensatz dazu besaßen animale Kappen, die aus HMGN-injizierten Embryonen stammten, die Fähigkeit bis zu 11,5 Stunden nach der Befruchtung zu Mesoderm umprogrammiert zu werden (Abb. 59).



**Abb.59:** HMGN2 Injektion verlängert die mesodermale Kompetenz. Morphologie von unbehandelten animalen Kappen (obere Reihe) und von animalen Kappen aus HMGN2-injizierten Embryonen (untere Reihe), die in 5 ng/ml Aktivin 12 Stunden bei 24°C inkubiert wurden. Die Injektion von 3ng HMGN2 verlängert die mesodermale Kompetenz um 1 Stunde.

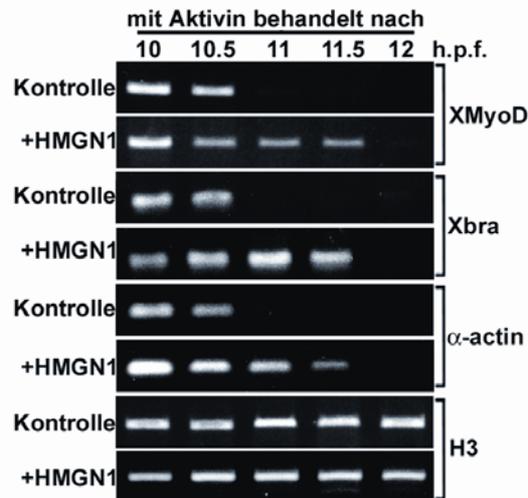
Die oben beschriebenen Ergebnisse legen einen Einfluss von HMGN Proteinen auf die Expression Mesoderm-spezifischer Gene im Aktivin-ausgelösten Umprogrammierungsprozess von Ektoderm zu Mesoderm nahe. Mit RT-PCR wurde deshalb die Expression Mesoderm-spezifischer Markergene, wie die Transkriptionsfaktoren *XMyoD* (Hopwood et al., 1989), *Xbra* (Smith et al., 1991) und dem Strukturprotein  $\alpha$ -actin (Stutz et al., 1986) untersucht. Als Kontrolle für die RT-PCR wurde die *Histon H3* Expression überprüft. Die entsprechenden Primer und PCR-Bedingungen sind im Anhang beschrieben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 60 dargestellt.



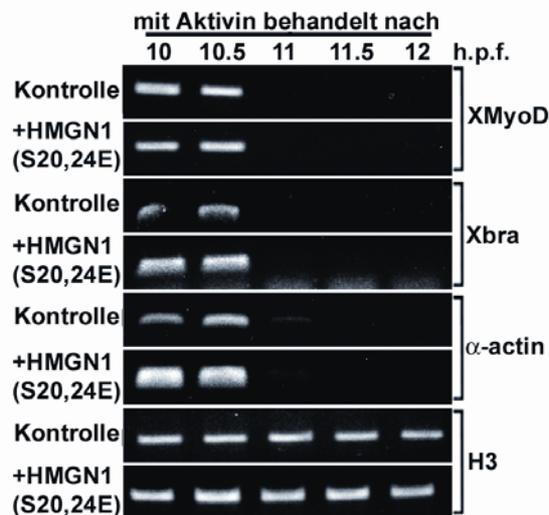
**Abb.60:** Expressionsanalyse Mesoderm-spezifischer Gene durch RT-PCR in isolierten animalen Kappen von unbehandelten bzw. HMGN2-injizierten Blastulae nach Aktivininduktion. Das Zeitfenster, in dem die Zellen bei Zugabe von 5 ng/ml Aktivin mit der Expression von *XmyoD*, *Xbra* und  $\alpha$ -actin reagieren, wurde bei HMGN2-injizierten Embryonen (+HMGN2) im Gegensatz zu unbehandelten (Kontrolle) um ca. 1 Stunde verlängert. In Abwesenheit von Aktivin konnte keine Expression der Mesoderm-spezifischen Gene gefunden werden (letzte Spalte, ohne Aktivin). Histon H3 wird beständig exprimiert und diente als Kontrolle für die Reverse Transkription.

In animalen Zellen aus HMGN2-injizierten Embryonen wurden Mesoderm-spezifische Gene wie *XmyoD*, *Xbra* und  $\alpha$ -actin bis 11,5 Stunden nach Befruchtung induziert. Im Vergleich dazu wurden in animalen Zellen aus unbehandelten Embryonen aus derselben *in-vitro* Befruchtung diese Mesoderm-spezifische Gene nur bis 10,5 bzw. 11 Stunden nach der

Befruchtung induziert (Abb. 60). Die Expressionsanalyse Mesoderm-spezifischer Gene zeigt also ebenfalls eine Verlängerung der mesodermalen Kompetenz um 1 Stunde in HMGN2-injizierten Embryonen (Abb. 60). Das gleiche Ergebnis wurde nach Injektion von HMGN1 gefunden. Auch hier wurde die mesodermale Kompetenz, im Vergleich zu unbehandelten Embryonen, um eine Stunde verlängert (Abb. 61).



**Abb.61:** Expression Mesoderm-spezifischer Gene in animalen Kappen von Kontroll- und HMGN1-injizierten Embryonen nach Aktivin (5ng/ml) Induktion. Analysiert wurde die Expression von *XmyoD*, *Xbra* und  $\alpha$ -actin. *Histon H3* wird beständig exprimiert und diente als Kontrolle für die Reverse Transkription. HMGN1 Injektion führt zu einer Verlängerung der mesodermalen Kompetenz in animalen Kappen um ca. 1 Stunde.



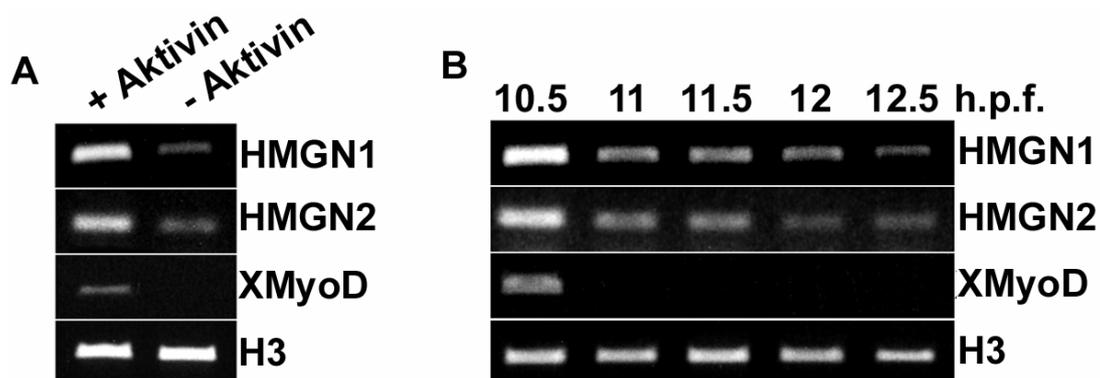
**Abb.62:** Expression Mesoderm-spezifischer Gene in animalen Kappen von Kontroll- und HMGN1S20,24E-injizierten Embryonen nach Aktivin (5ng/ml) Induktion. Analysiert wurde die Expression von *XmyoD*, *Xbra* und  $\alpha$ -actin. *Histon H3* diente als Kontrolle für die Reverse Transkription. Die Injektion des nicht funktionalen Proteins HMGN1S20,24E hatte keine Auswirkung auf das Zeitfenster der mesodermalen Kompetenz.

Zum Nachweis der Spezifität dieses Befundes wurden animale Kappen von Blastulae isoliert, denen das Protein HMGN1S20,24E injiziert wurde. HMGN1S20,24E ist durch zwei Punktmutationen in der nukleosomalen Bindungsdomäne nicht mehr in der Lage, an

Nukleosomen zu binden. Die Injektion dieses nicht-funktionellen HMGN Proteins hatte keine Auswirkungen auf das Zeitfenster der mesodermalen Kompetenz. Der Verlust der mesodermalen Kompetenz trat wie in unbehandelten Geschwisterembryonen 10,5 Stunden nach der Befruchtung ein (Abb. 62). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass HMGN Proteine bei der Expressionsregulation Mesoderm-spezifischer Gene in induzierten animalen Kappen beteiligt sind und dass dabei eine funktionelle nukleosomale Bindungsdomäne notwendig ist.

#### 4.6.2 Die HMGN-Expression korreliert mit dem Verlust der mesodermalen Kompetenz

Zellen der animalen Kappe verlieren 10,5 Stunden nach der Befruchtung ihre Fähigkeit, auf Aktivin mit der Expression Mesoderm-spezifischer Gene zu antworten. Bei HMGN2-injizierten Embryonen konnte diese Fähigkeit um eine Stunde verlängert werden (4.6.1). Daher liegt es nahe, dass HMGN Proteine bei der Expressionsregulation Mesoderm-spezifischer Gene in induzierten animalen Kappen beteiligt sind. Um zu klären, ob der Verlust der mesodermalen Kompetenz mit der Expression der *XHMGN* Gene korreliert, wurden je 5 isolierte animale Kappen aus Kontroll-Blastulae in einem Abstand von 30 Minuten in Medium mit 5 ng/ml Aktivin gegeben und 12 Stunden bei 24°C in Aktivin inkubiert. Danach wurde die RNA der animalen Kappen isoliert und mittels RT-PCR unter semiquantitativen Bedingungen die Expression von *XHMGN1*, *XHMGN2*, *XMyoD* und *Histon H3* überprüft. Die entsprechenden Primer und PCR-Bedingungen sind im Anhang beschrieben.



**Abb.63:** Expression von *XHMGN1* und *XHMGN2* Genen in isolierten animalen Kappen, analysiert durch semiquantitative RT-PCR. (A) Mesoderminduktion durch Zugabe von Aktivin induziert die Expression von *XMyoD* und führt zu einer stärkeren Expression von *XHMGN1* und *XHMGN2* Genen. *Histon H3* diente als Kontrolle der Reversen Transkription. (B) Der Verlust der mesodermalen Kompetenz in isolierten animalen Kappen (angezeigt durch die fehlende *XMyoD* Expression) geht einher mit einer Reduktion der Expression von *XHMGN* Genen (h.p.f. = hours post fertilisation).

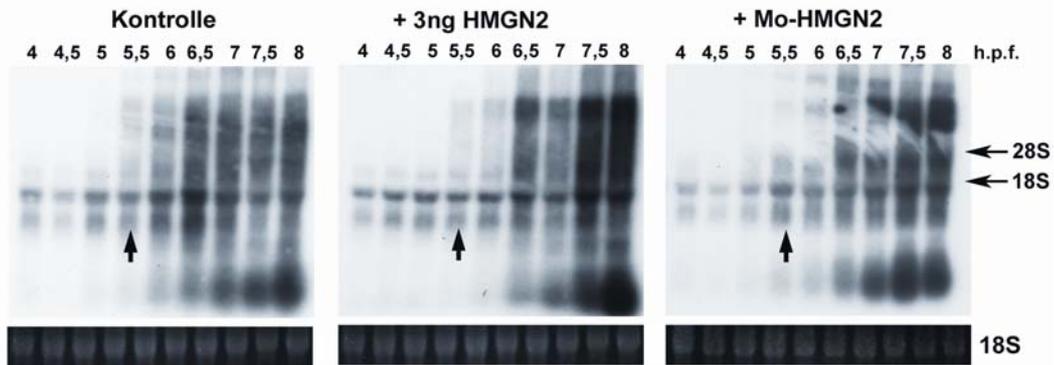
Interessanterweise wurde festgestellt, dass Aktivin in den animalen Kappen die Expression von *XHMGN1*- bzw. *XHMGN2*-Genen im Vergleich zu den nicht induzierten animalen Kappen deutlich erhöht (Abb. 63A). Somit geht mit der Mesoderminduktion eine gleichzeitige erhöhte transkriptionelle Aktivität der *HMGN1*- bzw. *HMGN2*-Gene einher. Wie vorher schon gefunden und in der Literatur beschrieben (Jones und Woodland, 1987; Grainger and Gurdon, 1989), findet 10,5 Stunden nach der Befruchtung der Verlust der mesodermalen Kompetenz statt. Dieser Verlust der mesodermalen Kompetenz korreliert offensichtlich mit einer deutlichen Reduktion der *XHMGN*-Genexpression (Abb. 63B). Dieses Ergebnis deutet an, dass HMGN Proteine bei der Ausprägung der Kompetenz beteiligt sein könnten und lässt vermuten, dass die HMGN-Expression direkt oder indirekt durch Aktivin reguliert werden kann.

### **4.6.3 Haben HMGN Proteine Einfluss auf den Beginn der Midblastula Transition ?**

Der Start der Transkription des embryonalen Genoms beginnt bei *Xenopus laevis* erst nach der sogenannten Midblastula Transition (Newport und Kirschner et al., 1982). Wie unter 4.3.2.3.1 gezeigt, werden in Kontroll-Embryonen bis zur Midblastula keine HMGN Proteine exprimiert. Bei einer Injektion von rekombinanten HMGN Proteinen in die Zygote sind nun aber HMGN Proteine auch vor der Midblastula vorhanden. Diese veränderte HMGN Proteinmenge könnte den Beginn der Transkription einzelner Gene beeinflussen. Interessanterweise wurde ein Einfluss der HMGN Proteine auf den allgemeinen Beginn der genomischen Transkription in der Maus gezeigt (Mohamed et al., 2001). Es wäre also durchaus möglich, dass durch eine Injektion von HMGN Proteinen der Beginn der genomischen Transkription auch bei *Xenopus* beeinflusst wird und früher einsetzen könnte. Bei einer Injektion von *XHMGN*-Morpholinos andererseits ist nach dem Beginn der Midblastula Transition die HMGN Proteinmenge reduziert. Dies wiederum könnte zur Folge haben, dass der Transkriptionsstart embryonaler Gene durch das Fehlen der HMGN Proteine verzögert wird oder wesentlich schwächer ausfällt.

Um zu überprüfen, ob eine Veränderung der HMGN Proteinmenge den Beginn der genomischen Transkription bei *Xenopus* beeinflusst, wurden neusynthetisierte embryonale Transkripte durch Injektion von Radioaktivität markiert. In die Zygote injiziert, wird  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-UTP mit Beginn der Genomaktivierung ab der Midblastula Transition in die neu synthetisierte RNA eingebaut (Newport und Kirschner et al., 1982). Um einen allgemeinen Einfluss der HMGN Proteine auf den Beginn der embryonalen Gentranskription zu überprüfen, wurde zusammen mit 3 ng HMGN2 oder 20 ng MO-HMGN2 zusätzlich 0,4  $\mu$ Ci  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-UTP koinjiziert. Als Kontrolle erhielten Embryonen nur die radioaktiven Nukleotide. Beginnend mit 4 h nach der Befruchtung wurde in Abständen von 30 min die RNA aus je 2 Embryonen isoliert. Die

isolierte RNA wurde im RNA-Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und auf einem Röntgenfilm exponiert.



**Abb.64:** Die Manipulation der HMGN Proteinmengen verschiebt nicht den Beginn der allgemeinen zygotischen Genexpression. Zygoten wurden nur mit 0,4  $\mu\text{Ci}$   $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -UTP (Links), mit 0,4  $\mu\text{Ci}$   $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -UTP zusammen mit 3 ng HMGN2 (Mitte) oder mit 0,4  $\mu\text{Ci}$   $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -UTP zusammen mit 20 ng MO-HMGN2 injiziert (Rechts). Die RNA aus je 2 Embryonen wurde ab 4 Stunden nach der Befruchtung in einem Abstand von je 30 min isoliert. Die isolierte RNA wurde im RNA-Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einem Röntgenfilm über Nacht ( $-70^\circ\text{C}$ , Verstärkerfolie) exponiert. Die Ethidiumbromid-gefärbte 18s RNA dient als Beladungskontrolle und ist unter den Autoradiogrammen gezeigt. In der Kontrolle, wie auch in den manipulierten Embryonen beginnt die Synthese der heterogenen RNA 5,5 Stunden nach der Befruchtung (Pfeile), dem Zeitpunkt der Midblastula Transition (h.p.f. = hours post fertilisation). Die Lage der 28s und 18s rRNA ist angegeben. Die in allen Proben enthaltene Bande unterhalb der 18s-RNA ist RNase sensitiv und unbekannter Herkunft.

In allen drei Ansätzen konnte der Einbau der Radioaktivität in die heterogene RNA ca. 5,5 Stunden nach der Befruchtung detektiert werden (Abb. 64, Pfeile), was dem Zeitpunkt der Midblastula Transition entspricht. Durch die Injektion von HMGN2 Protein wurde der Start der Transkription weder verfrüht noch verstärkt. Ebenso konnte keine Verzögerung des Transkriptionsbeginns durch die Injektion von MO-HMGN2 beobachtet werden. Dies zeigt, dass der allgemeine Beginn der embryonalen Transkription nicht durch HMGN Proteine beeinflusst wird. Allerdings ist die Methode nicht sensitiv genug, um die Veränderung im Expressionszeitpunkt einzelner Gene zu detektieren.

#### 4.6.4 Einfluss von HMGN Proteinen auf den Expressionsbeginn spezifischer Gene während der Midblastula Transition

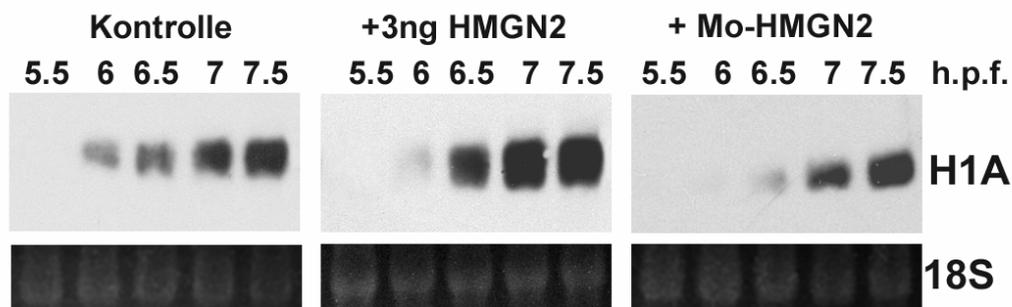
Wie unter 4.6.3 gezeigt, findet der allgemeine Start der Transkription des embryonalen Genoms in unbehandelten wie auch manipulierten Embryonen (Injektion von 3 ng HMGN2 bzw. 20 ng MO-HMGN2 in die Zygote) zur gleichen Zeit statt. Die Änderung der Proteinmengen von HMGN hat also keinen Einfluss auf den allgemeinen Expressionsbeginn während der Midblastula Transition. Allerdings ist die unter 4.6.3 verwendete Methode nicht sensitiv genug, um diese Aussage auch für einzelne Gene gelten zu lassen. Da eine Manipulation der HMGN Proteinmengen einen Einfluss auf die lokale Chromatinstruktur bewirken und so die Expression einzelner Gene beeinflussen könnte und zudem gezeigt

wurde, dass Histon H1A im Zusammenspiel mit HMGN die Struktur und Funktion des Chromatins beeinflusst (Alfonso et al., 1994; Catez et al., 2003), wurde speziell der Transkriptionsbeginn des *Histon H1A*-Gens während der Midblastula Transition untersucht.

