

**Isolierung und Charakterisierung der Zinkfinger-Proteine  
Xegr-1 und Xegr-3 in der frühen Embryonalentwicklung  
des Krallenfrosches *Xenopus laevis***

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Frank Panitz

geboren am 04.03.1967 in Bremen

1998

Die praktischen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden am Institut für Biochemie und molekulare Zellbiologie der Georg-August-Universität Göttingen durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. J. Alves

Koreferent: Prof. Dr. T. Pieler

Tag der Promotion: 21. Juli 1998

Datum der Veröffentlichung: 28. September 1998

## INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Embryonalentwicklung von <i>Xenopus laevis</i></b>	<b>1</b>
<b>1.2 Mesoderm-Induktion bei <i>Xenopus laevis</i></b>	<b>3</b>
<b>1.3 Signalkaskaden während der Mesoderm-Induktion</b>	<b>6</b>
<b>1.4 Zinkfinger-Proteine</b>	<b>8</b>
1.4.1 Struktur von C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -Zinkfingern	8
1.4.2 Multigenfamilien von Zinkfinger-Proteinen und ihre Funktion in der Embryogenese	11
<b>1.5 Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Egr-1</b>	<b>14</b>
<b>1.6 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>17</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>18</b>
<b>2.1 DNA-Techniken</b>	<b>18</b>
2.1.1 Standardlösungen und Puffer	18
2.1.2 Nährmedien und Antibiotika	19
2.1.3 Bakterien-Flüssigkulturen und Stammkulturen	19
2.1.4 Anzucht elektrokompeter Bakterienzellen	19
2.1.5 Elektrotransformation von <i>E. coli</i> Bakterien	20
2.1.6 Restriktionsenzymatische Spaltung	20
2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese	20
2.1.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
2.1.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	22
2.1.9.1 PCR Purification Kit (Qiagen)	22
2.1.9.2 Nucleotide Removal Kit (Qiagen)	22
2.1.9.3 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	22
2.1.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	23
2.1.11 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	23
2.1.12 Ligation von DNA-Fragmenten	23
2.1.13 Detektion positiver Bakterienklone	23
2.1.14 Subklonieren von PCR-Produkten	24
2.1.15 Extraktion von Plasmid-DNA	25
2.1.15.1 Isolierung von Plasmiden im analytischen Maßstab (TELT)	25
2.1.15.2 Isolierung von Plasmiden im präparativen Maßstab (Qiagen)	25
2.1.16 Präparation von genomischer DNA (gDNA) aus <i>Xenopus laevis</i>	26
2.1.17 Isolierung von $\lambda$ -DNA	26

2.1.18	Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung	27
2.1.19	Analyse membrangebundener DNA-Fragmente mit nicht-radioaktiven Sonden ("Southern Blot")	28
2.1.19.1	Darstellung Digoxigenin-markierter Sonden durch PCR	28
2.1.19.2	Hybridisierung gelelektrophoretisch getrennter DNA	28
2.1.20	Plauehybridisierung von $\lambda$ -Phagen-DNA ("Plaue-Lift Screening")	29
2.1.21	Sequenzspezifische Mutagenese	29
<b>2.2</b>	<b>RNA-Techniken</b>	<b>29</b>
2.2.1	RNA-Isolierung aus <i>Xenopus</i>	30
2.2.1.1	Embryonalstadien	30
2.2.1.2	Adulte Gewebe und Organe	30
2.2.2	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	30
2.2.2.1	Semi-quantitative RT-PCR	30
2.2.2.2	Auftrennung im Acrylamid/Harnstoff-Gel	31
2.2.2.3	Phosphorylieren von DNA-Längenstandard-Fragmenten	31
2.2.3	<i>In vitro</i> Synthese von RNA	31
2.2.3.1	Linearisieren der Plasmid-DNA	32
2.2.3.2	<i>In vitro</i> Synthese von RNA für <i>in situ</i> Hybridisierungen	32
2.2.3.3	<i>In vitro</i> Synthese von Cap-mRNA für Mikroinjektionen	32
2.2.3.4	Aufreinigen <i>in vitro</i> synthetisierter RNA	32
2.2.4	RNase-Protektion	32
<b>2.3</b>	<b>Proteintechniken: <i>in vitro</i> Transkription und Translation</b>	<b>33</b>
<b>2.4</b>	<b>Isolierung von <i>Xenopus</i> EGR-Klonen aus cDNA-Banken</b>	<b>34</b>
2.4.1	Anreichern eines Kandidaten-Phagen	34
2.4.2	Vereinzeln eines Phagen	35
2.4.3	Generieren einer hoch konzentrierten Phagenlösung	36
2.4.4	<i>in vivo</i> Exzision	36
<b>2.5</b>	<b>Isolierung von Klonen aus genomischen <math>\lambda</math>-Phagenbanken</b>	<b>37</b>
<b>2.6</b>	<b>Gewinnen von <i>Xenopus</i> Embryonalstadien</b>	<b>37</b>
2.6.1	Versuchstiere	37
2.6.2	Präparation von Testis	37
2.6.3	Stimulation der Eiablage	37
2.6.4	Befruchtung und Entwicklung	38
2.6.5	Behandlung von Embryonen mit UV und LiCl	38
<b>2.7</b>	<b>Whole Mount <i>in situ</i> Hybridisierung</b>	<b>38</b>
2.7.1	Rehydrieren der Embryonen	38
2.7.2	Proteinase K-Behandlung	39
2.7.3	Refixieren	39
2.7.4	Waschen	39
2.7.5	Antikörper-Inkubation	40
2.7.6	Farbentwicklung	40
<b>2.8</b>	<b><i>in situ</i> Hybridisierung von Dünnschnittschnitten</b>	<b>40</b>
2.8.1	Fixierung	40
2.8.2	TESPA-Beschichtung der Objektträger für Schnittpäparate	41
2.8.3	Einbettung in Paraffin und Anfertigung von Schnitten	41
2.8.4	Entparaffinierung, Rehydratation und Refixierung	41
2.8.5	Vorbehandlung und Prähybridisierung	41

2.8.6	Hybridisierung	42
2.8.7	Waschen, Antikörper-Inkubation und Nachweis der Sonde (Posthybridisierung)	42
2.8.8	Dokumentation der Dünnschnitte	42
<b>2.9</b>	<b>Mikroinjektion in <i>Xenopus</i>-Embryonen</b>	<b>43</b>
<b>2.10</b>	<b>Analyse induzierter animaler Kappen ('Animal Caps')</b>	<b>43</b>
2.10.1	Induktion und Präparation animaler Kappen („Animal Caps“)	43
2.10.2	Histologische Analyse	44
<b>2.11</b>	<b>Analyse von Promotorelementen durch Band-Shift Experimente</b>	<b>44</b>
<b>2.12</b>	<b>Analyse mikroinjizierter Promotorkonstrukte durch Detektion von <math>\beta</math>-Galaktosidase in <i>Xenopus</i> Embryos</b>	<b>45</b>
<b>2.13</b>	<b>Oligonukleotide</b>	<b>45</b>
<b>2.14</b>	<b>Plasmide</b>	<b>47</b>
<b>2.15</b>	<b>Chemikalien, Geräte und Computer</b>	<b>50</b>
<b>3.</b>	<b>Experimente und Ergebnisse</b>	<b>51</b>
<b>3.1</b>	<b>Isolierung EGR-homologer cDNAs aus <i>Xenopus laevis</i></b>	<b>51</b>
3.1.1	Isolierung eines Xegr-1 Fragments	52
3.1.2	Isolierung einer Xegr-1 cDNA	53
3.1.3	Xegr-1 cDNA und Proteinsequenz	53
3.1.4	Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von Xegr-1 mit den homologen Proteinen anderer Vertebraten	56
3.1.5	Isolierung eines Xegr-3 Fragments	58
3.1.6	Isolierung eines Xegr-3 Klons	58
3.1.7	Xegr-3 Klon und Proteinsequenz	61
3.1.8	Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von Xegr-3 mit den homologen Proteinen anderer Vertebraten	62
3.1.9	Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von Egr-1, -2 und -3 in <i>Xenopus laevis</i>	63
<b>3.2</b>	<b>Untersuchungen zur Expression</b>	<b>65</b>
3.2.1	Zeitliches und räumliches Expressionsmuster des Xegr-1 Gens	65
3.2.1.1	Analyse der zeitlichen Xegr-1 Expression durch RT-PCR	65
3.2.1.2	Analyse der räumlichen Xegr-1 Expression durch 'whole mount' <i>in situ</i> Hybridisierung	67
3.2.2	Xegr-1 als Organisator-spezifisches Gen: Vergleichende Expressionsanalyse an Dünnschnitten	70
3.2.3	Analyse der räumlichen Xegr-3 Expression durch 'whole mount' <i>in situ</i> Hybridisierung	73
<b>3.3</b>	<b>Untersuchungen zur Funktion</b>	<b>74</b>
3.3.1	Einfluß von UV- bzw. LiCl-Behandlung auf die Egr-1 Expression	74
3.3.2	Einfluß von Xegr-1 auf die Histologie stimulierter Animaler Kappen	75
3.3.3	Versuch einer funktionellen Charakterisierung von Xegr-1 durch RNA-Injektionen in Embryonen	77
3.3.3.1	Überexpression	78
3.3.3.2	Aktivierung	78
3.3.3.3	Inhibition	80
3.3.3.4	Beschreibung eines NAB1 homologen Fragments aus <i>Xenopus</i>	82