Dazu wurde die RNA aus je 2 HMGN- oder 2 MO-HMGN2-injizierten und 2 unbehandelten Embryonen ab 5,5 Stunden nach der Befruchtung und dann im Abstand von je 30 min isoliert und für eine Northernblot-Analyse verwendet. Die RNA wurde nach der Gelelektrophorese durch Ethidiumbromid angefärbt, fotografiert und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Nylonmembran wurde dann mit einer spezifischen Digoxigenin-markierten *XHiston H1A*-Sonde bei 55°C über Nacht hybridisiert. Die gebundene Sonde wurden schließlich mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-Digoxigenin Antikörper und ECL detektiert.

Wie man aus Abbildung 65 entnehmen kann, beginnt die Transkription von *Histon H1A* bei den unbehandelten wie auch bei den HMGN2-injizierten Embryonen zur gleichen Zeit. Wie man an den Signalstärken im Northern Blot sehen kann, ist aber eine deutliche erhöhte Transkriptionsrate bei den HMGN2-injizierten Embryonen zu erkennen.

Bei XHMGN2 knock-down Embryonen dagegen zeigte sich ein verzögerter und reduzierter Expressionsbeginn von *Histon H1A*. Dies deutet an, dass variierende HMGN Proteinmengen die Expression von *Histon H1A*-Genen mit beeinflussen.



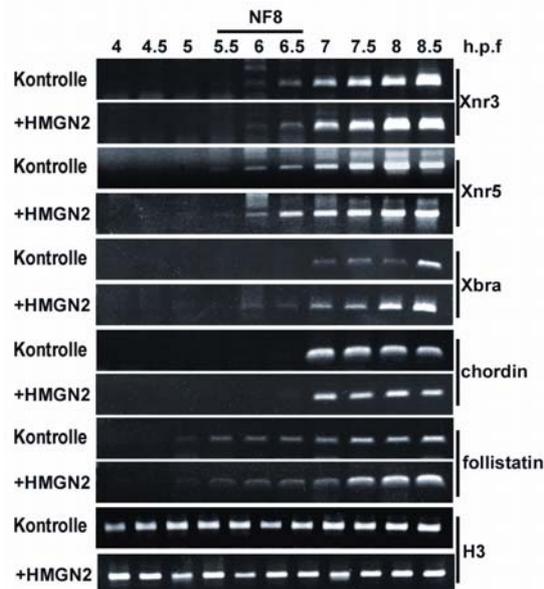
**Abb.65:** Northern Blots mit isolierter embryonaler RNA (RNA aus 2 Embryonen pro Spur). Die Embryonen waren unbehandelt (Kontrolle), injiziert mit 3 ng HMGN2 (+3ng HMGN2) oder injiziert mit 20 ng MO-HMGN2 (+MO-HMGN2). Die isolierte RNA wurde im Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert, mit einer *Xenopus*-spezifischen Digoxigenin-markierten Antisense-*H1A* RNA-Sonde hybridisiert. Die gebundenen Proben wurden dann mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-Digoxigenin Antikörper und ECL detektiert. Das jeweilige Bild darunter zeigt die 18s-RNA des korrespondierenden ethidiumbromidgefärbten Agarosegels als Beladungskontrolle.

#### 4.6.5 Einfluss von HMGN Proteinen auf den Expressionsbeginn entwicklungssteuernder Schaltergene während der Midblastula Transition

Wie unter 4.6.3 beschrieben, haben Veränderungen der HMGN Proteinmengen keinen Einfluss auf den allgemeinen Beginn der zygotischen Genexpression. Die Northernblotanalyse des Expressionsbeginns des *Histon H1A* Gens (4.6.4) deutete aber an, dass der Expressionsbeginn einzelner Gene durchaus beeinflusst werden kann. Durch den „animal cap assay“ wurde festgestellt, dass HMGN Proteine eine Rolle bei der Regulation

der Expression Mesoderm-spezifischer Gene wie zum Beispiel *XmyoD*, *Xbra* und  $\alpha$ -*actin* spielen. Mittels der äußerst sensitiven Methode der RT-PCR wurde deshalb überprüft, ob eine experimentelle Veränderung der HMGN Proteinmengen die Transkription Mesoderm-spezifischer Schaltergene beeinflusst.

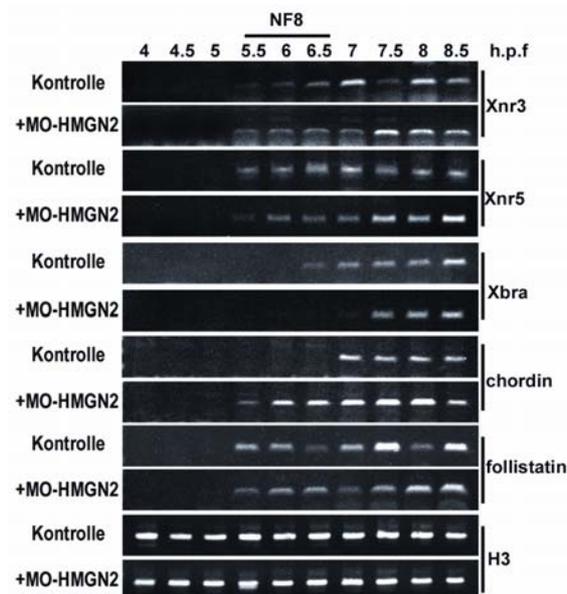
Dazu wurde die RNA aus je 2 Embryonen ab 4 Stunden nach der Befruchtung und dann im Abstand von 30 min bis 8,5 h nach der Befruchtung isoliert. Alle Embryonen stammten aus einer *in-vitro* Befruchtung. Ein Teil wurde mit 3 ng HMGN2 Protein und ein anderer Teil mit 20 ng MO-HMGN2 injiziert. Andere Embryonen blieben als Kontrolle unbehandelt. Anschließend wurde mit den stadienspezifischen RNAs eine RT-PCR-Analyse durchgeführt und die Expression entwicklungssteuernder Schaltergene untersucht. Analysiert wurden die Gene *Xnr3* (Smith et al., 1995; Hansen et al., 1997), *Xnr5* (Takahashi et al., 2000), *Xbra* (Smith et al., 1991), *chordin* (Sasai et al., 1994) und *folliculin* (Hemmati-Brivanlou et al., 1994). *Xnr3*, *chordin* und *folliculin* sind Antagonisten von BMP-4 und werden als Organisator-Induktoren bezeichnet. Sie spezifizieren im Zusammenspiel mit BMP-4 dorsales bzw. ventrales Mesoderm und induzieren die Bildung von neuralem Gewebe. Der Wachstumsfaktor *Xnr5* induziert Mesoderm wie auch Entoderm. Das *Xbra*-Gen kodiert einen Transkriptionsfaktor, der als Folge der Mesoderm-Induktion sehr früh exprimiert wird.



**Abb.66:** RT-PCR Analysen zum Expressionsbeginn entwicklungsrelevanter Schaltergene in HMGN2-injizierten (+HMGN2, 3ng) und unbehandelten Geschwisterembryonen (Kontrolle). Die RNA aus je 2 Embryonen wurde ab 4 Stunden und dann in einem Intervall von je 30 min bis 8,5 Stunden nach der Befruchtung isoliert. Die Midblastula Transition ist durch NF8 (Blastula-Stadium) angezeigt. Es wurde die Expressionsbeginn der Gene *Xnr3*, *Xnr5*, *Xbra*, *chordin*, *folliculin* und *Histon H3* untersucht. Die Analyse der *Histon H3* Expression diente als Kontrolle für die Reverse Transkription. Während fast alle hier überprüften Gene in Kontroll- und HMGN2-injizierten Embryonen zum gleichen Zeitpunkt erstmals transkribiert werden, beginnt die Expression von *Xbra* deutlich früher in HMGN2-injizierten Embryonen (h.p.f. = hours post fertilisation;).

Ein Vergleich des Expressionsbeginns dieser Gene in HMGN-injizierten und Kontroll-Embryonen führte zu folgenden Ergebnissen (Abb. 66). Die Gene *Xnr3*, *Xnr5*, *folliculin* und *chordin* wurden unabhängig von der HMGN Proteinmenge exprimiert. Das Gen *Xbra* dagegen zeigte eine verfrühte Expression in HMGN-injizierten Embryonen im Vergleich zu den Kontrollen. Dies impliziert, dass HMGN Proteine den Expressionsbeginn dieses Gens mitbestimmen (Abb. 66).

Bei der Untersuchung der knock-down Embryonen dagegen begann die Expression von *Xbra* 1 Stunde später als in den unbehandelten Embryonen (Abb. 67). Das Transkript von *chordin* andererseits wurde in MO-HMGN2-injizierten Embryonen deutlich früher (1,5 Stunden) exprimiert als in der Kontrolle. Der Beginn der Expression von *Xnr3*, *Xnr5* und *folliculin* war in MO-HMGN2-injizierten und unbehandelten Embryonen identisch (Abb. 67). Zusammengefasst zeigen diese Untersuchungen, dass HMGN Proteine den Zeitpunkt der zygotischen *Xbra*-Expression beeinflussen: Bei HMGN-Überschuss erfolgte die *Xbra*-Transkription verfrüht, bei einem Fehlen dagegen verspätet. Mit *chordin* wurde ein weiteres Gen identifiziert, dessen Expression HMGN-abhängig reguliert wurde. Überraschend war hier allerdings der gegenläufige Effekt im Vergleich zu *Xbra*, mit einem deutlich verfrühten Expressionsbeginn in knock-down Embryonen. Interessanterweise kann die HMGN-abhängige Regulation beider Gene, *Xbra* und *chordin*, die Mesoderm-spezifischen Missbildungen in HMGN-injizierten und knock-down Embryonen erklären.



**Abb.67:** RT-PCR Analysen zum Expressionsbeginn entwicklungsrelevanter Schaltergene in XHMGN2-knock-down Embryonen (+MO-HMGN2, 20ng) und unbehandelten Geschwisterembryonen (Kontrolle). Die RNA aus je 2 Embryonen wurde wie in Abb. 66 beschrieben isoliert und analysiert. Die Midblastula Transition ist durch NF8 (Blastula-Stadium) angezeigt. Der embryonale Transkriptionsbeginn folgender Gene wurde untersucht: *Xnr3*, *Xnr5*, *Xbra*, *chordin*, *folliculin* und *Histon H3*. Die *Histon H3* Expression diente als Kontrolle für die Reverse Transkription. In knock-down Embryonen verzögerte sich die Expression von *Xbra* im Vergleich zu der Kontrolle um 1 Stunde. Dagegen zeigt die RT-PCR-Analyse eine deutlich verfrühte Expression von *chordin* (1,5 Stunden früher) in MO-HMGN2-injizierten Embryonen im Vergleich zu Kontroll-Embryonen (h.p.f. = hours post fertilisation;).

## 5 Diskussion

HMGN Proteine, ein ubiquitärer Bestandteil von Vertebratenzellen, besitzen die Fähigkeit, die Architektur und Funktion des Chromatins zu beeinflussen (Bustin 2001). Daher liegt die Annahme nahe, dass HMGN Proteine eine Rolle in Entwicklungs- bzw. Differenzierungsprozessen spielen, obwohl es dazu bislang keinen direkten Hinweis gibt (vgl. Einleitung). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Rolle der HMGN Proteine in der Oogenese und der Embryonalentwicklung am Modellsystem *Xenopus laevis* näher untersucht. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse führten zu zahlreichen neuen und grundlegenden Erkenntnissen bezüglich der Funktion der HMGN Proteine.

1.) Die Sequenzanalyse der *Xenopus* HMGN Proteine (XHMGN) belegt die hohe evolutionäre Konservierung dieser Proteine. 2.) Expression und zelluläre Verteilung der HMGN Proteine unterliegen während der Oogenese und der Embryonalentwicklung einer strengen Kontrolle. 3.) Experimentelle Veränderungen der HMGN Proteinmengen führen während der Embryonalentwicklung zu Entwicklungsstörungen. 4.) HMGN Proteine beeinflussen die Expression spezifischer entwicklungsrelevanter Gene der Embryonalentwicklung.

### 5.1 HMGN Proteine sind hoch konserviert von *Xenopus* zum Menschen

Die *Xenopus*-spezifischen Proteinsequenzen XHMGN1 und XHMGN2, die unter 4.1 beschrieben wurden, erlauben interessante Einblicke in die Evolution dieser Proteine. Vergleichende Analysen mit den Orthologen anderer Spezies machen deutlich, dass die Aminosäuresequenz bei allen Vertebraten erstaunlich konserviert ist. Die Übereinstimmungen sind insbesondere in den funktionellen Domänen der HMGN Proteine zu finden. Die ersten vier Aminosäuren, PKRK, die einen Teil des zweigeteilten Kernlokalisationssignals (NLS1) darstellen (Hock et al., 1998a), sind in allen HMGN Proteinen identisch. Der zweite Teil des Kernlokalisationssignals (NLS2), KGKRK, ist ebenfalls unverändert bei allen HMGN Proteinen, einschließlich XHMGN1 und XHMGN2. Die nukleosomale Bindungsdomäne der HMGN Proteine ist im Fall von HMGN2 zwischen Mensch und *Xenopus* identisch und im Fall HMGN1 hoch konserviert. Der amino-terminale Bereich der nukleosomalen Bindungsdomäne ist besonders hoch konserviert (Bustin und Reeves, 1996; Bustin et al., 1990). 10 von 11 Aminosäuren sind unverändert in allen untersuchten Spezies. Die C-terminale Chromatin Aktivierungsdomäne, die zwischen HMGN1 und HMGN2 Proteinen unterschiedlich ist, innerhalb der HMGN1 bzw. HMGN2 Proteine verschiedener Spezies aber hoch konserviert vorliegt, ist ebenfalls in XHMGN Proteinen zu finden.

In der Evolution trennten sich Amphibien und Säuger vor über 350 Millionen Jahren (Dayhoff, 1972). Die hohe Konservierung der HMGN Aminosäuresequenzen, legt eine wichtige und grundlegende Funktion in Vertebraten nahe. Das Vorhandensein beider Proteine, HMGN1 und HMGN2, in allen Vertebraten spricht dafür, dass beide Proteine eine bestimmte und nicht austauschbare Funktion erfüllen. Entsprechendes wurde für Mitglieder anderer HMGN-Familien festgestellt. HMGB2 beispielsweise kann HMGB1 funktionell nicht ersetzen (Calogero et al., 1999), HMGA1a und HMGA1b können ebenfalls eine fehlerhafte Funktion des nah verwandten HMGA2 nicht kompensieren (Zhou et al., 1995).

Die Sequenz-Übereinstimmungen zwischen XHMGN1 und HMGN1 Proteinen anderer Spezies (Mensch, Maus und Huhn) reichen von 53% bis 61% (Abb. 15), wogegen die Sequenz von XHMGN2 mit HMGN2 Proteinen anderer Spezies (Mensch, Maus und Huhn) zu 84% bis 87% übereinstimmt. Somit ist die Sequenz von XHMGN1 im Vergleich zu XHMGN2 weniger konserviert. Interessanterweise besitzt XHMGN2 ein Serin an der Position neun, was HMGN2 Proteinen anderer Spezies fehlt. Möglicherweise wird durch Phosphorylierung dieses XHMGN2-Serinrestes, vergleichbar mit dem Serin in der Position sechs im HMGN1 Protein, die Interaktionen zwischen HMGN Proteinen und Nukleosomen, aber auch mit interagierenden Proteinen, reguliert (Prymakowska-Bosak et al., 2001, 2002; Thomson et al., 1999; Barratt et al., 1994).

### **5.2 HMGN Proteine zeigen eine überraschende Verteilung in Oozyten**

Verschiedene Experimente belegten, dass während der Oogenese von *Xenopus laevis* sowohl XHMGN1 und XHMGN2 Proteine als auch die entsprechenden mRNAs in den Oozytenstadien I-VI vorhanden sind. Interessanterweise zeigten Westernblot-Analysen, dass XHMGN Proteine nicht in den Zellkernen älterer Oozytenstadien (V, VI) vorkommen. Stattdessen wurden die XHMGN Proteine ausschließlich im Zytoplasma gefunden. Entsprechend konnten XHMGN Proteine auch mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen nicht an den Lampenbürstenchromosomen (LBC) lokalisiert werden. Dieser offensichtliche Ausschluss der XHMGN Proteine von den Zellkernen, zumindest bei älteren Oozytenstadien, steht im Gegensatz zu dem, was für HMGB Proteine beschrieben wurde. Die HMGB Proteine beispielsweise sammeln sich sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern von Oozyten an (Kleinschmidt et al., 1983).

Da HMGN Proteine an den LBC fehlen, lässt sich der Schluss ziehen, dass sie in Oozyten weder eine Rolle als Architekturelemente der LBC noch bei Transkriptionseignissen eine Rolle spielen. Unterstützt wird diese Aussage dadurch, dass in Oozyten injizierte Fluoreszenz-markierte HMGN1-Proteine zwar an die LBC binden konnten, die Bindung der exogenen Proteine aber keine Veränderungen der LBC-Struktur verursachte. Dies zeigt, dass HMGN Proteine, zumindest in relativ geringen Mengen, die globale Struktur der LBC

nicht beeinflussen. Histon H1, das um Chromatin-Bindungsstellen mit HMGN Proteinen konkurrieren kann (Catez et al., 2002), fehlt interessanterweise ebenfalls in Oozytenkernen und ist nicht mit LBC assoziiert (Hock et al., 1993).

Während der Oogenese wird allerdings die maternale Histon H1 Variante H1M/B4 in Oozyten angereichert (Smith et al., 1988; Dworkin-Rastl et al., 1994) und es wäre denkbar, dass ebenso eine Oozytenvariante der HMGN Proteine existiert. Wie Sequenzierungen der *XHMGN*-mRNA aus Oozyten aber zeigten, wird für die HMGN Proteine offensichtlich kein Oozyten-spezifischer Ersatz synthetisiert.

Wie werden aber die XHMGN Proteine in den Oozyten im Zytoplasma gehalten? Wie sich zeigte, können exogene in den Zellkern injizierte HMGN Proteine an LBC binden. Zudem besitzen auch die XHMGN Proteine ein Kernlokalisierungssignal und sollten so aktiv über einen Importin-abhängigen Mechanismus in den Zellkern importiert werden (Hock et al., 1998b; Prymakowska-Bosak et al., 2001). Da dies nicht der Fall ist, muss man annehmen, dass HMGN Proteine aktiv im Oozyten-Zytoplasma zurückgehalten werden. Wie kürzlich gezeigt wurde, werden in humanen somatischen Zellen HMGN Proteine in der Prophase der Mitose an Serinen innerhalb der nukleosomalen Bindungsdomäne phosphoryliert. Diese Phosphorylierung schwächt einerseits die Bindung der Proteine an Nukleosomen und unterstützt gleichzeitig die Bindung der HMGN Proteine mit dem Protein 14.3.3ζ. Durch diese Interaktion werden die HMGN Proteine im Zytoplasma gehalten und eine Chromosomenbindung verhindert (Prymakowska-Bosak et al., 2002). Verschiedene Varianten der 14-3-3 Proteine erkennen und binden phosphorylierte Proteine und beeinflussen so die Umverteilung und funktionelle Regulation vieler Proteine (Fu et al., 2000). Dies wurde beispielsweise auch für die CDC25 Phosphatase in *Xenopus*-Oozyten gezeigt. Hier wird CDC25 durch die Bindung an 14.3.3ε im Zytoplasma zurückgehalten (Yang et al., 1999). Es ist also vorstellbar, dass ein solcher Mechanismus, sprich die Bindung von phosphorylierten XHMGN Proteinen an einen 14-3-3 Isotyp, die XHMGN Proteine im Zytoplasma zurückhält.

Was geschieht mit den zytoplasmatischen XHMGN Proteinen einer Oozyte während der Maturation? Interessanterweise konnte nach einer Progesteron-induzierten Reifung von Oozyten zu Eiern (Wassermann und Smith, 1978) keine HMGN Proteine mehr gefunden werden. Offenbar werden die HMGN Proteine während der Eireifung schnell degradiert. Ein Abbau von Proteinen während der Eireifung ist kein ungewöhnlicher Prozess. Das nukleoläre Protein NO145 ist beispielsweise in allen Oozytenstadien während der *Xenopus*-Oogenese vorhanden und wird während der Reifung der Oozyten zu Eiern schnell und komplett degradiert (Kneissel et al., 2001).

Das Fehlen der XHMGN Proteine in reifenden Eiern zeigt klar, dass die XHMGN Proteine nicht zu jenen Proteinen gehören, die als maternale Faktoren im Ei angesammelt werden (Abb. 22).

### **5.3 Die Expression von HMGN Proteinen in Embryonen ist zeitlich und räumlich reguliert**

Wie die weitere Untersuchung von Embryonen ergab, sind im Ei und in frühen Stadien der Embryogenese (bis zur Blastula) keine XHMGN1 oder XHMGN2 Proteine vorhanden (Abb. 28). Selbst wenn mehrere hundert Eier oder Embryonen für Extraktionsexperimente verwendet wurden, waren die HMGN Proteine nicht nachweisbar (Trieschmann et al., 1998; Körner et al., 2003). Dies unterstützt die oben getroffene Aussage, dass HMGN Proteine nicht als maternaler Vorrat in Eiern angelegt werden.

Da bei *Xenopus laevis* erst ab der Midblastula Transition das embryonale Genom transkribiert wird, ist es nicht verwunderlich, dass HMGN Proteine, die DNA-abhängige Prozesse wie z.B. Transkription unterstützen (siehe Einleitung), nicht vor der Midblastula Transition benötigt werden. Erst ab der Blastula, zeitgleich mit der transkriptionellen Aktivierung des embryonalen Genoms, lassen sich HMGN Proteine finden. Während die XHMGN Proteine also erst mit Beginn der embryonalen Transkription erscheinen, lässt sich trotzdem mit Hilfe von RT-PCR-Analysen, zumindest in geringen Mengen, *XHMGN1*- und *XHMGN2*-mRNA auch im Ei und frühen Embryonalstadien nachweisen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass diese mRNAs nicht translatiert werden. Interessanterweise wurde genau dies für die mRNA von *Xenopus-Histon H1A* beschrieben, die modifiziert in frühen Embryonen vorliegt und nicht translatiert werden kann (Bouvet und Wolffe, 1994; Khochbin, 2001). Auch das Histon H1A ist erst ab der Blastula nachweisbar (Dimitrov et al., 1993; Hock et al., 1993). Vergleichende Western Blot Analysen zeigten, dass XHMGN und Histon H1A fast zeitgleich während der *Xenopus*-Embryonalentwicklung auftreten. Ein ähnlich korrelierendes Auftreten von HMGN Proteinen und Histon H1 wurde auch während der Mausentwicklung beschrieben (Mohamed et al., 2000; Adenot et al., 2000; Gao et al., 2004). Dieses zeitgleiche Auftreten von HMGN Proteinen und Histon H1 während embryonaler Entwicklungsprozesse ist aus verschiedenen Gründen sehr interessant: 1.) HMGN Proteine und Histon H1 interagieren, wenn sie an das Nukleosom gebunden sind, teilweise mit den gleichen Zielszellen (Alfonso et al., 1994). 2.) Im SV40 Minichromosom Modellsystem können HMGN1 Proteine eine Histon H1-vermittelte transkriptionelle Inaktivierung abschwächen (Ding et al., 1997). 3.) In lebenden Zellen konnte gezeigt werden, dass HMGN und Histon H1 um die gleichen Chromatin-Bindungsstellen konkurrieren und so das Chromatin modulieren (Catez et al., 2002). Unter Berücksichtigung dieser Aspekte könnte die entwicklungspezifische Expression beider Proteine so abgestimmt sein, dass durch das

Zusammenspiel von Histon H1 und HMGN Proteinen die Chromatinstruktur in bestimmten Bereichen dynamischen Veränderungen unterliegt und so die Voraussetzung für eine regulierbare Transkription schafft.

Neben der zeitlich regulierten Expression der XHMGN Proteine wurde auch eine räumlich regulierte Expression, zumindest auf Ebene der mRNAs, gefunden. Von der Blastula an sind *XHMGN*-mRNAs zwar in allen Entwicklungsstadien nachweisbar, auffällig waren aber erhöhte *XHMGN1* und *XHMGN2* mRNA-Mengen im Mesoderm (Somiten) und Neuroektoderm (Gehirn, Kopf) im Vergleich zu Ektoderm (Haut) und Entoderm (Bauch). Ob diese erhöhten mRNA-Mengen auch erhöhte Proteinmengen bedingen, konnte nicht geklärt werden. Immunfluoreszenz-Analysen an Paraffinschnitten zeigten lediglich das Vorhandensein beider Proteine in allen Zellkernen von Post-Blastula Embryonen. Interessanterweise wurde bereits gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der HMGN-Expression und der Muskeldifferenzierung von C2C12 Mausmyoblasten besteht (Pash et al., 1990, 1993). Ebenfalls wurde eine Korrelation zwischen der HMGN-Expression und der Differenzierung von promyelotischen HL-60 Zellen zu Monozyten und Granulozyten gefunden (Shakoori et al., 1993). Diese veränderte Expression von HMGN Proteinen bei Differenzierungsprozessen von Mesoderm-abgeleiteten Zellen stimmt gut mit der erhöhten Expression im embryonalen Mesoderm von *Xenopus* überein.

### **5.4 Die zelluläre HMGN-Konzentration ist kritisch für die Embryonalentwicklung**

Wie oben diskutiert, wird die XHMGN Proteinbiosynthese während der *Xenopus*-Frühentwicklung zeitlich und möglicherweise auch räumlich reguliert. Abweichungen von diesem Entwicklungsprogramm führen zu Fehlentwicklungen, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte. Die experimentelle Erhöhung der HMGN Proteinmengen wurde durch Injektion rekombinanter HMGN Proteine in befruchtete Eizellen bewirkt, die Verminderung durch Injektion von Morpholino-Antisense-Oligonukleotiden induziert. Proteine und Morpholinos wurden in die Zygote von *Xenopus laevis* injiziert, wobei die Erhöhung bzw. die Erniedrigung der HMGN Proteinmengen noch mindestens bis zum Gastrulastadium nachweisbar waren. Bis zum Beginn der Midblastula Transition hatten die Manipulationen keinerlei Einfluss auf die Embryonalentwicklung. Bei den manipulierten Embryonen zeigten Zeitrafferaufnahmen einen normalen Ablauf der Furchungsteilungen, zusätzlich zeigte ein Microcococcus Nuklease Verdau, dass die globale Chromatinstruktur im Vergleich zu Kontrollembryonen unverändert blieb. Der Einbau von  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-UTP in neusynthetisierte embryonale RNA zeigte, dass der Beginn der genomischen Transkription in manipulierten und Kontroll-Embryonen zum gleichen Zeitpunkt erfolgte und sich die Transkriptionsrate in manipulierten Embryonen nicht signifikant änderte. Letzteres war überraschend, da im

Gegensatz dazu im Mausmodell festgestellt wurde, dass durch eine Verdrängung der HMGN Proteine vom Chromatin die allgemeine embryonale Transkriptionsrate erniedrigt und die Furchung verzögert wird (Mohamed et al., 2001). Mohamed et al. benutzten zur Verdrängung der HMGN Proteine vom Chromatin ein Peptid, das der nukleosomalen Bindungsdomäne von HMGN Proteinen entsprach. Eine Verdrängung der HMGN Proteine vom Chromatin menschlicher Zellen, ebenfalls durch Konkurrenz mit Hilfe des gleichen Peptids, reduzierte auch hier die Transkriptionsrate (Hock et al., 1998a). Wie lässt sich diese Diskrepanz erklären? Wie bereits mehrfach erwähnt, wird in der *Xenopus*-Entwicklung das embryonale Genom erst während der Midblastula Transition aktiviert. Gleichzeitig sind HMGN Proteine bei *Xenopus* auch erst ab der Midblastula Transition zu finden, während sie im Mausmodell in allen Stadien der Embryogenese vorkommen (Mohamed et al., 2001). *Xenopus*-Modell und Mausmodell sind bezüglich der HMGN Proteine also nicht direkt zu vergleichen. Zusammengefasst unterstreichen die Ergebnisse aber, dass Veränderungen von HMGN Proteinmengen nur dann Auswirkungen haben, wenn diese natürlicherweise vorkommen und sie auch funktionell sind.

Während also vor der Midblastula Transition veränderte HMGN Proteinmengen keinerlei Einfluss auf die Frühentwicklung hatten, so zeigte sich mit Beginn der Midblastula Transition ein starker Einfluss veränderter HMGN Proteinmengen auf die weitere Embryonalentwicklung. Bei der Mehrheit der HMGN2-injizierten Embryonen wurde eine unvollkommene Schließung des Blastoporus beobachtet. Mit Erreichen des Schwanzknospenstadiums zeigte eine signifikante Anzahl der manipulierten Embryonen eine stark verkürzte und gebogene Körperachse einhergehend mit einem offenen Rücken („Spina bifida“-Phänotyp) und Mikrocephalie. Neben diesen Missbildungen wurden in manipulierten Embryonen im frühen Neurulastadium Zellen zwischen dem Embryo und der Vitellinmembran beobachtet. Frühere Arbeiten führten dieses Phänomen auf Apoptose zurück (Grammer et al., 2000). Ein vergleichender Whole-mount-TUNEL-Assay mit wildtypischen und HMGN2-injizierten Embryonen konnte diese Aussage jedoch nicht bestätigen. Anzahl und Lage der apoptotischen Zellen in HMGN2-injizierten Embryonen waren vergleichbar mit denen von wildtypischen Schwesterembryonen.

Wie ist dann dieses Phänomen der extern auftretenden Zellen nach Injektion von HMGN2 zu erklären? Möglicherweise stört eine erhöhte HMGN Proteinmenge die Gastrulationsbewegungen, was in einer unvollkommenen Schließung des Blastoporus resultiert. Als Konsequenz sterben mesodermale und entodermale Zellen außerhalb des Embryos und verbleiben innerhalb der Vitellinmembran. Eine derartige Störung der Gastrulationsbewegungen mit unvollkommener Schließung des Blastoporus würde ebenso den „Spina bifida“-Phänotyp der späteren Schwanzknospenstadien erklären.

Interessanterweise war die Stärke der Missbildungen abhängig von der injizierten HMGN Proteinmenge, ein erster Hinweis, dass die Missbildungen spezifisch durch HMGN Proteine hervorgerufen wurden. Ein klarer Beleg dafür konnte durch die Injektion eines mutagenisierten HMGN1 Proteins erbracht werden, bei dem zwei Serine an Position 20 und 24 innerhalb der nukleosomalen Bindungsdomäne durch die Aminosäuren Glutaminsäure ersetzt wurden. Dieses mutagenisierte Protein wird zwar noch in den Zellkern importiert, bindet aber nicht mehr an die Nukleosomen (Prymakowska-Bosak et al., 2001, 2002). Die Injektion dieses HMGN1S20,24E Proteins erzeugte keinerlei Missbildungen. Dies zeigte klar, dass nicht das Protein per se, sondern die Interaktion des Proteins mit dem Chromatin die Fehlentwicklungen verursacht. Neben diesen Experimenten beweisen auch die „knock-down“- und die „rescue“-Experimente die HMGN-Abhängigkeit und Spezifität der Missbildungen (siehe unten).

Weitergehende Untersuchungen der durch HMGN-Injektion erzeugten Phänotypen wurden mittels histologischer Analysen, einer Expressionsanalyse des mesodermalen Markergens *XMyoD* mit Hilfe der Whole mount *in situ*-Hybridisierung, einer Calcein-Färbung zur Analyse der Knochenbildung und durch die räumliche Organdarstellung mit Hilfe von MRI (Magnetic resonance imaging) durchgeführt. Ein auffallendes Ergebnis all dieser Analysen war die fehlerhafte Myotomentwicklung bei HMGN-injizierten Embryonen. Paraffinschnitte sowie MRI-Analysen, aber auch Whole mount *in situ*-Hybridisierung mit dem mesodermalen Markergen *XMyoD* zeigten eine auffällige lose und ungeordnete Struktur der Myotome. Myotome sind ein Bestandteil der Somiten und entstammen somit dem Mesoderm. Wie oben bereits diskutiert, werden HMGN Proteine gerade im Mesoderm verstärkt exprimiert. Vorstellbar ist, dass die Entwicklung der Myotome eine exakt regulierte HMGN Proteinmenge benötigt und dass eine Abweichung von einer kritischen Menge Störungen in der Myotombildung verursacht. Ähnliches konnte bei der Augenentwicklung bei HMGN2-injizierten Embryonen gefunden werden. Das Auge entsteht zwar aus Ektoderm und Mesoderm, aber auch hier ist auffällig, dass die Stärke der Fehlentwicklung mit der Menge der injizierten HMGN Proteine korreliert.

Durch eine Calcein-Färbung älterer Embryonen (fünf Tage) konnte gezeigt werden, dass die Wirbelsäule bei HMGN2 injizierten Embryonen nur rudimentär oder gar nicht vorhanden ist. Diese Missbildungen sind wiederum HMGN-dosisabhängig und als ein sekundäres Phänomen anzusehen, die aus der oben beschriebenen Somitenfehlentwicklung resultiert. Die Wirbelsäule bildet sich aus dem Sklerotom, das sich aus den Somiten differenziert und ein Mesenchym um die Chorda bildet. Eine mögliche Störung der Mesoderm-Bildung kann somit vielfältige sekundäre Missbildungen, wie das Fehlen der Wirbelsäule, hervorrufen.

Besonders gut eignete sich die Magnetresonanz Mikroskopie zur Analyse der HMGN-injizierten Phänotypen. Mit Hilfe von Abbildungen 3D-rekonstruierter Embryonen und mit

Hilfe des Segmentierungs-Werkzeuges des Computerprogramms „Amira“ lassen sich die Charakteristika der Phänotypen, wie gekrümmte Körperachse, offener Rücken, Microcephalie und fehlerhafte Myotomentwicklung besonders gut verdeutlichen. Insbesondere die Information der Organanordnung im dreidimensionalen Raum und die Möglichkeit, virtuelle Schnitte in beliebigen Ebenen herzustellen, verdeutlichten die Fehlentwicklung insbesondere des Mesoderms. Das MRI-Verfahren bestätigte eindrucksvoll die durch die anderen Methoden gewonnenen Erkenntnisse und sollte bei ähnlichen Untersuchungen in Zukunft die zuerst angewendete Analyse-Methode sein.

Bislang wurden nur die Konsequenzen erhöhter HMGN Proteinnengen für die *Xenopus*-Embryonalentwicklung diskutiert. Wie wirkt sich aber eine Verringerung der HMGN Proteinnengen nach der Blastula aus?

Überraschenderweise verursachte eine Verringerung der HMGN Proteinnengen ähnliche Phänotypen wie eine Erhöhung. Auch hier finden sich eine verkürzte und gebogene Körperachse, eine gestörte Kopf- und Augenentwicklung und ein offener Rücken, wenn auch weniger ausgeprägt als bei HMGN2 injizierten Embryonen. Der „Spina bifida“-Phänotyp, der charakteristisch für erhöhte HMGN Mengen ist, zeigte sich auch bei einer Verringerung der HMGN Mengen. Auch hier konnte das MRI-Verfahren verdeutlichen, dass keine oder nur eine rudimentäre Chorda bei HMGN „knock-down“-Embryonen gebildet wurde. Entsprechend zeigte die Calceinfärbung das Fehlen einer Wirbelsäule in älteren Embryonen. Das MRI von HMGN „knock-down“-Embryonen zeigte ebenso deutlich die reduzierte und fehlerhafte Entwicklung der Somiten, aber auch, dass anteriore Strukturen weniger stark betroffen waren.

Neben diesen Gemeinsamkeiten gab es aber auch Unterschiede. Auffallend war eine deutliche Dorsalisierung der „knock-down“-Embryonen. In dem von Kao und Elinson (1988) erstellten Dorso-Anterio-Index (DAI), aufgestellt zur Einteilung von durch Lithiumchlorid (LiCl) hervorgerufenen dorsalisierten Phänotypen von *Xenopus*-Embryonen, kann man den HMGN „knock-down“-Embryonen DAI 8 zuweisen. Charakterisiert wird dieser DAI 8 durch das Fehlen des Rumpfes, der Somiten und einer irregulär geformten Chorda.