---

<b>3.4</b>	<b>Isolierung und Charakterisierung des Xegr-1 Promotors</b>	<b>83</b>
3.4.1	Isolierung eines genomischen Xegr-1 Klons	83
3.4.2	Bestimmung des Transkriptionsstarts (RNase Protektion)	84
3.4.3	Sequenzvergleich von genomischer DNA und Xegr-1 cDNA	86
3.4.4	Vergleich 5'-flankierender Sequenzen	98
3.4.5	Bildung eines ternären Komplexes aus SRF und Elk-1 am Xegr-1 Promotor	90
3.4.6	Analyse von Xegr-1 Promotorfragmenten durch Injektion in Embryos	93
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>96</b>
4.1	Homologe Gene der EGR-Familie in <i>Xenopus laevis</i>	96
4.2	Xegr-1 Expression im Spemann-Organisator	98
4.3	Xegr-1 und die Mesoderm-Induktion durch den Transkriptionsfaktor Xbra	101
4.4	Der Xegr-1 Promotor kann SRF und Elk-1 binden	104
4.5	Zur funktionellen Charakterisierung von Xegr-1 in der frühen Embryonalentwicklung	106
4.6	Xegr-3 in der Entwicklung von <i>Xenopus laevis</i>	110
4.7	Ausblick	112
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>113</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>127</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>129</b>
	Danksagung	
	Lebenslauf	

## Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren und entsprechende Codons			Nukleinsäure-Basen
A	Ala	Alanin	A Adenin
C	Cys	Cystein	C Cytosin
D	Asp	Asparaginsäure	G Guanin
E	Glu	Glutaminsäure	T Thymin
F	Phe	Phenylalanin	U Uracil (RNA)
G	Gly	Glycin	
H	His	Histidin	M A oder C
I	Ile	Isoleucin	R A oder G
K	Lys	Lysin	W A oder T
L	Leu	Leucin	S C oder G
M	Met	Methionin	Y C oder T
N	Asn	Asparagin	K G oder T
P	Pro	Prolin	V A oder C oder G
Q	Gln	Glutamin	H A oder C oder T
R	Arg	Arginin	D A oder G oder T
S	Ser	Serin	B C oder G oder T
T	Thr	Threonin	N A oder C oder G oder T
V	Val	Valin	
W	Trp	Tryptophan	
Y	Tyr	Tyrosin	

bHLH	basic Helix-Loop-Helix (Proteinmotiv)
bp	Basenpaar
cDNA	complementary DNA', komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfat
cpm	'counts per minute', Zerfälle pro Minute
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMZ	dorso-marginale Zone
DNA	'desoxyribonucleic acid', Desoxyribonukleinsäure,
dNTPs	Desoxyribonukleinsäurephosphate
dr	( <i>Brachy</i> ) <i>Danio rerio</i> , Zebrafisch
dsDNA	doppelsträngige DNA
d(T)	desoxy-Thymidin
EBS	Ets-Bindungssequenz
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EMSA	'electro-mobility shift assay', Gel-Shift Analyse
en/enR	engrailed/engrailed-Repressor
h	Stunde
hs	<i>Homo sapiens</i>
kD	Kilodalton
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
MBT	'mid-blastula transition'
min	Minute
mm	<i>Mus musculus</i> , Maus
mRNA	'messenger' RNA
MT	Myc-Tag, Markierung bestehend aus 6 Myc-Epitopen
MZ	marginale Zone
NF	<i>Xenopus</i> Embryonalstadien nach Niewkoop & Faber, 1967
NLS	'nuclear localization signal', Kernlokalisationssignal
OD	optische Dichte
PCR	'polymerase chain reaction', Polymerase-Kettenreaktion

pfu	‘plaque forming units’
RNA	Ribonukleinsäure
rr	<i>Rattus rattus</i> , Ratte
RT-PCR	‘reverse transcriptase PCR’
sCMV	‘simian cytomegalo virus’
SRE	‘serum response element’
SRF	‘serum response factor’
TE	Tris-EDTA
TESPA	(3-Triethoxysilyl)-propylamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	‘unit’, Einheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
UTR	‘untranslated region’, nicht kodierender Bereich
VMZ	ventro-marginale Zone
Vol.	Volumen
v/v	Verhältnis Volumen zu Volumen
w/v	Verhältnis Gewicht zu Volumen
X.l./xl	<i>Xenopus laevis</i> , Krallenfrosch

### Vorbemerkung zur Verwendung englischer Begriffe

Zur Vermeidung umständlicher deutscher Übersetzungen von englischen Fachbegriffen wurden die im folgenden aufgeführten englischen Termini z.T. beibehalten. Die verwendeten Begriffe sind im Text durch einfache Anführungszeichen ‘...’ gekennzeichnet.

Annealing	Anlagerung
antisense	Molekül mit umgekehrter Orientierung
Cross-linking	Kreuzvernetzung
Enhancer	DNA-Segment, das als Verstärker-Element an der Regulation der Transkription beteiligt ist
Extension	Verlängerung eines (PCR-) Primers durch Neusynthese
forward (primer)	vorwärts
in-frame	im Leserahmen
Insert	kloniertes Fragment in einem Plasmidvektor
Kit	(kommerzielles) Paket, das die zur Durchführung einer Methode essentiellen Reagenzien enthält
Primer	kurzes, einzelsträngiges Oligonukleotid, ‘Starter’-Molekül
Rescue	Rettung, (teilweise) Wiederherstellung des Ausgangszustands
reverse (primer)	rückwärts
Screening	Durchmusterung
Tail	Schwanz
Tailbud	Schwanzknospe
Template	Matrize, mittels PCR zu amplifizierendes DNA-Segment
whole mount <i>in situ</i>	<i>in situ</i> Hybridisierung an ganzen Embryonen



*Die Bezeichnung „Organisator“ soll zum Ausdruck bringen, daß die von diesen bevorzugten Teilen ausgehende Wirkung nicht nur eine in bestimmter, beschränkter Richtung determinierende ist, sondern daß sie alle jene rätselhaften Eigentümlichkeiten besitzt, welche uns eben nur aus der belebten Natur bekannt sind.*

- H. Spemann und H. Mangold, 1924 -

## 1. Einleitung

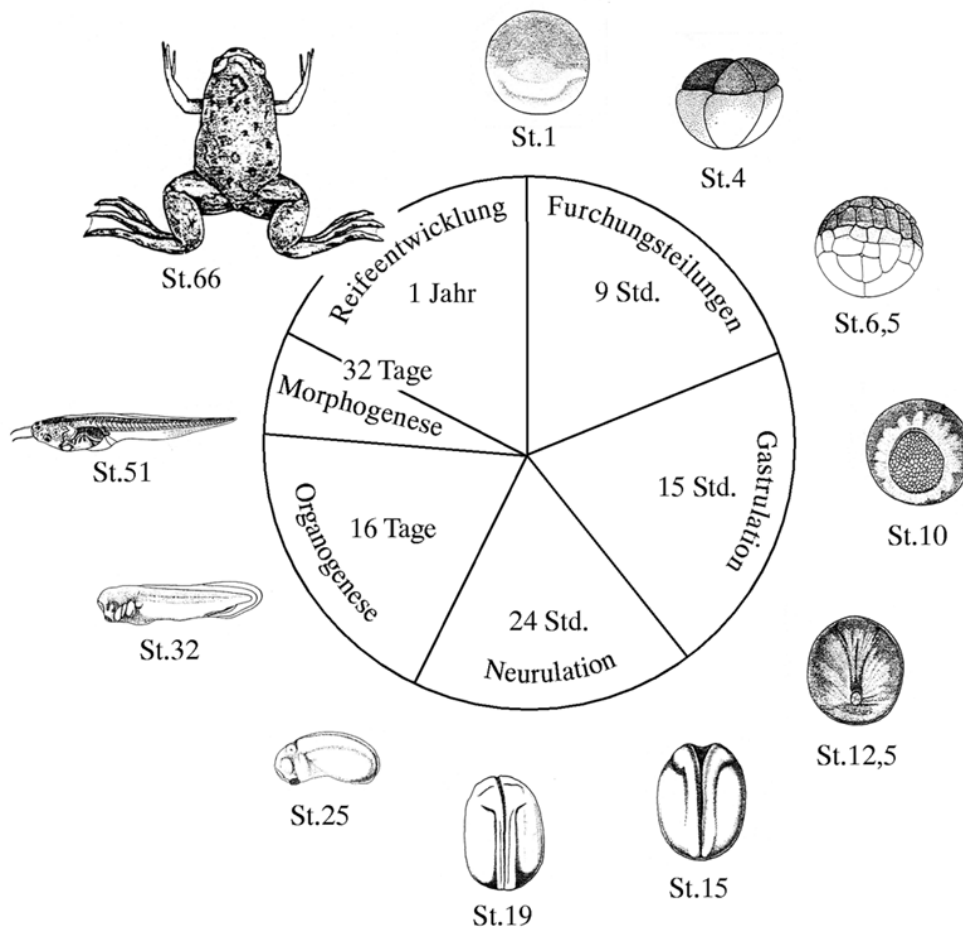
### 1.1 Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*