Die Spezifität der Missbildungen, hervorgerufen durch einen HMGN „knock down“, konnte eindrucksvoll durch „Rettungsexperimente“ gezeigt werden. Gleichzeitig zeigten diese Experimente wiederum, wie wichtig eine korrekte HMGN Proteinmenge für eine fehlerfreie Embryonalentwicklung ist. Während eine Koinjektion von 300 pg HMGN Protein zusammen mit den Morpholino-Antisense-Oligonukleotiden eine Rettung der Phänotypen verursachte und die Missbildungen drastisch reduzierte, führte eine Koinjektion von 3 ng HMGN Protein zu den charakteristischen Phänotypen einer erhöhten HMGN Menge. Warum führt gerade die injizierte Menge von 300 pg HMGN Protein in „knock-down“-Embryonen zur Rettung der Embryonen? Dies liegt wahrscheinlich daran, dass diese Menge an rekombinantem HMGN

Protein der Gesamtmenge der HMGN Proteine in Kontroll-Gastrulae entspricht und damit die wildtypische HMGN Proteinmenge wiederhergestellt wird (Eine *Xenopus*-Zelle enthält 6 pg DNA und ca. 6 pg Histone bei einem DNA/Histon-Massenverhältnis von 1:1. Bei einem 1%igen Anteil der HMGN Proteine an Histonen enthält eine Zelle 0,06 pg HMGN. Die 5000 Zellen einer Blastula enthalten somit ca. 300 pg HMGN Protein).

Zusammengenommen zeigen HMGN-Überexpressions- und HMGN „knock-down“-Experimente, dass eine kritische HMGN Proteinmenge wichtig für grundlegende Differenzierungsereignisse ist, insbesondere des Mesoderms. Ein Abweichen von diesen Proteinmengen nach oben oder nach unten führt zur gleichen fehlerhaften Entwicklung ganz bestimmter mesodermaler aber auch ektodermaler Strukturen. Wie lassen sich diese Fehlentwicklungen auf molekularer Ebene erklären?

### **5.5 Die HMGN Proteinmenge beeinflusst die Expression entwicklungssteuernder Gene**

Wie oben diskutiert, haben Veränderungen der HMGN Proteinmengen erhebliche Auswirkungen auf die embryonale Entwicklung von *Xenopus laevis*.

Die Struktur und die Zusammensetzung des Chromatins spielen eine sehr wichtige Rolle während embryonaler Entwicklungsprozesse und sind die Grundlage für eine differentielle Genaktivität (zusammengefasst von Patterton und Wolffe, 1996). Da HMGN Proteine Architekturelemente des Chromatins darstellen und sie damit die Genexpression beeinflussen, könnte eine veränderte HMGN Proteinmenge die kontrollierte differentielle Genaktivität stören und die Ausbildung der Phänotypen erklären. Wie bereits diskutiert, führt eine Verdrängung der HMGN Proteine vom Chromatin zu einer niedrigeren RNA-Synthese in Maus-Embryonen (Mohamed et al., 2001). Führen die injizierten HMGN Proteinmengen zu globalen Veränderungen am Chromatin?

Eine globale Veränderung des Chromatins durch extrem große HMGN Proteinmengen konnte beispielsweise an Lampenbürstenchromosomen (LBC) beobachtet werden. In älteren *Xenopus*-Oozyten fehlen HMGN Proteine an den LBC und lokalisieren im Zytoplasma. Wie durch Injektion von fluoreszierenden HMGN Proteinen gezeigt, können sie aber prinzipiell an LBC binden ohne dass sie, zumindest bei Injektion geringer Proteinmengen, die Struktur der LBC beeinflussen. Größere Mengen dagegen beeinflussen aber sehr wohl die LBC-Struktur. Nach Inkubation isolierter LBCs mit 2 µg HMGN2 Protein wurde beispielsweise beobachtet, dass sich die Chromosomen stark kondensierten und die Schleifen retrahiert wurden. Stark erhöhte HMGN-Konzentrationen führten in diesem Fall also zur strukturellen Veränderung des Chromatins. Obwohl bei der Injektion der Embryonen jene Mengen verwendet wurden, die die LBC-Struktur nicht beeinflussten, wurde zusätzlich überprüft, ob sich das embryonale Chromatin nach Überexpression oder Wegnahme der HMGN Proteine global verändert.

Zunächst wurde mit Hilfe von XHMG2-EGFP-Fusionsproteinen überprüft, wie sich eine Überexpression auf die allgemeine Chromatinstruktur auswirkt. Eine lichtmikroskopische Analyse von Quetschpräparaten zeigte, dass die Überexpression der Fusionsproteine keinerlei Einfluss auf die Kernstruktur und die nukleäre Chromatinverteilung hatte. Weiterhin wurde die Zugänglichkeit der DNA gegenüber DNasen in manipulierten und Kontroll-Embryonen überprüft. Ein derartiger Verdau des Chromatins, beispielsweise mit Micrococcus Nuklease, kann aufzeigen, ob das Chromatin dichter gepackt oder weniger dicht gepackt vorliegt. Diese Untersuchungen ergaben ein gleichartiges Chromatin-Verdauungsmuster des Chromatins aus wildtypischen und manipulierten Embryonen. Daher ist davon auszugehen, dass es zu keiner globalen Veränderung des Chromatins nach Injektion von 3ng HMG2 bzw. 20 ng MO-HMG2 kommt. Dies schließt aber nicht aus, dass durch die Manipulationen lokale Chromatinveränderungen auftreten, die durch einen Micrococcus Verdau nicht nachgewiesen werden können. Lokale Veränderungen könnten direkten Einfluss auf die Expression spezifischer entwicklungsrelevanter Gene haben und somit Störungen der embryonalen Entwicklung hervorrufen.

Eine Möglichkeit, den Einfluss der HMGN Proteine auf entwicklungsrelevante Gene zu untersuchen, bieten Induktionsprozesse, da das Umprogrammieren zellulärer Entwicklungsschicksale über differenzielle Genaktivität erfolgt. Zudem wurde gezeigt, dass Induktionsprozesse zeitlich durch die Verfügbarkeit verschiedener Chromatinkomponenten reguliert werden. Beispielsweise ist Histon H1 ein zeitlimitierender Faktor, der die Kompetenz von Zellen auf Wachstumsfaktoren zu reagieren, mitbestimmt (Steinbach et al., 1997). Wie von Steinbach et al. (1997) gezeigt wurde, werden durch den Beginn der Synthese des somatischen Histon H1 in *Xenopus*-Embryonen Gene, wie zum Beispiel die Mesoderm-spezifischen Transkriptionsfaktoren *XMyoD* und *Xbra*, inaktiviert. Zudem wurde von Catez et al. (2002) gezeigt, dass HMGN Protein und Histon H1 um die gleichen Chromatin-Bindungsstellen konkurrieren können. HMGN Proteine könnten also über diese Konkurrenz Einfluss auf Induktionsprozesse nehmen und die Transkription Mesoderm-spezifischer Gene beeinflussen. Zur Untersuchung dieser Möglichkeit wurden von Blastula-Embryonen isolierte animale Kappen von wildtypischen und HMGN-injizierten Embryonen mit Hilfe des TGF $\beta$  Wachstumsfaktors Aktivin umprogrammiert. Aktivin induziert in einem Kompetenz-Zeitfenster die Expression Mesoderm-spezifischer Gene wie *XMyoD*, *Xbra* und  $\alpha$ -actin in isolierten animalen Kappen. Wie sich gezeigt hat, wurde dieses Zeitfenster in HMGN-injizierten Embryonen im Vergleich zu wildtypischen Embryonen um ca. eine Stunde verlängert, das heißt die Expression der Mesoderm-spezifischer Gene *XMyoD*, *Xbra* und  $\alpha$ -actin wurde direkt durch die erhöhte HMGN Proteinmenge beeinflusst. Entsprechende Kontrollen, wie die Injektion der oben bereits beschriebenen nicht-funktionellen HMGN1S20,24E-Mutante, bestätigten die Spezifität der Analysen.

Wie oben beschrieben, ist Histon H1 ein zeitlimitierender Faktor des Kompetenz-Zeitfensters und eine erhöhte Histon H1 Proteinmenge führt zu einer Verkürzung der Expression Mesoderm-spezifischer Gene (Steinbach et al., 1997). HMGN Proteine zeigen genau den gegenteiligen Effekt, nämlich eine Verlängerung der Aktivität der Mesoderm-spezifischen Genexpression. Dies könnte als ein weiterer Hinweis auf ein mögliches funktionelles Zusammenspiel dieser beiden Chromatin-bindenden Proteine in lebenden Zellen hinweisen und führt zur Vermutung, dass ein antagonistisches Zusammenspiel der beiden Chromatinproteine das Zeitfenster der mesodermalen Kompetenz mitbestimmt. Ob diese Vermutung richtig ist, muss noch durch gleichzeitige Veränderung von Histon H1 und HMGN Proteinmengen im *Xenopus*-Modell detailliert untersucht werden.

Eine Überprüfung der *XHMGN* Expression im Verlauf der Mesoderminduktion in animalen Kappen zeigte, dass die Expressionsrate der *XHMGN* Gene deutlich ansteigt. Mit Verlust der mesodermalen Kompetenz wiederum ist ein Abfall der *XHMGN* Expression zu beobachten. Ein ähnlicher Zusammenhang zwischen HMGN-Expression und Induktionsprozessen wurde auch bei der Nierenentwicklung der Maus beschrieben (Lehtonen und Lehtonen, 2001). Die Tatsache, dass während eines Induktionsprozesses, ausgelöst durch TGF $\beta$  Wachstumsfaktoren, die *XHMGN* Expression erhöht wird, lässt vermuten, dass die *XHMGN* Expression direkt oder indirekt durch Aktivin reguliert wird. Ein ähnlicher Zusammenhang zwischen TGF $\beta$  Wachstumsfaktoren und HMGN-Expression wurde kürzlich bei der BMP-2 induzierten Osteogenese in C2C12-Mauszellen gefunden (unveröffentlichte Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe von R. Hock). Beide Beobachtungen zusammen eröffnen die Möglichkeit, mit neuen Ansätzen die bisher gänzlich unbekannt Regulation der HMGN-Expression zu untersuchen.

Wie Analysen mit isolierten animalen Kappen gezeigt haben, können funktionelle HMGN Proteine die Expression bestimmter Mesoderm-spezifischer Gene in Induktionsprozessen beeinflussen. Ein derartiger unerwarteter spezifischer Effekt auf den Expressionsbeginn einzelner Gene könnte auch während der Midblastula Transition in HMGN-manipulierten Embryonen zu finden sein. Einerseits zeigte der Einbau von Radioaktivität in neusynthetisierte mRNA, dass der Beginn der allgemeinen embryonalen Gentranskription in manipulierten und wildtypischen Embryonen zum gleichen Zeitpunkt stattfindet. Andererseits zeigte eine Northernblot-Analyse, dass der Expressionsbeginn eines einzelnen Gens, des Histon H1 Gens, durchaus durch eine veränderte HMGN Proteinmenge beeinflusst werden kann. Da die Phänotypen der manipulierten Embryonen die meisten Defekte in mesodermalen und neuroektodermalen Bereichen aufzeigten, wurde die Expression spezifischer Schaltergene analysiert, die diese Gewebe maßgeblich determinieren. Diese Gene sind beispielsweise *Xnr3* (Smith et al., 1995; Hansen et al., 1997), *Xnr5* (Takahashi et al., 2000), *Xbra* (Smith et al., 1991), *chordin* (Sasai et al., 1994) und *folliculin* (Hemmati-

Brivanlou et al., 1994). *Xnr3*, *chordin* und *folliculin* sind Antagonisten von BMP-4. Sie werden als Organisator-Induktoren bezeichnet und spezifizieren im Zusammenspiel mit BMP-4 dorsales bzw. ventrales Mesoderm und induzieren neurales Gewebe. Der Wachstumsfaktor *Xnr5* induziert Mesoderm wie auch Entoderm. *Xbra* wiederum kodiert einen Transkriptionsfaktor, der als Folge der Mesoderm-Induktion sehr früh exprimiert wird und dessen Expression Mesoderm charakterisiert. Der Beginn der Expression dieser Gene wurde vergleichend in HMGN-injizierten, HMGN „knock-down“-Embryonen und un-behandelten Schwesterembryonen analysiert. Dazu wurde RNA aus Embryonen im Abstand von 30 Minuten isoliert und die Genexpression durch RT-PCR untersucht. Es zeigte sich, dass eine erhöhte HMGN Menge zu einer um eine Stunde verfrühten Expression von *Xbra* führte. Die Expression der anderen untersuchten Gene unterschied sich nicht von Kontrollen und HMGN-injizierten Embryonen. In HMGN „knock-down“-Embryonen wurde *Xbra* um eine Stunde verspätet exprimiert. In den „knock-down“-Embryonen wurde noch die Expression eines weiteren Gens verändert: Die *Chordin*-Expression erfolgte überraschenderweise um 1,5 Stunden verfrüht.

Welche Konsequenzen können durch diese veränderten Genexpressionen erwartet werden? *Xbra* wird in der Marginalzone der Blastula exprimiert und wird neben der Bildung von Mesoderm auch für eine korrekte Zellbewegung während der Gastrulation benötigt (Smith et al., 2000). Ein verändertes Expressionsmuster von *Xbra*, wie es bei HMGN2-manipulierten Embryonen der Fall ist, könnte Zellbewegungen während der Gastrulation stören und so zu einer unvollkommenen Schließung des Blastoporus führen. Genau dies ist bei HMGN-manipulierten Embryonen der Fall. Andere Charakteristika der Phänotypen lassen sich durch eine veränderte *Chordin*-Expression erklären. *Chordin* wurde ursprünglich als cDNA identifiziert, die durch LiCl-Behandlung in frühen Blastulae induziert wird (Sasai et al., 1994). Eine LiCl-Behandlung von Embryonen führt zur Dorsalisierung, die in einen Dorso-Anterio-Index (DAI) eingeteilt werden können (Kao und Elinson, 1988). LiCl inhibiert die Glykogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$  und verhindert so die Phosphorylierung und damit den Abbau von  $\beta$ -Catenin (Klein und Melton, 1996; Schneider et al., 1996). Dies wiederum führt zu einer Expression von *chordin* und anderen Organisator-spezifischen Genen, wie *noggin*, *folliculin* und *Xnr3* (Wessely et al., 2001). Kürzlich wurde gezeigt, dass eine Dorsalisierung durch Injektion von *chordin* mRNA induziert werden kann (Oelgeschläger et al., 2003). Die verfrühte Expression von *chordin* in den HMGN „knock-down“-Embryonen dürfte damit für die beobachtete Dorsalisierung der Embryonen verantwortlich sein.

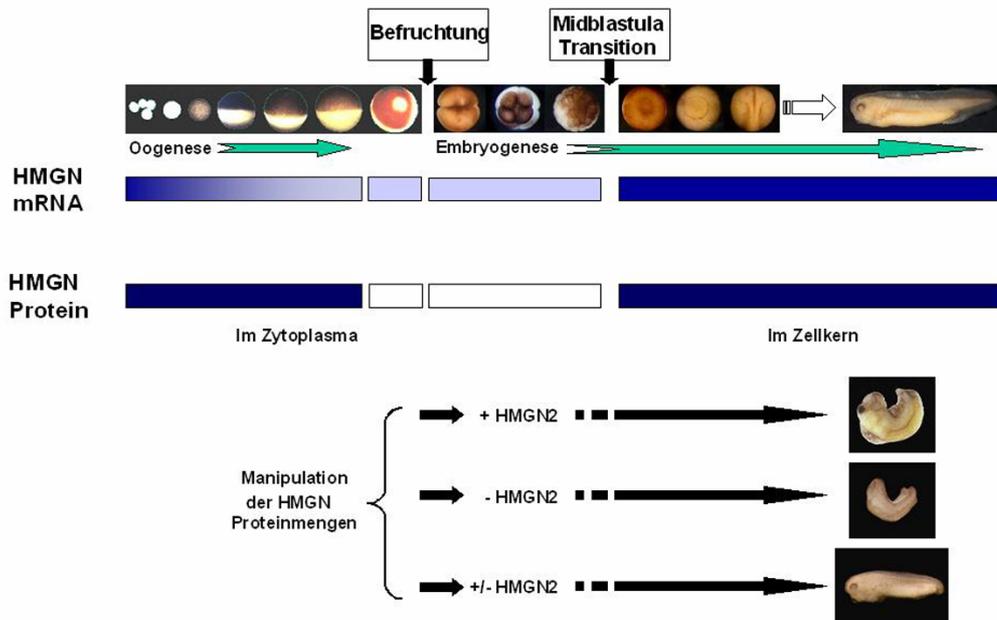
Zusammengenommen haben die Untersuchungen also gezeigt, dass veränderte HMGN Proteinmengen die Expression entwicklungsrelevanter Markergene beeinflussen. Die veränderte Expression von *Xbra* und *chordin* selbst erklären Charakteristika der Phänotypen, wie fehlerhafte Gastrulationsbewegungen oder Dorsalisierung. Da beide Genprodukte als

Transkriptionsfaktoren und Antagonisten von BMP-4 an der Spitze von Genhierarchien platziert sind, lassen sich auch viele der Missbildungen als sekundäre oder „downstream“-Effekte erklären, die durch eine fehlerhafte Expression von *Xbra*- oder *chordin*-abhängigen Genen entstanden sind.

*Xbra* beispielsweise hemmt die Expression von Genen, die Transkriptionsfaktoren codieren (Mochizuki et al., 2000), die an der Expressions-Hemmung von *chordin* beteiligt sind (Sasai et al., 1994). Somit könnte die verfrühte Expression von *chordin* durch eine verzögerte Expression von *Xbra* und damit durch den Wegfall eines Transkriptioninhibitors verursacht worden sein. Vorstellbar ist auch, dass HMGN Proteine die Expression weiterer bis jetzt noch nicht untersuchter regulatorischer Gene beeinflussen. Dies könnte beispielsweise andere Charakteristika der HMGN manipulierten Embryonen, wie Microcephalie, erklären.

Der genaue Mechanismus, wie HMGN Proteine im Stande sind, die Expression spezifischer Gene zu beeinflussen, ist momentan nicht bekannt. Eine Möglichkeit wäre es, dass HMGN Proteine als Teil eines Multiproteinkomplexes an spezifische Regionen der DNA binden (Lim et al., 2002). Die hohe Mobilität der HMGN Proteine und ihre Fähigkeit, sich sehr schnell mit einer Diffusionskonstante von  $0,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$  durch den gesamten Zellkern zu bewegen sowie ihre transienten Interaktionen mit Nukleosomen könnte ein Teil eines Mechanismus sein, der den Zugang von Transkriptionsfaktoren zu ihren Bindungsstellen reguliert. Eine manipulierte HMGN Proteinmenge könnte somit die Zugänglichkeit dieser Transkriptionsfaktoren zu ihren Bindungsstellen verändern und somit das Expressionsmuster spezifischer Gene, wie beispielsweise *Xbra*, beeinflussen.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse einen klaren Zusammenhang zwischen HMGN Proteinmenge und der frühen embryonalen Entwicklung von *Xenopus* (Abb. 68). Zudem konnte erstmals gezeigt werden, dass die Expression entwicklungsrelevanter Gene durch HMGN Proteine beeinflusst wird.



**Abb.68:** Zusammenfassende Übersicht der HMGN-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene während der Oogenese und Embryogenese von *Xenopus laevis*. Während der Oogenese sind sowohl *XHMGN1* und *XHMGN2* mRNAs als auch *XHMGN1* und *XHMGN2* Proteine in den Oozytenstadien I-VI vorhanden. Mit der Maturation der Oozyten werden die HMGN Proteine degradiert und können erst wieder nach der Midblastula Transition detektiert werden. *HMGN*-mRNA kann auch vor der Midblastula Transition in kleinen Mengen nachgewiesen werden. In älteren Oozyten (V-VI) sind die HMGN Proteine im Zytoplasma lokalisiert und vom Zellkern ausgeschlossen. Während der Embryogenese sind die *XHMGN* Proteine im Zellkern lokalisiert. Im unteren Teil der Abbildung sind manipulierte Embryonen abgebildet, denen HMGN2 Protein (+HMGN2), Morpholino-Antisense-Oligonukleotide (-HMGN2) oder beides gleichzeitig (+/-HMGN2) injiziert wurde.

## 5.6 Ausblick

Aufbauend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit können jetzt zahlreiche weiterführende Fragestellungen bearbeitet werden, um die molekularen Wirkungsmechanismen der HMGN Proteine aufzuklären.

Erstens, wie werden HMGN Proteine vom Zellkern der Oozyten ausgeschlossen? Hier könnte ein Ansatz die Analyse des Phosphorylierungszustandes der *XHMGN* Proteine und die Fahndung nach HMGN-interagierenden Proteinen vielversprechend sein. Schon bekannt ist, dass phosphorylierte HMGN Proteine durch Bindung an 14-3-3 $\zeta$  Proteine im Zytoplasma somatischer Zellen gehalten werden (Prymakowska-Bosak et al., 2002). Ein ähnlicher Mechanismus ist auch für Oozyten vorstellbar und könnte so auch für andere Chromatinproteine Gültigkeit haben. Gleichzeitig eignet sich das *Xenopus*-Modell sehr gut, bislang unbekannte HMGN-interagierende Proteine zu identifizieren und die für die Phosphorylierung verantwortliche Kinase zu identifizieren. Tatsächlich besitzen *Xenopus* Oozyten- und Eiextrakte eine HMGN-phosphorylierende Kinaseaktivität (unveröffentlichte Daten aus der Arbeitsgruppe von R. Hock).

Zweitens, wie wirkt sich das dynamische Zusammenspiel von HMGN Proteinen und Histon H1 auf die Chromatinstruktur und die Embryonalentwicklung aus? Wie gezeigt wurde, ist das Expressionsmuster von Histon H1 und HMGN Proteinen während der Embryogenese sehr

ähnlich und beide Proteine sind nicht mit Lampenbürstenchromosomen älterer Oozyten assoziiert (Hock et al., 1993; Smith et al., 1988; Dworkin-Rastl et al., 1994). Zusätzlich zeigt die Arbeit von Catez et al. (2002), dass Histon H1 und HMGN Proteinen um die gleichen Chromatin-Bindungsstellen konkurrieren. Ob beide Chromatinproteine möglicherweise funktionelle Gegenspieler sind, kann durch Untersuchungen der Oogenese und Embryogenese bei *Xenopus* als Modellsystem analysiert werden. Eine Injektion von Histon H1 in Oozyten führte zur Kondensation und transkriptionellen Inaktivierung der LBC (Hock et al., 1993). Durch Koinjektion von Histon H1 und HMGN Proteinen könnte beispielsweise überprüft werden, ob HMGN Proteine dieser H1-induzierten Kompaktierung des Chromatins entgegenwirken. Interessant wären Titrationsversuche, welche die Proteinmengen von Histon H1 und HMGN Proteinen während der Embryogenese verändern. Mittels Morpholino-Antisense-Oligonukleotiden von Histon H1 und HMGN, die in die Zygote von *Xenopus* injiziert werden, und rekombinanten Histon H1 und HMGN Proteinen könnten die relativen Proteinmengen beliebig manipuliert werden und ihr Einfluss auf die Embryonalentwicklung sowie Differenzierungskompetenz und Genexpression analysiert werden.

Drittens, wie wird die Expression der HMGN Proteine selbst reguliert? Über die Regulation der *HMGN*-Gene ist bislang nichts bekannt. Umso interessanter war das Ergebnis, dass die Expression von HMGN Proteinen durch TGF $\beta$ -Wachstumsfaktoren nach oben reguliert wird. Dies gilt im „animalen cap assay“ nach Induktion mit Aktivin genauso wie für C2C12-Mauszellen nach Induktion mit BMP-2 (unveröffentlichte Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe von R. Hock). TGF $\beta$ -Wachstumsfaktoren wirken über den Smad-Signalweg, der direkt oder indirekt bei der Regulation der HMGN-Genexpression beteiligt sein könnte. Eine Computeranalyse (TFsitescan, Ghosh et al., 2000 und Genomatix-Packet/MatInspector) der Promotorregion des HMGN2-Gens vom Huhn (0-500) ergab sowohl putative Smad-Bindungsstellen als auch zahlreiche SP1-Bindungsstellen. Die Expression des SP1-Transkriptionsfaktors wird durch TGF $\beta$  und den Smad-Signalweg reguliert (Moustakas et al., 2002). Zwischenzeitlich ist es gelungen, einen genomischen Klon von XHMGN2 zu isolieren. Die Sequenzierung des XHMGN2-Genbereiches steht kurz vor dem Abschluss. Damit werden sich interessante funktionelle Promotoranalysen im *Xenopus*-Modell durchführen lassen.

## 6 Zusammenfassung

HMGN Proteine sind Strukturelemente des Chromatins und besitzen die Fähigkeit, Chromatin aufzulockern. Sie ermöglichen anderen Proteinen den Zugang zu Nukleosomen und unterstützen DNA-abhängige Prozesse wie Replikation, Transkription und DNA-Reparatur. In dieser Arbeit wurde die funktionelle Rolle der HMGN Proteine während der Embryogenese am Beispiel des südafrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* untersucht. Dabei wurde entdeckt, dass sowohl die Expression als auch die zelluläre Verteilung der HMGN Proteine entwicklungspezifisch reguliert ist. Eine Manipulation der HMGN Proteinmengen während der Embryonalentwicklung führte zu schweren Fehlentwicklungen in Postblastula Embryonen.

In der Oogenese waren sowohl *Xenopus HMGN* mRNAs als auch *Xenopus HMGN* Proteine in allen Oozytenstadien nachweisbar. Interessanterweise waren HMGN Proteine in späteren Oozytenstadien nur im Zytoplasma zu finden und nicht mit Lampenbürstenchromosomen assoziiert. Im Zuge der Maturation der Oozyten zu Eiern verschwinden die Proteine gänzlich. Während der Embryogenese waren HMGN Proteine dann erst wieder ab der Blastula detektierbar, zeitgleich mit der transkriptionellen Aktivierung des embryonalen Genoms. Gleichzeitig wiesen ihre Expressionsmuster, zumindest auf mRNA-Ebene, auf Gewebespezifität hin. Whole mount *in situ*-Hybridisierungen und RT-PCR-Analysen zeigten eine erhöhte mRNA-Menge in mesodermalen und neuroektodermalen Geweben von Schwanzknospenstadien. Nach Injektion rekombinanter HMGN Proteine (Überexpression) oder Morpholino-Antisense-Oligonukleotiden (knock-down) in die Zygote entwickelten sich Embryonen mit offenen Rücken, stark verkürzten und gebogenen Körperachsen und deformierten Kopfstrukturen als Hauptmerkmale. Histologische Analysen und insbesondere die Magnetresonanz Bildgebung deuteten auf Fehler in der Mesoderm-differenzierung hin. Die Analysen zeigen, dass eine bestimmte kritische zelluläre HMGN Proteinmenge für eine korrekte Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* notwendig ist. Durch „animal cap assays“ und RT-PCR-Expressionsanalysen Mesoderm-spezifischer Gene konnte schließlich gezeigt werden, dass HMGN Proteine die Regulation Mesoderm-spezifischer Gene beeinflussen. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass auch die *HMGN*-Genexpression während der Mesoderm-differenzierung reguliert wird. Durch eine Analyse des Expressionsbeginns entwicklungsrelevanter Gene während der Midblastula Transition konnte gezeigt werden, dass veränderte HMGN Proteinmengen den Expressionsbeginn spezifischer Gene wie *Xbra* und *chordin* beeinflussen. Damit konnte zum ersten Mal ein Einfluss dieser ubiquitären Chromatinproteine auf die Expression spezifischer Gene gefunden werden. Die durch HMGN Proteine verursachte fehlerhafte Expression von *Xbra*

und *chordin* als Schlüsselgene der Mesodermdifferentenzierung kann die Fehlentwicklungen mesodermaler Strukturen erklären.

## Summary

HMGN proteins are architectural chromatin proteins that reduce the compaction of the chromatin fiber, facilitate access to nucleosomes and modulate DNA-dependent processes such as replication, transcription and DNA repair. In this work the functional role of the HMGN proteins during embryogenesis was analyzed using the African clawed frog *Xenopus laevis* as a model system. The expression and cellular location of the HMGN proteins was found to be developmentally regulated. Experimental manipulations of the HMGN protein amounts led to gross developmental defects in postblastula embryos.

HMGN transcripts and proteins were present throughout oogenesis. Interestingly, the HMGN proteins were stored in the cytoplasm of later oocyte stages and excluded from the oocytes nuclei and lampbrush chromosomes. Upon maturation of oocytes into eggs, HMGN proteins were no longer detectable. During embryogenesis, HMGN proteins were first detected in blastula stage embryos, coinciding with the transcriptional activation of the embryonic genome. At least at the mRNA level the expression pattern showed a tissue specific pattern, with relatively high levels of mRNAs in the mesodermal and neuroectodermal regions of early tailbud embryos as shown by whole mount *in-situ* hybridization and RT-PCR-analyses. After microinjection of recombinant HMGN proteins (overexpression) or morpholino-antisense oligonucleotides (knock-down) the embryos displayed typical phenotypes with imperfect closure of the blastopore, distorted body axis and abnormal head structures. Histological analyses and magnetic resonance imaging indicated that mesoderm differentiation was particularly affected by aberrant HMGN protein levels. The results demonstrate that proper embryonic development of *Xenopus laevis* requires precisely regulated levels of HMGN proteins. "Animal cap assays" and RT-PCR-analyses of the expression of mesodermal genes indicated that HMGN proteins are involved in the regulation of mesoderm specific genes. These experiments also indicated that the *HMGN* expression itself is regulated during mesoderm differentiation. Moreover, by studying the expression pattern of developmentally relevant genes during midblastula transition it became evident that altered HMGN protein levels influence the onset of the expression of specific genes such as *Xbra* and *chordin*. The results show, for the first time, that these ubiquitous chromatin proteins modulate the expression of specific genes. The HMGN-induced misexpression of *Xbra* and *chordin* as key regulatory genes during mesoderm differentiation may explain the observed malformations of mesodermal structures.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aasland, R. und Stewart, A. F. (1995).** The chromo shadow domain, a second chromo domain in heterochromatin-binding protein 1, HP1. *Nucleic Acids Res.* **23**, 3168-74.
- Adenot, P.G., Campion, E., Legouy, E., Allis, C.D., Dimitrov, S., Renard, J.P. und Thompson, E.M. (2000).** Somatic linker histone H1 is present throughout mouse embryogenesis and is not replaced by variant H1. *J. Cell Sci.* **113**, 2897-2907.
- Adolphs, K. W., Cheng, S. M., Paulson, J. R. und Laemmli, U. K. (1977).** Isolation of a protein scaffold from mitotic HeLa cell chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74**, 4937-41.
- Agresti, A. und Bianchi, M. E. (2003).** HMGB proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev.* **13**, 170-8.
- Alfonso, P.J., Crippa, M.P., Hayes, J.J. und Bustin M. (1994).** The footprint of chromosomal proteins HMG14 and HMG17 on chromatin subunits. *J. Mol. Biol.* **236**, 189-198.
- Anand, A. und Chada, K. (2000).** In vivo modulation of Hmgic reduces obesity. *Nat Genet.* **24**, 377-80.
- Andrews, M. T., Loo, S. und Wilson, L. R. (1991).** Coordinate inactivation of class III genes during the Gastrula-Neurula Transition in *Xenopus*. *Dev Biol.* **146**, 250-4.
- Aravind, L. und Landsman, D. (1998).** AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* **26**, 4413-21.
- Arlotta, P., Tai, A. K., Manfioletti, G., Clifford, C., Jay, G. und Ono, S. J. (2000).** Transgenic mice expressing a truncated form of the high mobility group I-C protein develop adiposity and an abnormally high prevalence of lipomas. *J Biol Chem.* **275**, 14394-400.
- Bagga, R., Michalowski, S., Sabnis, R., Griffith, J. D. und Emerson, B. M. (2000).** HMG I/Y regulates long-range enhancer-dependent transcription on DNA and chromatin by changes in DNA topology. *Nucleic Acids Res.* **28**, 2541-50.
- Banks, G. C., Li, Y. und Reeves, R. (2000).** Differential in vivo modifications of the HMGI(Y) nonhistone chromatin proteins modulate nucleosome and DNA interactions. *Biochemistry.* **39**, 8333-46.
- Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C. und Kouzarides, T. (2001).** Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature.* **410**, 120-4.
- Barratt, M. J., Hazzalin, C. A., Zhelev, N. und Mahadevan, L. C. (1994).** A mitogen- and anisomycin-stimulated kinase phosphorylates HMG-14 in its basic amino-terminal domain in vivo and on isolated mononucleosomes. *Embo J.* **13**, 4524-35.
- Battista, S., Fidanza, V., Fedele, M., Klein-Szanto, A. J., Outwater, E., Brunner, H., Santoro, M., Croce, C. M. und Fusco, A. (1999).** The expression of a truncated HMGI-C gene induces gigantism associated with lipomatosis. *Cancer Res.* **59**, 4793-7.
- Beaujean, N., Bouniol-Baly, C., Monod, C., Kissa, K., Jullien, D., Aulner, N., Amirand, C., Debey, P. und Kas, E. (2000).** Induction of early transcription in one-cell mouse embryos by microinjection of the nonhistone chromosomal protein HMG-I. *Dev Biol.* **221**, 337-54.
- Bednar, J., Horowitz, R. A., Grigoryev, S. A., Carruthers, L. M., Hansen, J. C., Koster, A. J. und Woodcock, C. L. (1998).** Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 14173-8.
- Begum, N., Pash, J. M. und Bhorjee, J. S. (1990).** Expression and synthesis of high mobility group chromosomal proteins in different rat skeletal cell lines during myogenesis. *J Biol Chem.* **265**, 11936-41.

- Berezney, R. und Coffey, D. S. (1977).** Nuclear matrix. Isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei. *J Cell Biol.* **73**, 616-37.
- Bergel, M., Herrera, J. E., Thatcher, B. J., Prymakowska-Bosak, M., Vassilev, A., Nakatani, Y., Martin, B. und Bustin, M. (2000).** Acetylation of novel sites in the nucleosomal binding domain of chromosomal protein HMG-14 by p300 alters its interaction with nucleosomes. *J Biol Chem.* **275**, 11514-20.
- Bernardini, G., Prati, M., Bonetti, E. und Scari, G. (1999).** Atlas of *Xenopus* Development. Springer Verlag, Milano
- Blum, H., Beier, H., und Gross, H. J. (1987).** Improved silverstaining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Birger, Y., Ito, Y., West, K. L., Landsman, D. und Bustin, M. (2001).** HMGN4, a newly discovered nucleosome-binding protein encoded by an intronless gene. *DNA Cell Biol.* **20**, 257-64.
- Birger, Y., West, K. L., Postnikov, Y. V., Lim, J. H., Furusawa, T., Wagner, J. P., Laufer, C. S., Kraemer, K. H. und Bustin, M. (2003).** Chromosomal protein HMGN1 enhances the rate of DNA repair in chromatin. *Embo J.* **22**, 1665-75.
- Bonaldi, T., Talamo, F., Scaffidi, P., Ferrera, D., Porto, A., Bachi, A., Rubartelli, A., Agresti, A. und Bianchi, M. E. (2003).** Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *Embo J.* **22**, 5551-60.
- Boulikas, T., Wiseman, J. M. und Garrard, W. T. (1980).** Points of contact between histone H1 and the histone octamer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **77**, 127-31.
- Boulikas, T. (1995).** Chromatin domains and prediction of MAR sequences. *Int Rev Cytol.* **162A**, 279-388.
- Bouvet, P. und Wolffe, A. P. (1994).** A role for transcription and FRGY2 in masking maternal mRNA within *Xenopus* oocytes. *Cell.* **77**, 931-41.
- Bouvet, P., Dimitrov, S. und Wolffe, A.P. (1994).** Specific regulation of *Xenopus* chromosomal 5S rRNA gene transcription in vivo by histone H1. *Genes Dev.* **8**, 1147-1159.
- Bradbury, E. M. (1992).** Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. *Bioessays.* **14**, 9-16.
- Bustin, M., Lehn, D. A. und Landsman, D. (1990).** Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes. *Biochim Biophys Acta.* **1049**, 231-43.
- Bustin, M., Becerra, P.S., Crippa, M.P., Lehn, D.A., Pash, J.M. und Shiloach, J. (1991).** Recombinant human chromosomal proteins HMG-14 and HMG-17. *Nucl. Acids Res.* **19**, 3115-3121.
- Bustin, M., Trieschmann, L. und Postnikov, Y. V. (1995).** The HMG-14/-17 chromosomal protein family: architectural elements that enhance transcription from chromatin templates. *Semin Cell Biol.* **6**, (4), 247-55.
- Bustin, M. und Reeves, R. (1996).** High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **54**, 35-100.
- Bustin, M. (1999).** Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol.* **19**, 5237-46.
- Bustin, M. (2001).** Chromatin unfolding and activation by HMGN(\*) chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci.* **26**, 431-7.
- Callan, H. G. (1986).** Lampbrush chromosomes. *Mol Biol Biochem Biophys.* **36**, 1-252.
- Callan, H. G., Gall, J. G. und Berg, C. A. (1987).** The lampbrush chromosomes of *Xenopus laevis*: preparation, identification, and distribution of 5S DNA sequences. *Chromosoma.* **95**, 236-50.
- Calogero, S., Grassi, F., Aguzzi, A., Voigtlander, T., Ferrier, P., Ferrari, S. und Bianchi, M. E. (1999).** The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat Genet.* **22**, 276-80.
- Catez, F., Brown, D. T., Misteli, T. und Bustin, M. (2002).** Competition between histone H1 and HMGN proteins for chromatin binding sites. *EMBO Rep.* **3**, 760-6.