Der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* gehört zur Klasse der Amphibien und zählt innerhalb der Ordnung der Anura (Froschlurche) zur Unterordnung der Aglossa (Zungenlose). Er lebt vollaquatisch im Süßwasser und läßt sich problemlos in Aquarien halten. Im Rahmen der Untersuchung von Entwicklungsprozessen in Vertebraten stellt *Xenopus* ein geeignetes Tiermodell dar, um insbesondere die frühe Embryogenese zu untersuchen.

*Xenopus*-Weibchen lassen sich durch Gonadotropin-Injektionen zur Eiablage stimulieren. Die Gelege werden *in vitro* befruchtet und können mehrere hundert Embryonen enthalten. Befruchtung und Entwicklung finden extrakorporal in einfachen Salzlösungen statt. Oozyten und Embryonen sind mit 1-1.5 mm verglichen mit denen anderer Vertebraten relativ groß und daher gut für Mikromanipulationsexperimente wie Injektionen oder Explantationen geeignet. Die frühe Embryogenese verläuft innerhalb von ein bis zwei Tagen und ist von Nieuwkoop und Faber (1967) in Stadien eingeteilt und beschrieben worden. Diese Stadieneinteilung wurde auch für diese Arbeit verwendet (die Kennzeichnung beispielsweise des Stadiums 12 ist synonym mit der Bezeichnung NF12). Im Laufe der letzten Jahre ist es durch biochemische und molekularbiologische Methoden möglich geworden, zahlreiche Prozesse der Embryonalentwicklung auch auf molekularer Ebene zu charakterisieren.

Zu Beginn der Entwicklung des Krallenfrosches *Xenopus laevis* (Abb. 1-1) durchläuft die Zygote zwölf synchrone, unsymmetrische Furchungsteilungen, in denen kein Zellwachstum erfolgt. Nach etwa 3-3.5 Stunden hat sich ein Zellhaufen (Morula) gebildet, der im Bereich des animalen Pols durch zahlreiche kleine, sich schnell teilende Furchungszellen (Blastomeren) gekennzeichnet ist, während die vegetale Region wenige große, dotterhaltige Blastomeren enthält. Der Embryo des Blastula-Stadiums besteht nach etwa 5 Stunden aus einer Hohlkugel, die die primäre Leibeshöhle (Blastocoel) umschließt. Nach Abschluß der 12. Zellteilung beginnt mit der 'Mid-Blastula Transition' (MBT) die zygotische Transkription. Nach den anfänglich raschen Zellteilungen ist nun eine ausreichend hohe Zellzahl vorhanden, um die Gastrulation, die den zukünftigen Körperbauplan etabliert, durchführen zu können. 9-14 Stunden nach der Befruchtung bilden sich

während der Gastrulation die drei Keimblätter, Ektoderm, Entoderm und Mesoderm aus. Das erste Anzeichen für Gastrulation ist die Invagination entodermaler Flaschenzellen in der



**Abb. 1-1 Embryonalentwicklung des Krallenfrosches *Xenopus laevis*.** Aus der Zygote entwickelt sich durch Furchungsteilungen eine Morula. Durch weitere mitotische Teilungen entsteht eine Hohlkugel, die Blastula. Das vegetative Ektoderm invaginiert und verdrängt so die primäre Leibeshöhle, das Blastocoel. In der Gastrula sind die drei Keimblätter, Ektoderm, Entoderm und Mesoderm angelegt. Während der Neurulation, die einen Teil der Organogenese darstellt, bilden sich die Strukturen des zentralen Nervensystems heraus. Im weiteren werden aus den entsprechenden Keimblättern die Organe differenziert. Am Ende des Larvalstadiums werden larvale Strukturen während der Morphogenese aufgelöst und das adulte Tier entsteht (aus Hollemann, 1994).

marginalen Zone nahe des Blastula-Äquators; dies führt zur Bildung einer sichelförmigen Urmundlippe, die sich zu einem zirkulären Blastoporus ausweitet. Durch morphogenetische Bewegungen wandern v.a. ektodermale Zellen in den Blastoporus ein (Involution) und breiten sich entlang der inneren Oberfläche des Blastocoeldaches zum animalen Pol hin aus. Dadurch verdrängen sie das Blastocoel und formen eine sekundäre Körperhöhle, den Urdarm (Archenteron). Der entstandene dreischichtige Keim besteht aus der äußeren Schicht des Ektoderms, der inneren entodermalen Schicht, die den neu entstandenen Hohlraum auskleidet, und dem zwischen Ektoderm und Entoderm gelegenen dritten Keimblatt, dem Mesoderm. Im Lauf der Entwicklung differenzieren die Keimblätter zu unterschiedlichen Organen: Aus dem

Ektoderm entstehen Nervensystem, Haut und Sinnesorgane. Das Mesoderm bildet Muskeln, Knochen, Chorda dorsalis (Notochord), Mesenchym, Herz, Blutgefäßsystem, Niere und Urogenitalsystem. Entodermale Derivate sind u.a. die inneren Organe, Magen, Darm, Leber, Pankreas, Lunge und Harnsystem.

Im Anschluß an die Gastrulation folgt die Neurulation (14-22 Stunden nach der Befruchtung) als erster Schritt der Organogenese. Sobald der Blastoporus geschlossen ist, bildet sich im Ektodermbereich die Neuralplatte, aus der zunächst eine Neuralrinne entsteht. Durch deren Absenkung und Fusion der Ränder (Neuralfalten) wird im Inneren das Neuralrohr ausgebildet, das den Vorläufer des Rückenmarks darstellt. Nach Abschluß der Neurulation, die die frühe Embryonalentwicklung abschließt, folgt die Larvalentwicklung zur Kaulquappe und die Metamorphose zum adulten Frosch. Dabei wird von Kiemenatmung auf Lungenatmung umgestellt, der Schwanz zurückgebildet und der Mund verbreitert.

## 1.2 Mesoderm-Induktion bei *Xenopus laevis*

Eine der Herausforderungen der Entwicklungsbiologie und Embryologie ist es, zu verstehen, wie aus wenigen Zellen ein Organismus aus zahlreichen differenzierten Zellpopulationen und Geweben entsteht. Die Entstehung des Mesoderms ist dabei eng mit der Existenz eines organisierenden Zentrums zu Beginn und während der Gastrulation verknüpft, das den Körperbauplan des Vertebratenembryos etabliert. Der Begriff Induktion beschreibt hierbei den Prozeß, in dem eine Gruppe von Zellen in der Lage ist, Signale auszusenden, die das Entwicklungsschicksal einer benachbarten Zellgruppe spezifizieren können, sofern diese kompetent für die Signale ist. Die wichtigsten induktiven Ereignisse in der frühen Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* sind schematisch in Abb. 1-2 dargestellt.

Nach Eintritt des Spermiums an einem Punkt der animalen Hemisphäre erfolgt eine 30° Rotation des Kortex relativ zum Zytoplasma der Eizelle. Dabei werden Mikrotubuli ausgerichtet, mittels derer zytoplasmatisches Material in die Äquatorregion transportiert wird, die der Seite des Eintrittspunkts gegenüber liegt; an dieser dorsalen Position wird später der Spemann-Organisator lokalisiert sein. Das zuvor radialsymmetrische Ei besitzt nun eine bilaterale Symmetrie.