- Catez, F., Lim, J. H., Hock, R., Postnikov, Y. V. und Bustin, M. (2003).** HMGN dynamics and chromatin function. *Biochem Cell Biol.* **81**, 113-22.
- Cheutin, T., McNairn, A. J., Jenuwein, T., Gilbert, D. M., Singh, P. B. und Misteli, T. (2003).** Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science.* **299**, 721-5.
- Chase, M. B., Haga, S. B., Hankins, W. D., Williams, D. M., Bi, Z., Strovel, J. W., Obriecht, C. und Berg, P. E. (1999).** Binding of HMG-I(Y) elicits structural changes in a silencer of the human beta-globin gene. *Am J Hematol.* **60**, 27-35.
- Christensen, M. O., Larsen, M. K., Barthelmes, H. U., Hock, R., Andersen, C. L., Kjeldsen, E., Knudsen, B. R., Westergaard, O., Boege, F. und Mielke, C. (2002).** Dynamics of human DNA topoisomerases IIalpha and IIbeta in living cells. *J Cell Biol.* **157**, 31-44.
- Chiappetta, G., Avantaggiato, V., Visconti, R., Fedele, M., Battista, S., Trapasso, F., Merciai, B. M., Fianza, V., Giancotti, V., Santoro, M., Simeone, A. und Fusco, A. (1996).** High level expression of the HMGI (Y) gene during embryonic development. *Oncogene.* **13**, 2439-46.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162**, 156-9.
- Cox, R. A. (1968).** Hydrolysis of polynucleotides and the characterization of their secondary structure. A theoretical study. *Biochem J.* **106**, 725-31.
- Crippa, M. P., Nickol, J. M. und Bustin, M. (1991).** Developmental changes in the expression of high mobility group chromosomal proteins. *J Biol Chem.* **266**, 2712-4.
- Crippa, M. P., Alfonso, P. J. und Bustin, M. (1992).** Nucleosome core binding region of chromosomal protein HMG-17 acts as an independent functional domain. *J Mol Biol.* **228**, 442-9.
- Dale, L. und Slake, J.M.W. (1987).** Fate map for the 32-cell stage of *Xenopus laevis*. *Development* **99**: 527-551.
- Dayhoff, M.O. (1972).** Atlas of protein sequence and structure. *National Biomedical Research Foundation Press.* Vol. **5**, p48.
- De Robertis, E. M. und Sasai, Y. (1996).** A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. *Nature.* **380**, 37-40.
- Detivaud, L., Pettit, G. R. und Meijer, L. (1999).** Characterization of a novel cdk1-related kinase. *Eur J Biochem.* **264**, 55-66.
- Dimitrov, S., Almouzni, G., Dasso, M. und Wolffe, A. P. (1993).** Chromatin transitions during early *Xenopus* embryogenesis: changes in histone H4 acetylation and in linker histone type. *Dev Biol.* **160**, 214-27.
- Dimitrov, S., Dasso, M. C. und Wolffe, A. P. (1994).** Remodeling sperm chromatin in *Xenopus laevis* egg extracts: the role of core histone phosphorylation and linker histone B4 in chromatin assembly. *J Cell Biol.* **126**, 591-601.
- Ding, H. F., Bustin, M. und Hansen, U. (1997).** Alleviation of histone H1-mediated transcriptional repression and chromatin compaction by the acidic activation region in chromosomal protein HMG-14. *Mol Cell Biol.* **17**, 5843-55.
- Disney, J. E., Johnson, K. R., Magnuson, N. S., Sylvester, S. R. und Reeves, R. (1989).** High-mobility group protein HMG-I localizes to G/Q- and C-bands of human and mouse chromosomes. *J Cell Biol.* **109**, 1975-82.
- Dodgson, J.B., Browne, D.L. und Black A.J. (1988).** Chicken chromosomal protein HMGN1 and HMGN2 cDNA clones: isolation, characterization and sequence comparison. *Gene* **63**, 287-295.
- Dumont, J.N. (1972).** Oogenesis of *Xenopus laevis* (Daudin). *J. Morph.* **136**: 153-180.
- Dworkin-Rastl, E., Kandolf, H. und Smith, R. C. (1994).** The maternal histone H1 variant, H1M (B4 protein), is the predominant H1 histone in *Xenopus* pregastrula embryos. *Dev Biol.* **161**, 425-39.
- Earnshaw, W. C., Halligan, B., Cooke, C. A., Heck, M. M. und Liu, L. F. (1985).** Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds. *J Cell Biol.* **100**, 1706-15.

- Earnshaw, W. C. (1988).** Mitotic chromosome structure. *Bioessays*. **9**, 147-50.
- Eissenberg, J. C. und Elgin, S. C. (2000).** The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr Opin Genet Dev*. **10**, 204-10.
- Falvo, J. V., Thanos, D. und Maniatis, T. (1995).** Reversal of intrinsic DNA bends in the IFN beta gene enhancer by transcription factors and the architectural protein HMG I(Y). *Cell*. **83**, 1101-11.
- Fernandes, D. J. und Catapano, C. V. (1995).** The nuclear matrix as a site of anticancer drug action. *Int Rev Cytol*. **162A**, 539-76.
- Finch, J. T. und Klug, A. (1976).** Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **73**, 1897-901.
- Fu, H., Subramanian, R. R. und Masters, S. C. (2000).** 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **40**, 617-47.
- Gall, J. G., Murphy, C., Callan, H. G. und Wu, Z. A. (1991).** Lampbrush chromosomes. *Methods Cell Biol*. **36**, 149-66.
- Gall, J. G. (1998).** Spread preparation of *Xenopus* germinal vesicle contents. In *Cell: A Laboratory Manual, Vol.1, Cold Spring Harbor Lab. Press*, 52.1-52.4.
- Gao, S., Chung, Y., G., Parseghian, M., H., King, G., J., Adashi, E., Y. und Latham, K., E. (2004).** Rapid H1 linker histone transitions following fertilization or somatic cell nuclear transfer: evidence for a uniform developmental program in mice. *Dev. Biol*. **266**, 62-75.
- Gasser, S. M. und Laemmli, U. K. (1986).** Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. *Cell*. **46**, 521-30.
- Gasser, S. M. und Laemmli, U. K. (1987).** Improved methods for the isolation of individual and clustered mitotic chromosomes. *Exp Cell Res*. **173**, 85-98.
- Gawantka, V., Pollet, N., Delius, H., Vingron, M., Pfister, R., Nitsch, R., Blumenstock, C. und Niehrs, C. (1998).** Gene expression screening in *Xenopus* identifies molecular pathways, predicts gene function and provides a global view of embryonic patterning. *Mech. Dev*. **77**, 95-141.
- Ge, H. und Roeder, R. G. (1994).** The high mobility group protein HMG1 can reversibly inhibit class II gene transcription by interaction with the TATA-binding protein. *J Biol Chem*. **269**, 17136-40.
- Ghosh, D. (2000).** Object-oriented transcription factors database (ooTFD). *Nucleic Acids Res*. **28**, 308-10.
- Grainger, R.M. und Gurdon, J.B. (1989).** Loss of competence in amphibian induction can take place in single nondividing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **86**, 1900-1904.
- Grammer, T.G., Liu, K.J., Mariani, F.V. und Harland R.M. (2000).** Use of large-scale expression cloning screens in the *Xenopus laevis* tadpole to identify gene function. *Dev. Biol*. **228**, 197-210.
- Graziano, V., Gerchman, S. E., Schneider, D. K. und Ramakrishnan, V. (1994).** Histone H1 is located in the interior of the chromatin 30-nm filament. *Nature*. **368**, 351-4.
- Gurdon, J.B., Harger, P., Mitchell, A. und Lemaire, P. (1994).** Activin signaling and response to a morphogen gradient. *Nature* **371**, 487-492.
- Hansen, C. S., Marion, C. D., Steele, K., George, S. und Smith, W. C. (1997).** Direct neural induction and selective inhibition of mesoderm and epidermis inducers by *Xnr3*. *Development*. **124**, 483-92.
- Harland, R.M. (1991).** In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol*. **36**, 685-695.
- Harrer, M., Lührs, H., Bustin, M., Scheer, U und Hock, R. (2004).** Dynamic interaction of HMGA1a proteins with chromatin. *Journal of Cell Science*. (zur Publikation angenommen).
- Hausen, P. und Ribesell, M. (1991).** The early development of *Xenopus laevis*. An Atlas of Histology. *Springer Verlag*, Berlin, Heidelberg, New York.
- Heitz, E. (1929).** Heterochromatin, Chromocentren, Chromomeren (Vorläufige Mitteilung). *Ber. Dtsch. Bot. Ges*. **47**, 274-284.

- Hemmati-Brivanlou, A., Kelly, O. G. und Melton, D. A. (1994).** Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell*. **77**, 283-95.
- Hensey, C. und Gautier, J. (1998).** Programmed cell death during *Xenopus* development: a spatio-temporal analysis. *Dev Biol*. **203**, 36-48.
- Herrera, J. E., Sakaguchi, K., Bergel, M., Trieschmann, L., Nakatani, Y. und Bustin, M. (1999).** Specific acetylation of chromosomal protein HMG-17 by PCAF alters its interaction with nucleosomes. *Mol Cell Biol*. **19**, 3466-73.
- Herrera, J. E., West, K. L., Schiltz, R. L., Nakatani, Y. und Bustin, M. (2000).** Histone H1 is a specific repressor of core histone acetylation in chromatin. *Mol Cell Biol*. **20**, 523-529.
- He, Q., Liang, C. H. und Lippard, S. J. (2000).** Steroid hormones induce HMG1 overexpression and sensitize breast cancer cells to cisplatin and carboplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 5768-72.
- Hock, R., Moorman, A., Fischer, D. und Scheer, U. (1993).** Absence of somatic histone H1 in oocytes and preblastula embryos of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol*. **158**, 510-522.
- Hock, R., Wilde, F., Scheer, U. und Bustin, M. (1998a).** Dynamic relocation of chromosomal protein HMG-17 in the nucleus is dependent on transcriptional activity. *EMBO J*. **17**, 6992-7001.
- Hock, R., Scheer, U. und Bustin, M. (1998b).** Chromosomal proteins HMG-14 and HMG-17 are released from mitotic chromosomes and imported into the nucleus by active transport. *J Cell Biol*. **143**, 1427-36.
- Hopwood, N. D., Pluck, A. und Gurdon, J. B. (1989).** MyoD expression in the forming somites is an early response to mesoderm induction in *Xenopus* embryos. *Embo J*. **8**, 3409-17.
- Horowitz, R. A., Agard, D. A., Sedat, J. W. und Woodcock, C. L. (1994).** The three-dimensional architecture of chromatin in situ: electron tomography reveals fibers composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon. *J Cell Biol*. **125**, 1-10.
- James, T. C. und Elgin, S. C. (1986).** Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol Cell Biol*. **6**, 3862-72.
- Johns, E. W. (1982).** The HMG chromosomal proteins. *Academic Press, London, United Kingdom*.
- Jones, E.A. und Woodland, H.R. (1987).** The development of animal cap cells in *Xenopus*: a measure of the start of animal cap competence to form mesoderm. *Development*. **101**, 557-563.
- Kandolf, H. (1994).** The H1A histone variant is an in vivo repressor of oocyte-type 5S gene transcription in *Xenopus laevis* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **91**, 7257-7261.
- Kao, K. R. und Elinson, R. P. (1988).** The entire mesodermal mantle behaves as Spemann's organizer in dorsoanterior enhanced *Xenopus laevis* embryos. *Dev Biol*. **127**, 64-77.
- Khochbin, S. und Wolffe, A. P. (1994).** Developmentally regulated expression of linker-histone variants in vertebrates. *Eur J Biochem*. **225**, 501-10.
- Khochbin, S. (2001).** Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene*. **271**, 1-12.
- Khochbin, S. und Kao, H. Y. (2001).** Histone deacetylase complexes: functional entities or molecular reservoirs. *FEBS Lett*. **494**, 141-4.
- Klein, P. S. und Melton, D. A. (1996).** A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**, 8455-9.
- Kleinschmidt, J.A., Scheer, U., Dabauvalle, M.C., Bustin, M. und Franke, W.W. (1983).** High mobility group proteins of amphibian oocytes: A large storage pool of a soluble high mobility group-1-like protein and involvement in transcriptional events. *J. Cell Biol*. **97**, 838-848.

- Kleinschmidt, J.A., Fortkamp, E., Krohne, G., Zentgraf, H. und Franke, W.W. (1985).** Co-existence of two different types of soluble histone complexes in nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* **260**, 1166-76.
- Kleinschmidt, J. A. und Steinbeisser, H. (1991).** DNA-dependent phosphorylation of histone H2A.X during nucleosome assembly in *Xenopus laevis* oocytes: involvement of protein phosphorylation in nucleosome spacing. *Embo J.* **10**, 3043-50.
- Kneissel, S., Franke, W.W., Gall, J.G., Heid, H., Reidenbach, S., Schnolzer, M., Spring, H., Zentgraf, H. und Schmidt-Zachmann, M.S. (2001).** A novel karyoskeletal protein: characterization of protein NO145, the major component of nucleolar cortical skeleton in *Xenopus* oocytes. *Mol. Biol. Cell* **12**, 3904-3918.
- Körner, U., Bustin, M., Scheer, U. und Hock, R. (2003).** Developmental role of HMGN proteins in *Xenopus laevis*. *Mech Dev.* **120**, 1177-92.
- Krynetski, E. Y., Krynetskaia, N. F., Bianchi, M. E. und Evans, W. E. (2003).** A nuclear protein complex containing high mobility group proteins B1 and B2, heat shock cognate protein 70, ERp60, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in the cytotoxic response to DNA modified by incorporation of anticancer nucleoside analogues. *Cancer Res.* **63**, 100-6.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. und Jenuwein, T. (2001).** Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature.* **410**, 116-20.
- Landsman, D., Soares, N., Gonzalez, F.J. und Bustin, M. (1986).** Chromosomal protein HMG-17. Complete human cDNA sequence and evidence for a multigene family. *J.Biol. Chem.* **261**, 7479-7484.
- Landsman, D., Zavou, S., Soares, N., Goodwin, G.H. und Bustin, M. (1988a).** Mouse non-histone chromosomal protein HMG-17 cDNA sequence. *Nucleic Acids Res.* **16**, 10386.
- Landsman, D., Srikantha, T. und Bustin, M. (1988b).** Single copy gene for the chicken non-histone chromosomal protein HMG-17. *J.Biol.Chem.* **263**, 3917-3923.
- Landsman, D., McBride, O.W., Soares, N., Crippa, M.P., Srikantha, T. und Bustin, M. (1989).** Chromosomal Protein HMG-14. Identification, characterization of a functional gene from a large human multigene family. *J.Biol.Chem.* **264**, 3421-3427.
- Landsman, D. und Bustin, M. (1990).** Mouse non-histone chromosomal protein HMG-14 cDNA sequence. *Nucleic Acids Res.* **18**, 5311.
- Lehtonen, S. und Lehtonen, E. (2001).** HMG-17 is an early marker of inductive interactions in the developing mouse kidney. *Differentiation.* **67**, 154-63.
- Lehn, D. A., Elton, T. S., Johnson, K. R. und Reeves, R. (1988).** A conformational study of the sequence specific binding of HMG-I (Y) with the bovine interleukin-2 cDNA. *Biochem Int.* **16**, 963-71.
- Li, B., Pilcher, K. Y., Wyman, T. E. und Machida, C. A. (1997).** Rapid preparation and identification of insert-containing recombinant plasmid DNA. *Biotechniques.* **23**, 603-608.
- Lim, J. H., Bustin, M., Ogryzko, V. V. und Postnikov, Y. V. (2002).** Metastable macromolecular complexes containing high mobility group nucleosome-binding chromosomal proteins in HeLa nuclei. *J Biol Chem.* **277**, 20774-82.
- Liu, W. M., Guerra-Vladusic, F. K., Kurakata, S., Lupu, R. und Kohwi-Shigematsu, T. (1999).** HMG-I(Y) recognizes base-unpairing regions of matrix attachment sequences and its increased expression is directly linked to metastatic breast cancer phenotype. *Cancer Res.* **59**, 5695-703.
- Liu, J., Schiltz, J. F., Shah, P. C., Benson, K. F. und Chada, K. K. (2000).** Genomic structure and expression of the murine Hmgi(y) gene. *Gene.* **246**, 197-207.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. und Richmond T.J. (1997).** Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution. *Nature.* **389**, 251-260.
- Lührs, H., Hock, R., Schaubert, J., Weihrauch, M., Harrer, M., Melcher, R., Scheppach, W., Bustin, M. und Menzel, T. (2002).** Modulation of HMG-N2 binding to chromatin