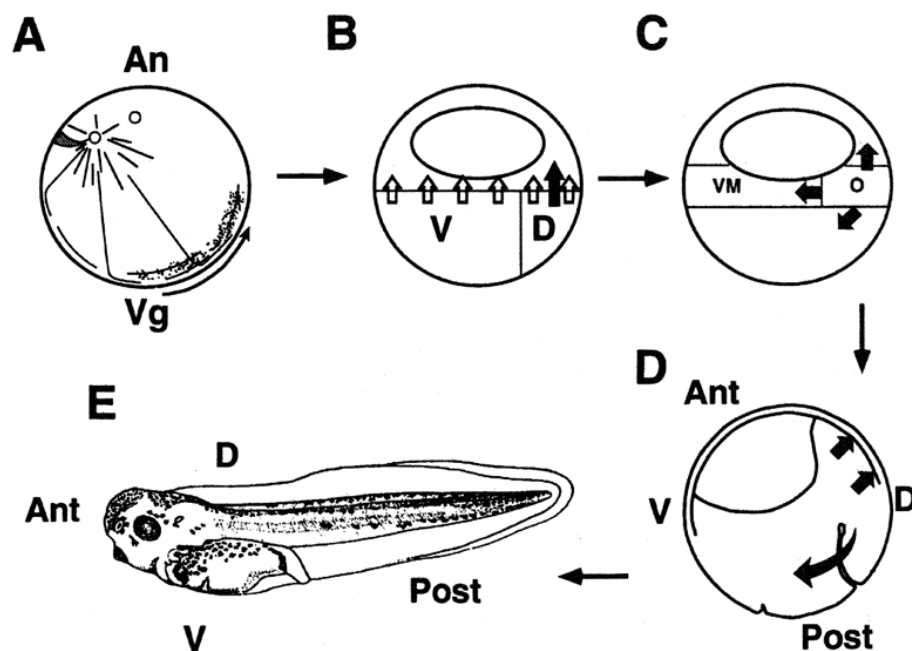
Den Untersuchungen von Nieuwkoop zufolge werden am Äquator durch Wechselwirkung animaler und vegetaler Zellen Mesoderm und Entoderm induziert, wobei das vegetale Signal in einem dorso-ventralen Gradienten verteilt ist (Nieuwkoop, 1969a,b; Boterenbrood und Nieuwkoop 1973). Demgegenüber unterscheidet sich das Drei-Signale-Modell der Mesoderm-Induktion von Smith und Slack (1983) durch die Annahme qualitativ unterschiedlicher Signale dorsaler und ventraler vegetaler Blastomeren. Nach diesem Modell existiert ein generelles Signal, daß in der frühen marginalen Zone (MZ) ventrales Mesoderm induziert. Ein weiteres Signal, das

dorsales (axiales) Mesoderm induziert, wird von den dorsal-vegetalen Zellen des frühen Blastula-Embryos emittiert. Dieses vegetale, dorsalisierende Zentrum, das seine Aktivität bis zum späten Blastulastadium behält, wird als Nieuwkoop-Zentrum bezeichnet. Die Funktion des Nieuwkoop-Zentrums ist es, in den darüberliegenden animalen Zellen die Bildung des (späten Blastula-) Organisations zu induzieren. Da die ersten beiden Induktionsereignisse vor Einsetzen der zygotischen Transkription mit der MBT stattfinden, müssen diese frühen Signale maternalen Natur sein; sie sind noch nicht identifiziert. Das Ergebnis der frühen Induktionsprozesse ist ein mesodermaler Ring in der Äquatorialzone des Embryos, der sich nach der zukünftigen Entwicklung seiner Regionen in vier Bereiche unterteilen läßt. Die dorso-marginale Zone (DMZ) bildet Notochord und Somiten, die dorso-laterale marginale Zone entwickelt sich zu Muskeln und Herz, während sich die ventrale marginale Zone zu Mesenchym, Pronephros und Blut differenziert. Das dritte induktive Signal dorsalisiert vom Organisator der frühen Gastrula ausgehend das benachbarte ventrale Mesoderm zu intermediärem (lateralem) Mesoderm. Weitere Signale des Organisations induzieren das darüberliegende Ektoderm (neurale Induktion) sowie das darunterliegenden Entoderm (Anteriorisierung).

Dieses Modell wird durch neuere Studien modifiziert. Heasman (1997) charakterisiert den Beginn der Mesoderminduktion in der Blastula anhand zweier dorsaler und eines ventralen Signalwegs; dies sind zum einen der *Xenopus* Wnt/ $\beta$ -Catenin- und der 'Transforming Growth Factor  $\beta$ ' (TGF- $\beta$ ) Signalweg vom Activin-Typ, sowie der ventrale TGF- $\beta$  Signalweg vom BMP-Typ (die an der Mesoderm-Induktion beteiligten Signalwege werden im folgenden Abschnitt 1.3 beschrieben). Dabei wird angenommen, daß bereits die Oozyte in drei Zonen unterteilt ist. Darüberhinaus wirken nach der MBT dorsal sezernierte Proteine (Chordin, Noggin) ventralen Signalen (BMP) entgegen und ermöglichen so eine dorsale Differenzierung. Harland und Gerhart (1997) bestätigen die Annahme zweier unterschiedlicher vegetaler Signale und beschreiben die Mesoderm-Induktion, sowie die damit verbundene Bildung des Spemann Organisations in der dorsalen marginalen Zone als Antwort auf ein generelles Mesoderm-induzierendes Signal und ein dieses überlagerndes dorsal-modifizierendes Signal. Das Mesoderm-induzierende Signal (wahrscheinlich ein Mitglied der TGF- $\beta$  Familie) ist um den gesamten Äquator verteilt, während das dorsal-modifizierende Signal (wahrscheinlich ein Faktor der Wnt-Signalkaskade) kurz nach der Befruchtung vom vegetalen Pol in den zukünftigen dorsalen Bereich des Äquators transportiert wird.

Diejenige Gruppe von Zellen, die die beiden maternalen Signale freisetzt, stellt demnach das Nieuwkoop-Zentrum dar, das den Organisator bzw. einen Teil davon induziert. Durch die maternalen Faktoren des frühen Organisations werden zygotische, sog. 'immediate-early' Gene für Transkriptionsfaktoren aktiviert, die ihrerseits Mesoderm-dorsalisierende Proteine aktivieren. Diese induzierenden Faktoren bewirken eine dorsale Differenzierung, indem sie den Signalen entgegenwirken, die von den Zellen für eine ventrale/posteriore Entwicklung benötigt werden. Ventralisierende Liganden (wie BMPs bzw. Wnt-8) fördern die ventral-posteriore Entwicklung

und stellen gleichzeitig Inhibitoren der dorso-anterioren Entwicklung dar. Sie können durch hochaffine Bindung an dorsal-induzierende Faktoren (wie Chordin, Noggin bzw. Frzb) neutralisiert werden, da so die Wechselwirkung mit deren spezifischen Rezeptoren verhindert wird (Piccolo et al., 1996; Leyns et al., 1997; Wang et al., 1997b). Demnach würde der Organisator die dorsale Entwicklung fördern, indem er Signale aussendet, die der Wirkung ventralisierender Signale in allen drei Keimblättern entgegen-wirken. Anhand der spezifischen Expression von Transkriptionsfaktoren und sezernierten Proteinen läßt sich der Spemann Organisator (und seine Unterteilung in Subdomänen) molekular beschreiben (siehe auch Kapitel 3.2.2, Abb. 3-12, 3-14; Kapitel 4.2, Abb. 4-1).



**Abb. 1-2 Darstellung der Induktionsprozesse in der frühen Entwicklung von *Xenopus laevis*.** (A-D) stellen Querschnitte der entsprechenden Stadien dar. An, animaler Pol; Vg, vegetaler Pol; V, vegetal; D, dorsal; VM, ventrales Mesoderm; O, Organisator; Ant, anterior; Post, posterior. (A) **Zygote**. Gegenüber der Eintrittsstelle des Spermiums in der animalen Hemisphäre (sternförmige Struktur links oben) verschiebt sich während der kortikalen Rotation der Kortex des Eies um 30°. Dabei wird zytoplasmatisches Material (punktiert) des vegetalen Pols auf Höhe des Äquators auf der rechten Seite transportiert (Pfeil). (B) **mittleres Blastula-Stadium** (NF 8.5) mit primärer Leibeshöhle (Blastocoel) in der animalen Hemisphäre. Beginn der zygotischen Genexpression. Vegetale Zellen senden ein generelles Mesoderm-induzierendes Signal (weiße Pfeile) in die Äquatorialebene aus. Die zygotische Antwort der animalen Zellen etabliert in der marginalen Zone einen ringförmigen Bereich prospektiven ventral-posterioren Mesoderms. Durch ein zusätzliches Mesoderm-modifizierendes Signal (schwarzer Pfeil) der dorsal-vegetalen Zellen (Nieuwkoop Zentrum) wird in der dorsalen marginalen Zone der Organisator induziert. (C) **frühes Gastrula-Stadium** (NF 9.5/10). Der Organisator sendet Signale in die benachbarten Regionen (Pfeile): in das laterale (ventrale) Mesoderm (Dorsalisierung des Mesoderms), in das darüberliegende Ektoderm (Neuralinduktion) und in das darunterliegende Entoderm (Anteriorisierung des Entoderms). (D) **mittleres Gastrula-Stadium** (NF 11). Im Verlauf der Gastrulation erfolgt die Involution des Mesoderms und die Internalisierung des Entoderms. Der Organisator ist unter dem Ektoderm lokalisiert und an der fortgesetzten Dorsalisierung des Mesoderms (gebogener Pfeil) und der vertikalen Neuralinduktion (kurze Pfeile) beteiligt. (E) **Kaulquappen-Stadium** (NF 40). Äußere Ansicht mit Bezeichnung der dorso-ventralen (D-V) und der antero-posterioren Achse (Ant-Post). (Harland und Gerhart, 1997).

Die während der Mesoderm-Induktion exprimierten Transkriptionsfaktoren können dorsal (z.B. Siamois, Lemaire et al., 1995; Gooseoid, Cho et al., 1991), ventral (z.B. Xvent-1, Gawantka et al., 1995) oder in der gesamten marginalen Zone (z.B. Xbra, Smith et al., 1991; Xnot2, von Dassow et al., 1993) lokalisiert sein. Zu den sezernierten Proteinen zählen im dorsalen Bereich z.B. Chordin (Sasai et al., 1996), Noggin (Smith und Harland, 1992), Cerberus (Bouwmeester et al., 1996), Frzb (Leyns et al., 1997; Wang et al., 1997) und im ventro-lateralen Bereich Xwnt-8 (Smith und Harland, 1991; Christian et al., 1991).

### 1.3 Signalkaskaden während der Mesoderm-Induktion

Die Signalwege, die an der Mesoderm-Induktion und der dorso-ventralen Gliederung des Embryos beteiligt sind, können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Zur ersten Gruppe der Mesoderm-induzierenden Aktivierungswege gehören der 'Transforming Growth Factor- $\beta$ ' (TGF- $\beta$ ) Signalweg vom Activin-Typ und der 'Fibroblast Growth Factor' (FGF) Signalweg. Die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Kaskade und der TGF- $\beta$  Signalweg des BMP-Typs werden zu den Mesoderm-modifizierenden Signalübertragungswegen gerechnet. Diese können durch Antagonisten der Signalmoleküle inhibiert werden (Wnt durch Frzb; BMP durch Noggin, Chordin, Follistatin).

**TGF- $\beta$  Signalwege** sind an zahlreichen Prozessen während der Embryonalentwicklung von Vertebraten beteiligt (Smith, 1995; Hogan, 1996a,b). Dabei ist die Beteiligung von TGF- $\beta$  Signalmolekülen wie Activin, Vg1 oder BMP-4 an der Induktion und Gliederung des Mesoderms bei *Xenopus* besonders intensiv untersucht worden. Während Activin und Vg1 dorsales Mesoderm induzieren, resultiert die Aktivierung des BMP-Signalwegs in der Bildung ventralen Mesoderms. TGF- $\beta$  Moleküle binden an einen heteromeren Komplex aus zwei transmembranen Serin/ Threonin Kinasen, die als Typ I und II Rezeptoren bezeichnet werden. Nach Ligandenbindung phosphoryliert der Typ II Rezeptor den Typ I Rezeptor. Als Folge der Aktivierung des Typ I Rezeptors werden Proteine der Smad-Familie phosphoryliert. Zahlreiche Smad-Proteine sind kürzlich als wichtige Komponenten von TGF- $\beta$  Signalwegen beschrieben worden (Übersicht in Kretschmar und Massagué, 1998; Massagué, 1996). Die Smad-Proteine können in drei Subfamilien unterteilt werden: 1) Rezeptor-aktivierte Smads (Smad-1, -2, -5, -8), Co-Smads (Smad-4) und antagonistische Smads (Smad-6, -7). Dabei scheint es, daß die Signalübermittlung verschiedener Moleküle der TGF- $\beta$  Familie durch unterschiedliche Smad-Isoformen erfolgt (z.B. Derynck und Zhang, 1996; Candia et al., 1997; Wrana und Pawson, 1997; Nakayama et al., 1998). Im Fall der Stimulation durch Activin phosphoryliert der aktivierte Typ I Rezeptor zytosolisches Smad-2, das mit Smad-4 einen Heterokomplex bildet. Dieser Komplex wird daraufhin in den Kern transportiert und assoziiert mit dem Winged-Helix Transkriptionsfaktor FAST-1, einem maternalen Protein, daß die zygotische Transkription von Mix-2 aktiviert (Chen et al., 1996). Eine ähnliche Signalkaskade existiert auch für BMPs; diese führt zur Aktivierung

eines anderen Smad-Proteins, Smad-1 (Graff et al., 1996). Die Transkriptionsfaktoren, die das BMP-Signal vermitteln, sind nicht bekannt. Als Zielgene werden die zygotischen Faktoren Xvent-1 (Gawantka et al., 1995), Xvent-2 (Onichtchouk et al., 1996) oder Mix-1 (Mead et al., 1996) diskutiert. Während Smad-4 für die Assoziation der durch Rezeptor-Kinasen aktivierten Smads und deren Transport in den Zellkern erforderlich ist, können die antagonistischen Smad-Proteine eine Signalübertragung durch Faktoren der TGF- $\beta$  Familie inhibieren. Sie scheinen damit in der Lage zu sein, die Regulation der TGF- $\beta$ /Smad Signalwege zu kontrollieren (Kretzschmar und Massagué, 1998).

Die Signaltransduktion durch Wachstumsfaktoren der **FGF**-Klasse verläuft über den MAP Kinase Signalweg und ist ebenfalls an der Mesoderm-Induktion in *Xenopus* beteiligt (Übersicht und Literaturverweise in Harland und Gerhart, 1997). Dies konnte zum einen durch Zugabe von FGF zu isolierten animalen Polkappen-Explantaten ('Animal Caps') gezeigt werden (z.B. Kimelman und Kirschner, 1987; Isaacs et al., 1992); zum anderen konnte die Mesodermbildung analog durch Verwendung dominant-negativ wirkender Rezeptoren verhindert werden (Amaya et al., 1991, 1993). Darüber hinaus wird ein funktioneller FGF-Signalweg auch für die Activin-induzierte Mesodermbildung benötigt (Gotoh et al., 1995; LaBonne und Whitman, 1995; Kroll und Amaya, 1996). Während jedoch Activin für die primäre Induktion von Mesoderm erforderlich ist, scheint die Funktion des FGF-Signalwegs eher in der Aufrechterhaltung der Expression mesodermaler Gene wie des T-Box Gens Xbra (Smith, 1997) zu liegen. Xbra kann sowohl durch FGF als auch durch Activin und BMP-4 induziert werden, dennoch wird seine Expression durch einen FGF-abhängigen autoregulatorischen Mechanismus aufrechterhalten (Schulte-Merker und Smith, 1995). Dabei aktiviert Xbra die Expression von embryonalem FGF (eFGF), welches wiederum Xbra induziert.

Die Familie der Fibroblast Wachstumsfaktoren (FGF) umfaßt mindestens 13 Mitglieder, die mit spezifischen FGF-Rezeptoren, transmembranen Tyrosinkinasen, wechselwirken. Durch Ligandenbindung dimerisieren die FGF-Rezeptoren, und es kommt zu einer Autophosphorylierung des Rezeptors. Dadurch entsteht eine Bindungsstelle für die SH2-Domäne des Grb2 Proteins, das durch Phosphorylierung aktiviert wird und über eine SH3-Domäne das SOS Protein bindet. SOS aktiviert Ras durch GTP-Bindung, was zu einer Rekrutierung von Raf (MAP Kinase Kinase Kinase) führt und eine aktivierende Kaskade von MAP-Kinasen initiiert. Aktiviertes Raf phosphoryliert beispielsweise MEK (MAP Kinase Kinase), die ihrerseits eine MAP Kinase aktiviert. Zu den Substraten der MAP Kinasen gehören auch zytoplasmatische Transkriptionsfaktoren, die durch Phosphorylierung aktiviert werden und die Transkription spezifischer Gene bewirken (Übersicht in Cahill et al., 1996; Avruch et al., 1994; Clarke, 1994).

Die **Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalkaskade** (Überblick und Literaturverweise in Dale, 1998; Moon et al., 1997; Willert und Nusse, 1998; Heasman, 1997) induziert eine dorsalisierende Aktivität in dem Bereich der Äquatorialzone, der später dem Organisator entspricht. Die Wechselwirkung eines

Wnt-Signalmoleküls mit dem Frizzled-Rezeptor führt über Inaktivierung der Glykogen Synthase Kinase-3 (GSK3) zur zytoplasmatischen Akkumulation des  $\beta$ -Catenin Proteins. Nach Translokation in den Kern interagiert  $\beta$ -Catenin mit dem HMG-Box Transkriptionsfaktor TCF3/LEF1 und beeinflusst die Aktivität dieses DNA-bindenden Proteins. Es wird angenommen, daß Wnt-Signale in der MBT, wenn die zygotische Transkription beginnt, die Transkription spezifischer Gene, wie z.B. *Siamois*, aktivieren können.