- by butyrate-induced acetylation in human colon adenocarcinoma cells. *Int J Cancer*. **97**, 567-73.
- Mardian, J. K., Paton, A. E., Bunick, G. J. und Olins, D. E. (1980).** Nucleosome cores have two specific binding sites for nonhistone chromosomal proteins HMG 14 and HMG 17. *Science*. **209**, 1534-6.
- Menut, S., Lemaitre, J.-M., Hair, A. und Mechali, M. (1999).** DNA replication and chromatin assembly using *Xenopus* eggs or embryos. In „A comparative methods approach to the study of oocytes and embryos“ (J.D. Richter, Ed.). Oxford University Press, New York.
- Mirkovitch, J., Mirault, M. E. und Laemmli, U. K. (1984).** Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell*. **39**, 223-232.
- Misteli, T., Gunjan, A., Hock, R., Bustin, M. und Brown, D. T. (2000).** Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature*. **408**, 877-81.
- Mochizuki, T., Karavanov, A.A., Curtiss, P.E., Ault, K.T., Sugimoto, N., Watabe, T., Shiokawa, K., Jamrich, M., Cho, K.W., Dawid, I.B. und Taira, M. (2000).** Xlim-1 and LIM domain binding protein 1 cooperate with various transcription factors in the regulation of the *gooseoid* promoter. *Dev. Biol.* **224**, 470-485.
- Mohamed, O. A., Bustin, M. und Clarke, H. J. (2001).** High-mobility group proteins 14 and 17 maintain the timing of early embryonic development in the mouse. *Dev Biol.* **229**, 237-49.
- Moir, R. D., Spann, T. P., Lopez-Soler, R. I., Yoon, M., Goldman, A. E., Khuon, S. und Goldman, R. D. (2000).** Review: the dynamics of the nuclear lamins during the cell cycle - relationship between structure and function. *J Struct Biol.* **129**, 324-34.
- Moreau, N., Angelier, N., Bonnanfant-Jais, M. L., Gounon, P. und Kubisz, P. (1986).** Association of nucleoplasmin with transcription products as revealed by immunolocalization in the amphibian oocyte. *J Cell Biol.* **103**, 683-90.
- Moorman, A.F.M., und de Boer, P.A.J. (1985).** Immunohistochemical distribution of the histone H1<sup>9</sup>/H5 variant in various tissues of adult *Xenopus laevis*. *Cell Differ.* **16**, 109-117.
- Morgan, G.T. (2002).** Lampbrush chromosomes and associated bodies: new insights into nuclear structure and function. *Chromosome Res.* **10**, 177-200.
- Munshi, N., Merika, M., Yie, J., Senger, K., Chen, G. und Thanos, D. (1998).** Acetylation of HMG I(Y) by CBP turns off IFN beta expression by disrupting the enhanceosome. *Mol Cell.* **2**, 457-67.
- Moustakas, A., Pardali, K., Gaal, A. und Heldin, C. H. (2002).** Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett.* **82**, 85-91.
- Nagatani, G., Nomoto, M., Takano, H., Ise, T., Kato, K., Imamura, T., Izumi, H., Makishima, K. und Kohno, K. (2001).** Transcriptional activation of the human HMG1 gene in cisplatin-resistant human cancer cells. *Cancer Res.* **61**, 1592-7.
- Newport, J. W. und Kirschner, M. W. (1984).** Regulation of the cell cycle during early *Xenopus* development. *Cell.* **37**, 731-42.
- Nieuwkoop, P.D. und Faber, J. (1975).** Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). North-Holland Publ. Comp., Amsterdam.
- Nightingale, K., Dimitrov, S., Reeves, R. und Wolffe, A.P. (1996).** Evidence for a shared structural role for HMG1 and linker histones B4 and H1 in organizing chromatin. *EMBO J.* **15**, 548-561.
- Nissen, M. S., Langan, T. A. und Reeves, R. (1991).** Phosphorylation by cdc2 kinase modulates DNA binding activity of high mobility group I nonhistone chromatin protein. *J Biol Chem.* **266**, 19945-52.
- Nissen, M. S. und Reeves, R. (1995).** Changes in superhelicity are introduced into closed circular DNA by binding of high mobility group protein I/Y. *J Biol Chem.* **270**, 4355-60.
- Nozaki, Y. und Tanford, C. (1970).** The solubility of amino acids, diglycine, and triglycine in aqueous guanidine hydrochloride solutions. *J Biol Chem.* **245**, 1648-52.

- Oelgeschlager, M., Kuroda, H., Reversade, B. und De Robertis, E. M. (2003).** Chordin is required for the Spemann organizer transplantation phenomenon in *Xenopus* embryos. *Dev Cell.* **4**, 219-30.
- Ohndorf, U. M., Rould, M. A., He, Q., Pabo, C. O. und Lippard, S. J. (1999).** Basis for recognition of cisplatin-modified DNA by high-mobility-group proteins. *Nature.* **399**, 708-12.
- Olins, A. L. und Olins, D. E. (1974).** Spheroid chromatin units (v bodies). *Science.* **183**, 330-332.
- Onate, S. A., Prendergast, P., Wagner, J. P., Nissen, M., Reeves, R., Pettijohn, D. E. und Edwards, D. P. (1994).** The DNA-bending protein HMG-1 enhances progesterone receptor binding to its target DNA sequences. *Mol Cell Biol.* **14**, 3376-91.
- Paro, R. und Hogness, D. S. (1991).** The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**, 263-7.
- Pash, J., Popescu, N., Matocha, M., Rapoport, S. und Bustin, M. (1990).** Chromosomal protein HMG-14 gene maps to the Down syndrome region of human chromosome 21 and is overexpressed in mouse trisomy 16. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**, 3836-40.
- Pash, J. M., Alfonso, P. J. und Bustin, M. (1993).** Aberrant expression of high mobility group chromosomal protein 14 affects cellular differentiation. *J Biol Chem.* **268**, 13632-8.
- Pasheva, E. A., Pashev, I. G. und Favre, A. (1998).** Preferential binding of high mobility group 1 protein to UV-damaged DNA. Role of the COOH-terminal domain. *J Biol Chem.* **273**, 24730-6.
- Patterson, D. und Wolffe, A. P. (1996).** Developmental roles for chromatin and chromosomal structure. *Dev Biol.* **173**, 2-13.
- Paulson, J. R. und Laemmli, U. K. (1977).** The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell.* **12**, 817-28.
- Pennings, S. (1999).** Nucleoprotein gel assays for nucleosome positioning and mobility. *Methods in Enzymology*, **304**, 298-312
- Phair, R.D. und Misteli, T. (2000).** High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature* **404**, 604-609.
- Pienta, K. J., Getzenberg, R. H. und Coffey, D. S. (1991).** Cell structure and DNA organization. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* **1**, 355-85.
- Postnikov, Y. V., Trieschmann, L., Rickers, A. und Bustin, M. (1995).** Homodimers of chromosomal proteins HMG-14 and HMG-17 in nucleosome cores. *J Mol Biol.* **252**, 423-32.
- Postnikov, Y. V., Herrera, J. E., Hock, R., Scheer, U. und Bustin, M. (1997).** Clusters of nucleosomes containing chromosomal protein HMG-17 in chromatin. *J Mol Biol.* **274**, 454-65.
- Prymakowska-Bosak, M., Misteli, T., Herrera, J. E., Shirakawa, H., Birger, Y., Garfield, S. und Bustin, M. (2001).** Mitotic phosphorylation prevents the binding of HMGN proteins to chromatin. *Mol Cell Biol.* **21**, 5169-78.
- Prymakowska-Bosak, M., Hock, R., Catez, F., Lim, J. H., Birger, Y., Shirakawa, H., Lee, K. und Bustin, M. (2002).** Mitotic phosphorylation of chromosomal protein HMGN1 inhibits nuclear import and promotes interaction with 14.3.3 proteins. *Mol Cell Biol.* **22**, 6809-19.
- Reeves, R., Elton, T. S., Nissen, M. S., Lehn, D. und Johnson, K. R. (1987).** Posttranscriptional gene regulation and specific binding of the nonhistone protein HMG-I by the 3' untranslated region of bovine interleukin 2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**, 6531-5.
- Reeves, R., Langan, T. A. und Nissen, M. S. (1991).** Phosphorylation of the DNA-binding domain of nonhistone high-mobility group I protein by cdc2 kinase: reduction of binding affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**, 1671-5.
- Reeves, R. (1992).** Chromatin changes during the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol.* **4**, 413-23.

- Reeves, R. und Nissen, M. S. (1993). Interaction of high mobility group-I (Y) nonhistone proteins with nucleosome core particles. *J Biol Chem.* **268**, 21137-46.
- Reeves, R. und Wolffe, A. P. (1996). Substrate structure influences binding of the non-histone protein HMG-I(Y) to free nucleosomal DNA. *Biochemistry.* **35**, 5063-74.
- Reeves, R. (2001). Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene.* **277**, 63-81.
- Reeves, R. und Beckerbauer, L. (2001). HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochim Biophys Acta.* **1519**, 13-29.
- Saitoh, Y. und Laemmli, U. K. (1994). Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell.* **76**, 609-22.
- Sanger F., Nicklen S. und Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L. K. und De Robertis, E. M. (1994). *Xenopus* chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell.* **79**, 779-90.
- Scaffidi, P., Misteli, T. und Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* **418**, 191-5.
- Schneider, S., Steinbeisser, H., Warga, R. M. und Hausen, P. (1996). Beta-catenin translocation into nuclei demarcates the dorsalizing centers in frog and fish embryos. *Mech Dev.* **57**, 191-8.
- Schneider, R., Bannister, A. J., Myers, F. A., Thorne, A. W., Crane-Robinson, C. und Kouzarides, T. (2004). Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat Cell Biol.* **6**, 73-7.
- Schotta, G., Ebert, A., Dorn, R. und Reuter, G. (2003). Position-effect variegation and the genetic dissection of chromatin regulation in *Drosophila*. *Semin Cell Dev Biol.* **14**, 67-75.
- Shakoory, A. R., Owen, T. A., Shalhoub, V., Stein, J. L., Bustin, M., Stein, G. S. und Lian, J. B. (1993). Differential expression of the chromosomal high mobility group proteins 14 and 17 during the onset of differentiation in mammalian osteoblasts and promyelocytic leukemia cells. *J Cell Biochem.* **51**, 479-87.
- Shirakawa, H., Landsman, D., Postnikov, Y. V. und Bustin, M. (2000). NBP-45, a novel nucleosomal binding protein with a tissue-specific and developmentally regulated expression. *J Biol Chem.* **275**, 6368-74.
- Shykind, B. M., Kim, J. und Sharp, P. A. (1995). Activation of the TFIID-TFIIA complex with HMG-2. *Genes Dev.* **9**, 1354-65.
- Sive, H. L. (1993). The frog princess: a molecular formula for dorsoventral patterning in *Xenopus*. *Genes Dev.* **7**, 1-12.
- Smith, R.C., Dworkin-Rastl, E. und Dworkin, M.B. (1988). Expression of a histone H1-like protein is restricted to early *Xenopus* development. *Genes Dev.* **2**, 1284-1295.
- Smith, J.C., Price, B.M.J., Van Nimmen, K. und Huylebroeck, D. (1990). Identification of a potent *Xenopus* mesoderm-inducing factor as a homologue of activin A. *Nature* **345**, 729-731.
- Smith, J. C., Price, B. M., Green, J. B., Weigel, D. und Herrmann, B. G. (1991). Expression of a *Xenopus* homolog of Brachyury (T) is an immediate-early response to mesoderm induction. *Cell.* **67**, 79-87.
- Smith, W. C., McKendry, R., Ribisi, S., Jr. und Harland, R. M. (1995). A nodal-related gene defines a physical and functional domain within the Spemann organizer. *Cell.* **82**, 37-46.
- Smith, J. C., Conlon, F. L., Saka, Y. und Tada, M. (2000). Xwnt11 and the regulation of gastrulation in *Xenopus*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **355**, 923-30.
- Solomon, M. J., Strauss, F. und Varshavsky, A. (1986). A mammalian high mobility group protein recognizes any stretch of six A.T base pairs in duplex DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* **83**, 1276-80.

- Spemann, H. und Mangold, H. (1924).** Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Wilhelm Roux Arch. Entw. Mech.Org.* **100**, 599-638
- Strahl, B. D. und Allis, C. D. (2000).** The language of covalent histone modifications. *Nature.* **403**, 41-5.
- Steinbach, O.C., Wolffe, A.P. und Rupp, R.A.W. (1997).** Somatic linker histones cause loss of mesodermal competence in *Xenopus*. *Nature* **389**, 395-399.
- Strauss, F. und Varshavsky, A. (1984).** A protein binds to a satellite DNA repeat at three specific sites that would be brought into mutual proximity by DNA folding in the nucleosome. *Cell.* **37**, 889-901.
- Stutz, F. und Spohr, G. (1986).** Isolation and characterization of sarcomeric actin genes expressed in *Xenopus laevis* embryos. *J Mol Biol.* **187**, 349-61.
- Symes, K und Smith, J.C. (1987).** Gastrulation movements provide an early marker of mesoderm induction in *Xenopus laevis*. *Development* **101**, 339-349.
- Takahashi, S., Yokota, C., Takano, K., Tanegashima, K., Onuma, Y., Goto, J. und Asashima, M. (2000).** Two novel nodal-related genes initiate early inductive events in *Xenopus* Nieuwkoop center. *Development.* **127**, 5319-29.
- Tallini, G. und Dal Cin, P. (1999).** HMGI(Y) and HMGI-C dysregulation: a common occurrence in human tumors. *Adv Anat Pathol.* **6**, 237-46.
- Thanos, D. und Maniatis, T. (1995).** Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell.* **83**, 1091-100.
- Thomas, J. O. und Travers, A. A. (2001).** HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci.* **26**, 167-74.
- Thomson, S., Clayton, A. L., Hazzalin, C. A., Rose, S., Barratt, M. J. und Mahadevan, L. C. (1999).** The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase. *Embo J.* **18**, 4779-93.
- Trieschmann, L., Alfonso, P.J., Crippa, M.P., Wolffe, A.P. und Bustin, M. (1995a).** Incorporation of chromosomal proteins HMGN1/N2 into nascent nucleosomes induces an extended chromatin conformation and enhances the utilization of active transcription complexes. *EMBO J.*, **14**, 1478-1489.
- Trieschmann, L., Postnikov, Y. V., Rickers, A. und Bustin, M. (1995b).** Modular structure of chromosomal proteins HMG-14 and HMG-17: definition of a transcriptional enhancement domain distinct from the nucleosomal binding domain. *Mol Cell Biol.* **15**, 6663-9.
- Trieschmann, L., Martin, B. und Bustin, M. (1998).** The chromatin unfolding domain of chromosomal protein HMG-14 targets the N-terminal tail of histone H3 in nucleosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 5468-73.
- Ura, K., Nightingale, K. und Wolffe, A.P. (1996).** Differential association of HMG1 and linker histones B4 and H1 with dinucleosomal DNA: structural transition and transcriptional repression. *EMBO J.* **15**, 4959-4969.
- Van Holde, K.E. (1989).** Chromatin. *Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokio.*
- Verrier, C. S., Roodi, N., Yee, C. J., Bailey, L. R., Jensen, R. A., Bustin, M. und Parl, F. F. (1997).** High-mobility group (HMG) protein HMG-1 and TATA-binding protein-associated factor TAF(II)30 affect estrogen receptor-mediated transcriptional activation. *Mol Endocrinol.* **11**, 1009-19.
- Von Kries, J.P., Buhrmester, H. und Stratling, W.H. (1991).** A matrix/scaffold attachment region binding protein: identification, purification, and mode of binding. *Cell*, **64**, 123-35.
- Wang, D. Z., Ray, P. und Boothby, M. (1995).** Interleukin 4-inducible phosphorylation of HMG-I(Y) is inhibited by rapamycin. *J Biol Chem.* **270**, 22924-32.
- Wang, D., Zamorano, J., Keegan, A. D. und Boothby, M. (1997).** HMG-I(Y) phosphorylation status as a nuclear target regulated through insulin receptor

- substrate-1 and the I4R motif of the interleukin-4 receptor. *J Biol Chem.* **272**, 25083-90.
- Wang, G., Ma, A., Chow, C. M., Horsley, D., Brown, N. R., Cowell, I. G. und Singh, P. B. (2000).** Conservation of heterochromatin protein 1 function. *Mol Cell Biol.* **20**, 6970-83.
- Wessely, O., Agius, E., Oelgeschlager, M., Pera, E. M. und De Robertis, E. M. (2001).** Neural induction in the absence of mesoderm: beta-catenin-dependent expression of secreted BMP antagonists at the blastula stage in *Xenopus*. *Dev Biol.* **234**, 161-73.
- Wasserman, W. J. und Smith, L. D. (1978).** The cyclic behavior of a cytoplasmic factor controlling nuclear membrane breakdown. *J Cell Biol.* **78**, R15-22.
- West, K. L., Ito, Y., Birger, Y., Postnikov, Y., Shirakawa, H. und Bustin, M. (2001).** HMGN3a and HMGN3b, two protein isoforms with a tissue-specific expression pattern, expand the cellular repertoire of nucleosome-binding proteins. *J Biol Chem.* **276**, 25959-69.
- Wolffe, A. P. (1989).** Dominant and specific repression of *Xenopus* oocyte 5S RNA genes and satellite I DNA by histone H1. *Embo J.* **8**, 527-37.
- Wolffe, A. P. (1992).** New insights into chromatin function in transcriptional control. *Faseb J.* **6**, 3354-61.
- Wolffe, A. P. und Kurumizaka, H. (1998).** The nucleosome: a powerful regulator of transcription. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **61**, 379-422.
- Wolffe, A. P., Urnov, F. D. und Guschin, D. (2000).** Co-repressor complexes and remodelling chromatin for repression. *Biochem Soc Trans.* **28**, 379-86.
- Woodcock, C. L., Grigoryev, S. A., Horowitz, R. A. und Whitaker, N. (1993).** A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 9021-5.
- Xiao, D. M., Pak, J. H., Wang, X., Sato, T., Huang, F. L., Chen, H. C. und Huang, K. P. (2000).** Phosphorylation of HMG-I by protein kinase C attenuates its binding affinity to the promoter regions of protein kinase C gamma and neurogranin/RC3 genes. *J Neurochem.* **74**, 392-9.
- Yang, J., Winkler, K., Yoshida, M. und Kornbluth, S. (1999).** Maintenance of G2 arrest in the *Xenopus* oocyte: a role for 14-3-3-mediated inhibition of Cdc25 nuclear import. *Embo J.* **18**, 2174-83.
- Zentgraf, H., Müller, U., Scheer, U. und Franke, W.W. (1981).** Evidence for the existence of globular units in the supranucleosomal organisation of chromatin. In International Cell Biologie 1980-1981 (Schweiger, H.G., Hrsg.), **139**, Springer Verlag, New York
- Zhou, X., Benson, K. F., Ashar, H. R. und Chada, K. (1995).** Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C. *Nature.* **376**, 771-4.
- Zhou, Y. B., Gerchman, S. E., Ramakrishnan, V., Travers, A. und Muyldermans, S. (1998).** Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. *Nature.* **395**, 402-5.