## 1.4 Zinkfinger-Proteine

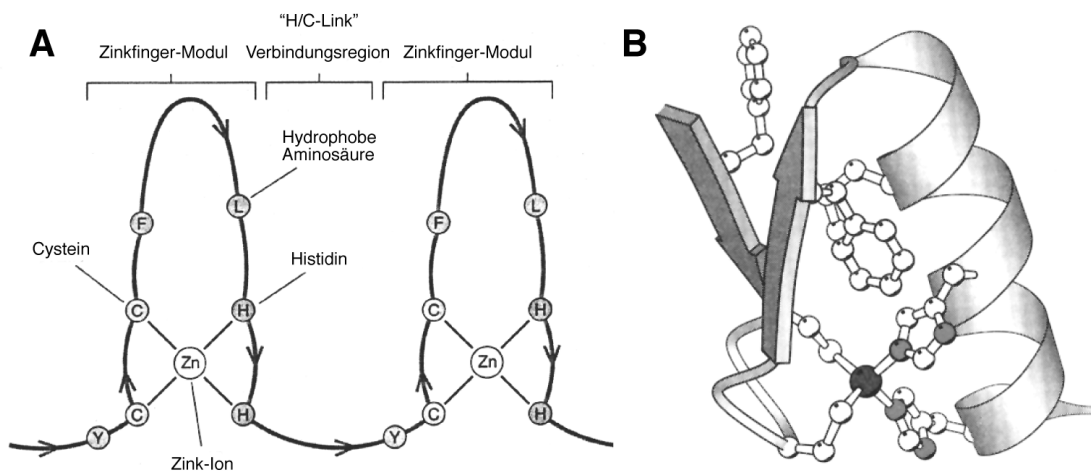
### 1.4.1 Struktur von $C_2H_2$ -Zinkfingern

Die Entwicklung eines Organismus ist nur möglich, wenn bestimmte Proteine zur richtigen Zeit und in den entsprechenden Zellen vorhanden sind. Die dazu notwendige Regulation der Transkription ihrer Gene erfolgt mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren, die spezifische DNA-Sequenzen erkennen und an diese binden können. Durch die Analyse verschiedener Nukleinsäure-bindender Proteine konnten strukturell unterschiedliche Bindungsdomänen identifiziert werden, wobei die Zinkfinger-Domäne ein äußerst konserviertes Bindungsmotiv in Eukaryoten darstellt. Das erste identifizierte Zinkfinger-Protein war der Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA), der in *Xenopus* Oozyten zusammen mit einem Molekül 5S RNA das 7S RNP bildet (Pelham und Brown, 1980). Die Funktion der ribonukleären Partikel (RNP) besteht in der Speicherung großer Mengen ribosomaler RNA in den Oozyten (Picard und Wegnez, 1979). TFIIIA, das 1984 von Ginsberg et al. kloniert wurde, ist essentiell für die Transkription des 5S RNA Gens (Engelke et al., 1980; Sakonju et al., 1980). Die von der cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt, daß TFIIIA repetitiv neun Domänen mit invarianten Cystein- und Histidin-Paaren ( $C_2H_2$ ) enthält, die koordinativ ein Zink-Ion binden können (Miller et al., 1985). Dadurch bilden die dazwischenliegenden Aminosäuren eine fingerförmige Proteinstruktur (Zinkfinger) aus, die aus einem antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt und einer  $\alpha$ -Helix besteht und durch weitere hoch konservierte, hydrophobe Aminosäurereste stabilisiert wird (Abb. 1-3). Das Zink-Ion liegt im Inneren der kompakten, globulären Struktur und ist tetraedrisch mit den Histidinresten und den beiden Cysteinresten, die den Wendepunkt des  $\beta$ -Faltblattes bilden, koordiniert. Zur Abgrenzung von Strukturelementen, die eine andere Anordnung oder Anzahl Zink-koordinierender Cystein- und Histidin-moleküle aufweisen, werden Motive, die dem TFIIIA-Typ entsprechen, als  $C_2H_2$ -Zinkfinger bezeichnet. Sind in einem Zinkfinger-Protein zwei oder mehr Zinkfinger-Module des  $C_2H_2$ -Typs benachbart, so sind diese durch eine konservierte Linker-Region (H/C-Link) aus sieben Aminosäuren (TGERPFK) verbunden, wie Schuh et al. (1986) durch den Vergleich von  $C_2H_2$ -Zinkfinger-Domänen verschiedener Proteine zeigen konnten.



Eine räumliche Struktur für das Zinkfinger-Motiv als kleine, unabhängig gefaltete Mini-Domäne, die in modularer Anordnung sequenzspezifisch DNA erkennen soll, war von Berg (1988) und Nardelli (1991) postuliert worden und konnte durch NMR Studien (Párraga et al., 1988; Lee et al., 1989) und Röntgen-Strukturanalyse verifiziert werden. Dabei hatten Pavletich und Pabo (1991) die Kristallstruktur eines Kokristalls der aus drei Zinkfingern bestehenden DNA-Bindungsdomäne des Maus Proteins Zif268/Egr-1 (Christy et al., 1988) mit der DNA-Zielsequenz bestimmt und gefunden, daß die drei Zinkfinger die gleiche Sekundärstruktur besitzen und sich in einer halbkreisförmigen Struktur um die DNA-Doppelhelix winden.

Die Zinkfinger liegen in diesem Komplex in der großen Furche der B-DNA Doppelhelix und interagieren mit den Basen der DNA durch Aminosäureseitenketten der  $\alpha$ -Helix. Die Orientierung der einzelnen Zinkfinger in Bezug auf die DNA ist nahezu identisch. Jede Domäne bildet Kontakte zu drei aufeinanderfolgenden Basenpaaren aus, wobei die Mehrzahl der basenspezifischen Kontakte nur mit einem einzelnen DNA-Strang besteht. Daneben existieren auch Kontakte mit dem DNA-Rückgrat.



**Abb. 1-3 Schematische Darstellung einer Zinkfinger-Domäne des  $C_2H_2$ -Typs.** (A) Zwei benachbarte Zinkfinger-Module sind durch einen konservierten H/C-Link miteinander verbunden. Die Cystein- und Histidin-Seitenketten koordinieren ein Zink-Ion, während drei andere konservierte Aminosäuren (Phe, F; Leu, L; Tyr, Y) zur Bildung einer hydrophoben Struktur beitragen (nach Miller et al., 1985). (B) Die dreidimensionale Organisation der Zinkfinger-Domäne besteht aus zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern und einer  $\alpha$ -Helix. Diese bilden durch koordinative Bindung des Zink-Ions (schwarz) direkt im Zentrum eine kompakte Konformation aus, die durch die Seitenketten der am stärksten konservierten Aminosäuren zusätzlich stabilisiert wird (aus Berg und Shi, 1996).

Die Strukturbestimmung von Komplexen mit anderen DNA-Bindungsdomänen, z.B. des humanen Onkoproteins GLI (Pavletich und Pabo, 1993) oder des regulatorischen *Drosophila* Proteins Tramtrack (Fairall et al., 1993) haben im Vergleich mit der Zif268-Struktur gezeigt, daß trotz grundsätzlicher Übereinstimmung in Bezug auf den Bindungsmodus Abweichungen existieren. So wurde beispielsweise gefunden, daß zum einen die Ausbildung basenspezifischer

Kontakte mit beiden DNA Strängen erfolgen kann und daß dabei mindestens sechs innerhalb der Zinkfinger-Helix liegende oder benachbarte Aminosäuren beteiligt sind. Zum anderen können benachbarte Zinkfinger-Domänen Protein/Protein-Kontakte ausbilden. Diese neuen Strukturinformationen haben deutlich gemacht, daß es keine generellen Regeln gibt, anhand derer sich die DNA-Bindungsspezifität von Zinkfinger-Domänen vorhersagen läßt. Andererseits ist es Desjarlais und Berg (1993) gelungen, Zinkfinger-Proteine mit voraussagbarer DNA-Erkennungssequenz zu entwerfen, die gerichtet an spezifische DNA-Sequenzen binden können.

Mittlerweile konnten mehr als 10 verschiedene Klassen Zink-bindender Domänen identifiziert werden, die strukturell und funktionell sehr unterschiedlich sind. Neben dem C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Typ (Prototyp: TFIIIA) existieren Typen von Zink-Domänen die eine andere Komposition der Cysteine (C) und Histidine (H) aufweisen, wie beispielsweise C<sub>8</sub> (Steroid-Thyroid Rezeptoren), C<sub>6</sub> (GAL4 Familie), C<sub>3</sub>HC (RING-Finger Familie), C<sub>2</sub>HC (retrovirales Nukleocapsid), C<sub>2</sub>HC<sub>5</sub> (LIM-Domäne) und C<sub>4</sub> (GATA-1); eine Übersicht und weiterführende Literaturverweise geben Berg und Shi (1996). Dabei zeigt sich, daß das Vorhandensein Zinkfinger-ähnlicher Sequenzmotive nicht notwendigerweise bedeutet, daß jeder Zinkfinger mit Nukleinsäuren interagiert. So werden für einen Steroid-Rezeptor (Härd et al., 1990) und ein Protein, das eine LIM-Domäne enthält (Schmeichel und Beckerle, 1994), auch Protein/Protein-Wechselwirkungen beschrieben.

Auch für TFIIIA muß neben der DNA-Bindung eine weitere Wechselwirkung mit Nukleinsäuren beachtet werden. Während TFIIIA DNA und RNA spezifisch binden kann (Pelham und Brown, 1980; Honda und Roeder, 1980; Theunissen et al., 1992), bindet das ebenfalls in *Xenopus* Oozyten vorkommende p43 Protein nur an RNA (Joho et al., 1990). RNA-Bindung durch Zinkfinger-Domänen ist auch für das Wilms Tumor Suppressorprotein beschrieben worden (Caricasole et al., 1996).

#### **1.4.2 Multigenfamilien von Zinkfinger-Proteinen und ihre Funktion in der Embryogenese**

Die Identifizierung der Zinkfinger-Domänen in TFIIIA und eines konservierten H/C-Links ermöglichten die Isolierung von zahlreichen Zinkfinger-Proteinen des C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Typs. Schätzungen zufolge enthalten die Genome von Vertebraten etwa 1000 Gene für C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> Zinkfinger-Proteine (Chowdhury et al., 1987; Köster et al., 1988; Bellefroid et al., 1989). Diese können anhand von Sequenzelementen außerhalb der Zinkfinger-Gruppen in Multigenfamilien wie FAX (Finger Associated Boxes; Knöchel et al., 1989), FAR (Finger Associated Repeats; Klocke et al., 1994) und KRAB (Krüppel Associated Box; Bellefroid et al., 1993) unterteilt werden. Die Untersuchung der genomischen Organisation der KRAB- und FAX-Gene zeigte, daß diese Gene in großen Gruppen von bis zu 40 Genen vorkommen. Darüber hinaus konnten Bellefroid et al. (1993) zeigen, daß die Gene der KRAB-Familie eine hoch konservierte Intron/Exon-Struktur aufweisen und auf höhere Vertebraten beschränkt sind. Ein Großteil der in Vertebraten vorkommenden Gene für Zinkfinger-Proteine, die große Cluster von Zinkfingermodulen

aufweisen, könnte in der Evolution erst spät durch Gen-Amplifikation entstanden sein. Die biologische Funktion der repetitiven DNA-bindenden Zinkfinger-Domänen, wie auch der assoziierten Sequenzmotive (FAX, FAR) ist nicht bekannt. Die meisten Proteine dieser Klasse von evolutionär spät entstandenen Multigen-Subfamilien weisen in den Embryonalstadien und adulten Geweben kein hochspezifisches Expressionsmuster auf.

Im Gegensatz dazu existiert eine kleine Gruppe von evolutionär hoch konservierten Zinkfinger-Proteinen (Übersicht in El-Baradi und Pieler, 1991; Pieler und Bellefroid, 1994), die als Transkriptionsregulatoren an der Zelldifferenzierung oder Embryogenese beteiligt sind. Die meisten dieser regulatorischen Zinkfinger-Proteine können aufgrund homologer Zinkfinger-Cluster kleinen Unterfamilien zugeordnet werden, wie z.B. der EGR-, der WT1-, der SP1- oder der GLI-Familie.

Proteine der **EGR-Familie** ('Early Growth Response') besitzen als gemeinsames Strukturmotiv drei Zinkfinger des C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Typs. Sie sind als Triplet angeordnet und bilden die DNA-Bindungsdomäne, deren dreidimensionale Struktur für Egr-1/zif268 durch Pabo und Pavletisch (1991; siehe Kapitel 1.4.1) aufgeklärt wurde. Außerhalb der hochkonservierten Zinkfinger erstreckt sich die Homologie auf die benachbarten basischen Regionen. Eine signifikante Abweichung in den terminalen Sequenzbereichen erlaubt eine Einteilung in Unterklassen.

Die Zinkfinger-Proteine der EGR-Familie binden an die gleiche DNA-Zielsequenz und wirken als transkriptionelle Aktivatoren. Die Gene dieser Transkriptionsfaktoren gehören zur Klasse der 'immediate-early' Gene und werden nach Stimulation innerhalb weniger Minuten ohne *de novo* Proteinbiosynthese transient induziert. Einen weiteren Hinweis darauf, daß es sich um Mitglieder einer Gen-Familie handelt, gibt die einheitliche genomische Organisation der EGR-Gene, bestehend aus zwei Exons, die durch ein einziges Intron getrennt sind (z.B. die humanen Gene Egr-1, Sakamoto et al., 1991; Egr-2, Rangnekar et al., 1990; Egr-4, Holst et al., 1993). Allerdings sind die Gene auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert.

Gegenwärtig sind vier Subfamilien von Egr-Proteinen (Egr-1 bis -4) bekannt, deren einzelne Mitglieder unter zahlreichen Synonymen beschrieben worden sind. Die Tabelle 1-1 gibt einen Überblick über die einzelnen EGR-Subfamilien. Egr-1, -2 und -3 sind untereinander stärker homolog als im Vergleich zu Egr-4. Eine Unterteilung der Egr-Proteine in funktionelle Domänen – analog zu der von Gashler et al. (1993) für Egr-1 vorgeschlagenen Gliederung – zeigt, daß das Egr-4 Protein keine Repressionsdomäne aufweist (Crosby et al., 1992). Diese Repressionsdomäne dient der Bindung von NAB-Proteinen, einer kürzlich identifizierten Klasse von Korepressoren (Russo et al., 1995; Svaren et al., 1996; Swirnoff et al., 1998; siehe Kapitel 3.3.3.4), die an der Regulation der transkriptionellen Aktivierung durch Egr-Proteine beteiligt sind. Als EGR-Familie wird daher im folgenden nur diese stärker konservierte „Kerngruppe“ von Egr-1, -2 und -3 bezeichnet.

In der Embryonalentwicklung ist Egr-2/Krox-20 am besten charakterisiert. In der Maus wird Krox-20 am Tag 9 der Embryogenese spezifisch in den Rhombomeren 3 und 5 des Hinterhirns exprimiert (Wilkinson et al., 1989). In transgenen Mäusen, bei denen die Krox-20 Zinkfinger-Domäne homozygot deletiert waren, konnte gezeigt werden, daß das Krox-20 Protein eine essentielle Funktion im Rahmen der Entwicklung des Rhombencephalons besitzt. Die Tiere wiesen Defekte in der Segmentierung des Hinterhirns auf und starben bereits während der Embryogenese (Swiatek und Grindley, 1993). Die Beteiligung von Krox-20 an der Regulation des Homöobox-Gens HoxB2 während der Segmentierung des Hinterhirns konnte durch *in vivo* Bindung von Krox-20 an den Promotor des HoxB2 Gens nachgewiesen werden (Sham et al., 1993). Topilko et al. (1994) konnten zeigen, daß ein Verlust der Krox-20 Funktion die Differenzierung der Schwannschen Zellen blockiert und die Myelinisierung des peripheren Nervensystems verhindert. In *Xenopus* zeigt das Homologe Xkrox-20 in frühen Neurula-Stadien ein konserviertes Expressionmuster in Bezug auf die Rhombomere 3 und 5. Darüberhinaus existiert eine zusätzliche Expression in den Neuralleistenzellen des 5. Rhombomers (Bradley et al., 1992).

Subfamilie	Bezeichnung	Organismus	Referenz
<b>EGR-1</b>	NGFI-A	Ratte	Milbrandt, 1987
	Tis-8	Mensch	Lim, 1987
	zif268	Maus	Christy et al., 1988*
	Krox-24	Maus	Lemaire, 1988
	Egr-1	Maus	Sukhatme et al., 1988
	Egr-1	Mensch	Suggs et al., 1990
	Egr-1	Zebrafisch	Drummond et al., 1994
<b>EGR-2</b>	Krox-20	Maus	Chavrier et al., 1988a
	Egr-2	Mensch	Joseph, 1988
	Krox-20	Huhn	Nieto et al., 1991
	Krox-20	<i>Xenopus</i>	Bradley et al., 1992
	Krox-20	Zebrafisch	Oxtoby und Jowett, 1993
<b>EGR-3</b>	Egr-3	Mensch	Patwardhan et al., 1991
	Egr-3 (partiell)	Maus	Patwardhan et al., 1991
	pilot	Mensch	Mages et al., 1993
	Egr-3	Ratte	Yamagata et al., 1994
<b>EGR-4</b>	NGFI-C	Ratte	Crosby et al., 1991
	pAT133	Mensch	Müller, 1991

**Tab.1-1 Unterteilung der evolutionär konservierten EGR-Familie in vier Sub-Klassen.** \* zif268 hat in Bezug auf NGFI-A 18 Aminosäure-Substitutionen oder -Deletionen (Christy et al., 1988).