## Anhang

## I. Oligonukleotide

PCR-Produkt	NCBI number	5'-Primer Sequenz	T <sub>m</sub> 5'	3'-Primer Sequenz	T <sub>m</sub> 3'	PCR-Produkt	optimale Annealing Temp.	Zyklen	Zitat	Herkunft der Primersequenz
pGEX Sequencing Primer	5X-1 5X-2 5X-3	5' gggctggcaagccagtttggtg-3' (pGEX 5' Sequencing Primer)	67,9°C	5' ccgggagctgcatgtgtcagagg-3' (pGEX 3' Sequencing Primer)	64,6°C		60°C		Amersham Pharmacia Biotech	
Histon H1A	S69089	5' gggcgggaattcatggctgaagcgcgcaatcc-3' (H1.5 mit EcoRI Linker)	80,6°C 63,9°C	5' gggcgggaattctatttcttctggggcggt-3' (H1.3 mit EcoRI Linker)	78,2°C 62,6°C	689 bp	55°C	25	Dworkin-Rastl et al., 1994	Xenopus laevis
Histon H3	X57128	5' atggctctacgaagcaaacagct-3' (hH35)	60,2°C	5' -tgcccttccccacggatg-3' (hH33)	60,1°C	407bp	55°C	25-30	Kardalinou, 1990	Homo sapiens
Histon H3	X72950	5' atggctctactaagcagaccgc-3' (H35)	58,6°C	5' -ctaagccctctcgctcggat-3' (H33)	58,5°C	410bp	55°C	20-25	Schilthuis, 1993	Xenopus laevis
HMG2	AI031240	5' -atgcccaagagaaaggctgac-3' (x175)	54,8°C	5' -tcacgctcactttgtgtccc-3' (x173)	55,0°C	281bp	55°C	25	Gawantka et al., 1998	Xenopus laevis 5' cds EST 12G2
HMG2	NM_005517	5' -atgccgaagagaaaggctga-3' (HMG175)	57,3°C	5' -cccactgccccccc-3' (HMG173)	61,5°C	269bp	55°C	25	Landsman et al., 1986	Homo sapiens
HMG2	NM_005517	5' atcgactcgatgcccaagagaaaggctga-3' (xho17a, mit XhoI Linker)	70,2°C	5' atcgagaattcctggcatctccagcacctt-3' (eco17a, mit EcoRI Linker, ohne Stop!)	69,1°C	269bp	58°C	25-30	Landsman et al., 1986	Homo sapiens
HMG2	NM_005517	5' -atgccgaagagaaaggctga-3' (HMG175)	57,3°C	5' -gcggtctgtgtcctaaca-3' (HMG17a3)	56,7°C	276bp	55°C	25	Landsman et al., 1986	Homo sapiens
HMG2 sacl	NM_005517	5' gagctcatgcccaagagaaaggctga-3' (sac17a, mit SacI Linker)	64,6°C	5' atcgagaattcctggcatctccagcacctt-3' (eco17a, mit EcoRI Linker, ohne Stop!)	69,1°C	269bp	59°C	25-30	Landsman et al., 1986	Homo sapiens
HMG2 sacl	AJ272075	5' gagctcatgcccaagagaaaggct-3' (XN2sac5; mit Sac I – Linker)	61,0°C					25-30		Xenopus laevis

Anhang

PCR-Produkt	NCBI number	5'-Primer Sequenz	T <sub>m</sub> 5'	3'-Primer Sequenz	T <sub>m</sub> 3'	PCR-Produkt	optimale Annealing Temp.	Zyklen	Zitat	Herkunft der Primersequenz
HMGN2 EcoRI	AI031240 AJ272075	5'gaattccaactttgtgtcccccag-3' (XN2eco3; mit EcoRI - Linker)	60,2°C					25-30		Xenopus laevis
HMGN1 sacI	AJ272074	5'gagctcatgcctaagagaaagcag-3' (XN1sac5; mit Sac I - Linker)	55,7°C					25-30		Xenopus laevis
HMGN1	AJ272075	5'gaattccaattcagactggattc-3' (XN1eco3; mit EcoRI - Linker)	56,1°C					25-30		Xenopus laevis
β-Aktin HindIII	XM_037239	5'aagcttatggatgatgatcggcgcg-3' (bact5, mit HindIII Linker)	65,4°C	5'aagcttctagaagcatttgcggtgacga-3' (bact3, mit HindIII Linker)	67,0°C	1127bp	55°C	25	NCBI annotation project	Homo sapiens
Akt		5'aaaagagaaagcaacaggagcat-3' (xAKT5)	53,2°C	5'-ctttatgtgccgtctttgtcca-3' (xAKT3)	53,4°C	366bp	55°C	25		Xenopus laevis
Chordin	L35764	5'cctccaatccaagactccagcag-3' (xChordin5)	58,8°C	5'ggaggaggaggagcttgggacaaag-3' (xChordin3)	63,2°C	267bp	55°C	25	Sasai et al. (1994), Cell	Xenopus laevis
Xnr1	U29447	5'-aaccatcacattacaatagg-3' (xnr15)	40,8°C	5'tgtaggcaagtaaaatcattaac-3' (xnr13)	48°C	384bp	55°C	25	Agius et al. (2000), Dev.	Xenopus laevis
Xnr2	U29448	5'-ttagggtcagggatgaagaag-3' (xnr25)	50,6°C	5'-cggggcttcttggtatctgtc-3' (xnr23)	52,6°C	211bp	55°C	25	Agius et al. (2000), Dev.	Xenopus laevis
Xnr3	U25993	5'-cgagtgcaagaaggtggaca-3'	51,4°C	5'-atcttcattggggacacagga-3'	53,5°C	219bp	55°C	25	Agius et al. (2000), Dev.	Xenopus laevis
Xnr4	U79162	5'-gaaatggaggtgatgtagac-3' (xnr45)	47,5°C	5'-gaccatcatcactatctgtg-3' (xnr43)	46,8°C	300bp	55°C	25	Agius et al. (2000), Dev.	Xenopus laevis
Xnr5		5'-tcacaatccttcactagggc-3'	51,0°C	5'-ggaacctcgaaggaaggc-3'	52,0°C	267bp	55°C	25	Yang J. et al. (2002) Dev.	Xenopus laevis
Xnr6		5'-tccagatgatccatctgttc	51,6°C	5'-ttctcgttctcttctgtcctt-3'	53,1°C	234bp	55°C	25	Yang J. et al. (2002) Dev.	Xenopus laevis
α-cardiac acin	X03469	5'-tccctgtacgcttctggtcgta-3'		5'-tctcaaagtccaagccacat-3'		253bp	55°C	25	Stutz, F. et al. (1986) J.Mol.Biol.	Xenopus laevis
β-Catenin	M77013	5'-agatgcagcaactaaacagga-3'	49,3°C	5'-gtactgcatttgagccatct-3'	48,8°C	290bp	55°C	25	McCrea, P. D. et al. (1991) Science	Xenopus laevis

Anhang

PCR-Produkt	NCBI number	5'-Primer Sequenz	T <sub>m</sub> 5'	3'-Primer Sequenz	T <sub>m</sub> 3'	PCR-Produkt	optimale Annealing Temp.	Zyklen	Zitat	Herkunft der Primersequenz
BMB4	X64538	5'-gcatgtacggataagtcgatc-3'	48,9°C	5'-gatctcagactcaacggcac-3'	49°C	479bp	55°C	25	Dale, L. Et al. (1992) Dev.	Xenopus laevis
Cerberus	U64831	5'-gctgaactatttgattcacc-3'	45,9°C	5'-atggctgtattctgtggggcg	59,7°C	255bp	55°C	25	Bouwmeester, T. Et al. (1996) Nature	Xenopus laevis
Dickkopf	AF030434	5'-caccaagcacaggaggaa-3'	48,7°C	5'-tcaggaagaccagagca-3'	48,1°C	252bp	55°C	25	Agius et al. (2000), Dev.t	Xenopus laevis
EF1α	X55324	5'-cagattggtgctggatagc-3'	50,4°C	5'-actgccttgatgactcctag-3'	45,7°C	221bp	55°C	20	Agius et al. (2000), Dev.	Xenopus laevis
Follistatin	S69801	5'-cagtcagcgcctggaaagaaa-3'	58,2°C	5'-tgcgttgcggaattcacttac-3'	54,6°C	230bp	55°C	25	Agius et al. (2000), Dev.	Xenopus laevis
FrzB-1	U78598	5'-gaccactgaatgtagccaggac-3'	52,7°C	5'-ggagatgcagactcctctgtca-3'	53,2°C	220bp	55°C	25	Agius et al. (2000), Dev.	Xenopus laevis
Goosecoid	M63872	5'-cacacaaagtgcagagtctc-3' (goose5)	49,8°C	5'-ggagagcagaagttggggcca-3' (goose3)	60,0°C	300bp	55°C	30	Blumberg, B. et al. (1991) Cell	Xenopus laevis
Goosecoid	M63872	5'-cacacacaaagtgcag-3' (goosecoid5)	41,9°C	5'-gatccattcacccttg-3' (goosecoid3)	44,5°C	318bp	55°C	30	Koerner U.	Xenopus laevis
Goosecoid	M63872	5'-cattgggtgatgccttctg-3' (Uligoose5)	52,8°C	5'-gttaagcaactgcagctcag-3' (Uligoose3)	47,9°C	433bp	57°C	30	Koerner, U. et al. (2003) MOD	Xenopus laevis
Mixer	AF068263	5'-caccagcccagcacttaacc-3'	54,5°C	5'-caatgtcacatcaactgaag-3'	42,8°C	176bp	55°C	25	Henry et al. (1996) Dev.	Xenopus laevis
MyoDa	X16106	5'-aggtccaactgctccgacggcatgaa-3'	68,8°C	5'-aggagagaatccagttgatggaaaca-3'	58,2°C	407bp	55°C	25	Hopwood, N.D. et al. (1989) EMBO J.	Xenopus laevis
MyoDb	X16106	5'-aactgctccgatggcatgatggatta-3'	63,3°C	5'-aatgctgggagaaggatggtagta-3'	61,7°C	291bp	55°C	25	Hopwood, N.D. et al. (1989) EMBO J.	Xenopus laevis
NCAM	M25696	5'-cacagttccaccaaagtc-3'	65°C	5'-ggaatcaagcgttacaga-3'	65°C	325bp	55°C	25	Hemmati-Brivanlou and Melton (1994)	Xenopus laevis

## Anhang

PCR-Produkt	NCBI number	5'-Primer Sequenz	T <sub>m</sub> 5'	3'-Primer Sequenz	T <sub>m</sub> 3'	PCR-Produkt	optimale Annealing Temp.	Zyklen	Zitat	Herkunft der Primersequenz
NRP1		5'-acaactggaagcactgga-3'	65°C	5'-tctattccagaggaacc-3'	65°C	270bp	55°C	25	Hemmati-Brivanlou and Melton (1994)	Xenopus laevis
Noggin	M98807	5'-agttgcagatgtggctct-3'	44,5°C	5'-agtccaagagtctcagca-3'	41,2°C	281bp	55°C	25	Agius et al. (2000), Dev.	Xenopus laevis
ODC	X56316	5'-aatggattccagagacca-3'	41,3°C	5'-ccaaggctaaagttgcag-3'	45,7°C	233bp	55°C	25	Yang J. et al. (2002) Dev.	Xenopus laevis
Siamois	Z48606	5'-aagataactggcattcctgagc-3'	52,0°C	5'-ggtagggctgtgtattgaagg-3'	52,2°C	205bp	55°C	25	Agius et al. (2000), Dev-	Xenopus laevis
Brachyury (Xbra)	M77243	5'-atgagtgcgaccgagagctgcg-3'	63,4°C	5'-gactgatggtggcgcaagggg-3'	64,1°C	1295bp	55°C	25	Koerner U.	Xenopus laevis
Brachyury (Xbra)	M77243	5'-gctggaagtatgtgaatggag-3'	48,8°C	5'-ttaagtctgtaatctcttca-3'	42,1°C	319bp	55°C	25	Agius et al. (2000), Dev.	Xenopus laevis
Xacta		5'-tccctgtacgcttctggtcgta-3'	56,2°C	5'-tctcaaagtccaagccacata-3'	51,7°C	252bp	55°C	25	Agius et al. (2000), Dev.	Xenopus laevis
XAG1	U76752	5'-ctgactgtccgatcagac-3'	41,5°C	5'-gagttgcttctctggcat-3'	44,3°C	211bp	55°C	25	Sive,H. et al. (1996) Dev. Dyn.	Xenopus laevis
Xnot	L19566	5'-gcaggcagagttcagttgtg-3'	50,6°C	Gtgagttgcttgcctgtgg-3'	53,1°C	171bp	55°C	25	Gont, et al. (1993) Dev.	Xenopus laevis
Xolloid	Y09661	5'-ctattggagattcgagtg-3'	51,6°C	5'-tcacaacaagcctcttacagt-3'	48,6°C	303bp	55°C	25		Xenopus laevis
Xvent1	X92851	5'-ttccctcagcatggttcaac-3'	54,0°C	5'-gcatctcctggcatatttg-3'	53,7°C	156bp	55°C	25	Gawantha et al. (1995) Embo J.	Xenopus laevis
Xwnt8	X57234	5'-tatctggaagttgcagcataca-3'	50,3°C	5'-gcaggcactctcgctcctctgt-3'	59,4°C	276bp	55°C	25	Steinbesser et al. (1995) Embo J.	Xenopus laevis
TOPO2.1. Forward		5'-gtaaacgacggccag-3'	43,6°C						Invitrogen Karlsruhe	
TOPO2.1. Reverse		5'-caggaacagctatgac-3'	36,2°C						Invitrogen Karlsruhe	

## II. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium; Eurobio, Biotechnology
DMSO	Dimethylsulfoxid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	Dithiotreitol
DNA	Desoxiribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminescence
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm bzw. Standardwert der Erdbeschleunigung
GFP	Green Fluorescent Protein
GST	Glutathion S Transferase
h	Stunde
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kD	Kilodalton
LiCl	Lithiumchlorid
m	Meter
mA	Milli-Ampere
MCS	multiple cloning site
mg	Milligramm
MG	relative Molekularmasse
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
$\mu$	Mikro
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

## Anhang

---

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pfu	plaque forming units
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Unit
V	Volt
Vol	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

## Publikationsliste

### Publikationen:

**Körner, U., Bustin, M., Scheer, U. und Hock, R. (2003).** Developmental role of HMGN proteins in *Xenopus laevis*. *Mech Dev.* **120**, (10), 1177-92.

**Körner, U., Porea, A., Webb, A., Scheer, U. und Hock, R. (2004).** Magnetic resonance imaging of *Xenopus laevis* embryos after experimental manipulation of the high mobility group N (HMGN) proteins. (zur Publikation eingereicht).

### Kongressbeitrag in Form eines Posters/Abstracts:

**Hock, R., Wilde, F., Körner, U., Bustin, M. und Scheer, U. (2000).** HMG-14/-17 proteins are required for efficient pol II transcription and for the orderly development of *Xenopus laevis* embryos. 2. International HMG-Workshop, Washington, USA.

**Körner, U., Bustin, M., Scheer, U. und Hock, R. (2001).** HMGN2 proteins prolongs mesodermal competence in early *Xenopus* embryos. First Joint French-German Congress on Cell Biology, Straßbourg, France.

**Körner, U., Bustin, M., Scheer, U. und Hock, R. (2002).** Expression of HMGN proteins in early *Xenopus* embryos: Influence on development and mesodermal competence. 3. International HMG-Workshop, Neapel, Italy.

**Porea A., Neuberger, T., Aussenhofer, S., Körner, U., Haase, A. und Webb A. G. (2003).** Parallel NMR Microimaging of Single Cells. The 44th ENC (Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference), Savannah, USA.

### Kongressbeitrag in Form eines Vortrages:

Expression of HMGN proteins in early *Xenopus* embryos: Influence on development and mesodermal competence. 3. International HMG-Workshop, Neapel, Italy.

### Lehre:

2-wöchiges Seminar an der University of Hyderabad (Indien) im Rahmen eines DAAD-Programmes (422-PPP-Indien 1999/ D / 9835203). Vortrag mit anschließender Einweisung in Methoden der Molekularbiologie. Hyderabad, Indien.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

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

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

Würzburg, den 5.3.2004

.....  
Ulrich Körner

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Ulrich Körner  
Geburtsdatum: 18.06.1972  
Geburtsort: Ansbach  
Familienstand: ledig

### Schulbildung:

1978-1982 Grundschule Ansbach  
1982-1992 Theresien-Gymnasium-Ansbach  
Mai 1992 Allgemeine Hochschulreife

### Bundeswehr:

1992-1993 Heidenheim; 3./Panzerbataillon 304

### Studium:

1993-2000 Biologiestudium an der Bayerischen Julius Maximilians  
Universität Würzburg  
Studienschwerpunkte: Zell- und Entwicklungsbiologie  
Biochemie  
Genetik

1999-2000 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie  
am Biozentrum der Bayerischen Julius Maximilians Universität  
Würzburg bei Prof. Dr. U. Scheer / Dr. P. Wolbert  
Thema: cDNA Klonierung und Charakterisierung  
metamorphoserelevanter Gene bei *Galleria mellonella* L.

2000-2004 Promotionsstudium am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungs-  
biologie am Biozentrum der Bayerischen Julius Maximilians  
Universität Würzburg bei PD. Dr. R. Hock.  
Thema: Funktionelle Rolle der HMGN Proteine während der  
Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*.

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ulrich Scheer für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. E. Buchner danke ich für seine Bereitschaft die Arbeit als zweiter Gutachter zu betreuen.

Ein besonderes Dankeschön geht an Herrn PD Dr. R. Hock für seine sehr gute Betreuung der Arbeit. Seine Diskussionsbereitschaft sowie Ideen und Vorschläge trugen wesentlich zum Gelingen der Arbeit bei.

An die Arbeitsgruppe „Hock“ geht ein Dankeschön für die entspannte Atmosphäre während und außerhalb der Arbeitszeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Zell- und Entwicklungsbiologie der Universität Würzburg möchte ich ganz herzlich für die Hilfsbereitschaft und für die schöne Zeit dort danken.

Ein besonderer Dank geht an alle Bowling Schwestern und Brüdern, Club-Fans und Piraten, die einen manchen Stress vergessen ließen.

Bei meiner Mutter möchte ich mich besonders herzlich bedanken, da sie stets davon überzeugt war, dass ich alles erdenkliche erreichen kann.

Schließlich ein herzliches Dankeschön an Andrea, die das Wort Spontanität erfunden haben muss und die ich dafür sehr liebe.