Eine eigene Gruppe bilden die Proteine der **Wilms Tumor** (WT1) Gene. Das wt1 Gen besitzt vier Zinkfinger-Motive, von denen die Finger 2-4 stark homolog (67% identisch) zur Egr-1 Zinkfinger-Domäne sind (Mensch, Call et al., 1990; Maus, Buckler et al., 1991; Ratte, Sharma et al.,

1992; *Xenopus*, Carroll und Vize, 1996). Neben dem nicht konservierten ersten Zinkfinger des WT1 Proteins unterscheidet sich auch die genomische Organisation des wt1 Gens von der der EGR-Familie, da jeder der vier Zinkfinger in einem individuellen Exon organisiert ist (Gessler et al., 1990). Das WT1-Zinkfinger-Protein kann die gleiche DNA-Konsensus-Sequenz wie Egr-1 binden (Rauscher III et al., 1990). Allerdings existieren alternativ gespleißte WT1-Transkripte, die eine veränderte Bindungsspezifität (Haber et al., 1990) oder intranukleäre Lokalisation aufweisen (Larsson et al., 1995; Lamond, 1995).

wt1 ist ein Tumorsuppressor-Gen (Haber et al., 1993) und in 10-15% der Wilms Tumore mutiert. Mutationen im wt1 Gen resultieren in Wilms Tumoren (Nephroblastomen), der am häufigsten vorkommenden Krebserkrankung bei Kindern (Matsunaga, 1981; Übersicht in Hastie, 1994), sowie in Syndromen wie dem Denys-Dash Syndrom (Glomerulonephropathie) oder dem WAGR Syndrom. Als putativer transkriptioneller Repressor (Madden, 1991) wird WT1 in der sich entwickelnden Niere (Metanephros) exprimiert (Mundlos et al., 1993). In *Xenopus* zeigt wt1 ein ähnliches räumlich-zeitliches Expressionmuster, das bis zum Schwanzknospen-Stadium auf das sich entwickelnde Nierensystem (Pronephros) beschränkt ist (Carroll und Vize, 1996).

Die **SP1-Familie** besitzt als typischen Vertreter das SP1-Zinkfinger-Protein, das als erster nicht-viraler, eukaryotischer Pol II-Transkriptionsfaktor identifiziert und isoliert wurde (Dyanan und Tjian, 1983; Kadonga et al., 1987). SP1 enthält drei C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger-motive, die an die Konsensussequenz GGG GCG GGG (Letovsky und Dyanan, 1989) binden. Die NMR-Analyse des zweiten und dritten SP1 Zinkfingers zeigte, daß die Struktur den analogen Zif268-Zinkfinger-Motiven sehr ähnlich ist (Narayan et al., 1997). SP1 ist ein nukleäres Protein, das in den meisten Zellen konstitutiv exprimiert wird, dessen Expressionsstärke aber während der Entwicklung und in verschiedenen Zelltypen differentiell reguliert wird (Saffer et al., 1991). In der Maus ist SP1 essentiell für die Embryogenese. Homozygot defiziente SP1<sup>-/-</sup> Mäuse wiesen zahlreiche Defekte auf und überlebten nur bis zum Tag 9.5 (Marin et al., 1997). Die Untersuchung einer Reihe von potentiellen SP1 Zielgenen in embryonalen Stammzellen zeigte dagegen keine Beeinflußung durch die SP1<sup>-/-</sup> Mutation. Auch das SP4 Zinkfinger-Protein ist notwendig für eine normale Embryonalentwicklung, wie Supp et al. (1996) anhand von SP4<sup>-/-</sup> mutierten Mäusen demonstrieren konnten. Zwei Drittel der SP4<sup>-/-</sup> Tiere starben wenige Tage nach der Geburt, während die Überlebenden eine geringere Körpergröße aufwiesen. Die homozygoten SP4<sup>-/-</sup> Männchen zeigten darüberhinaus ein abnormales Reproduktionsverhalten. In *Drosophila* ist das SP1-verwandte Gen buttonhead (btd) an der Kopfentwicklung beteiligt und kann in Mutanten, denen Btd fehlt, sogar teilweise durch SP1 von Säugetieren funktionell substituiert werden (Wimmer et al., 1993, 1996).

Die **GLI-Familie** umfaßt eine kleine Gruppe von Zinkfinger-Proteinen, die zuerst als Onkoproteine in humanen Tumoren (Kinzler et al., 1987; Roberts et al., 1989) gefunden wurden. Die

humanen GLI-Proteine besitzen fünf Zinkfinger-Domänen, die sequenzspezifisch an DNA binden (Kinzler et al., 1988; Kinzler und Vogelstein, 1990). Trotz der Struktur-aufklärung des DNA-Bindungsmotivs mit Hilfe eines Gli-Zinkfinger/DNA-Kokristalls (Pavletich und Pabo, 1993) sind bisher keine Zielgene bekannt, die durch Gli transkriptionell reguliert werden. Das *C.elegans* Gen *tra-1* (Zarkower und Hodgkin, 1992) sowie das *Drosophila* Segmentierungs-Gen *cubitus interruptus* (Orenic et al., 1990) gehören ebenfalls zur GLI-Familie und weisen darauf hin, daß die Struktur des Gli-Zinkfinger-Clusters evolutionär konserviert ist. Der Verlust der Funktion von Gli-3 resultiert beim Menschen in Defekten, die als „Greig Cephalopolysyndactylie Syndrom“ (GCPS) zusammengefaßt werden (Vortkamp et al., 1991). Gli-3 mutante Mäuse (‘extra-toes’) weisen ähnliche Defekte bei der Entwicklung von Gliedmaßen und Vorderhirn auf (Schimmang et al., 1992; Franz, 1994). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren der Gli-Familie in der Neuralentwicklung an der Vermittlung von Signalen des Sonic Hedgehog (Shh) Signalwegs beteiligt sind (Übersicht in Ruiz i Altaba, 1997; Lee et al., 1997; Sasaki et al., 1997). In *Xenopus* führt eine ektopische Expression von Gli1 in Embryonen zur Bildung epidermaler Tumore (Dahmane et al., 1997). Zuvor hatten Marine et al. (1997) zeigen können, daß die Transkriptions-Repressoren Xgli-3 und Xgli-4 in der frühen *Xenopus* Embryonalentwicklung an der Gliederung des Mesoderms und des Neuroectoderms beteiligt sind.

### 1.5 Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Egr-1

Das Egr-1 Gen wurde als ‘immediate-early’ Gen isoliert, daß nach Serum-Stimulation innerhalb weniger Minuten ohne *de novo* Proteinbiosynthese transient induziert wird (z.B. Lemaire et al., 1988). Dabei ist das Profil der Induktion dem des *c-fos* Gens sehr ähnlich. Die Induktion von Egr-1 kann in unterschiedlichen Zelltypen durch eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli erfolgen, die grob in vier Kategorien eingeteilt werden können: (1) mitogene Stimulation in allen Zelltypen; (2) differenzierungs- oder entwicklungsabhängige Induktion in Nerven, Herz, Knochen und myeloischen Zellen; (3) Gewebsverletzung oder Bestrahlung, sowie (4) neurale Stimulation durch Membrandepolarisation oder Krampfauslösung.

Die modulare Struktur des Egr-1 Proteins, das aus strukturell unabhängigen, funktionellen Domänen aufgebaut ist (Kapitel 3.1.4, Abb. 3-3), wurde durch Analysen von Deletions-mutanten und Fusionsproteinen untersucht. Egr-1 ist ein nukleäres Phosphoprotein, das drei konservierte Zinkfinger-motive des C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Typs enthält (Kapitel 1.4.1), die zusammen mit einer angrenzenden Region durch das Vorhandensein zahlreicher basischer Aminosäure-Seitenketten charakterisiert sind. Neben einer starken N-terminalen und einer schwachen C-terminalen Aktivierungsdomäne konnte eine Repressionsdomäne identifiziert werden, die durch Bindung eines Faktors der NAB-

Repressorfamilie die Aktivität des Egr-1 Proteins negativ reguliert (Kapitel 3.3.3.4 und 4.5). In wie weit eine Phosphorylierung an der Regulation der Repression von Egr-1 bzw. der Transaktivierung durch Egr-1 beteiligt ist, ist noch ungeklärt. Egr-1 besitzt eine zweigeteilte Kernlokalisationssequenz (NLS), bei der sowohl der Zinkfinger 2 als auch Zinkfinger 3 zusammen mit einer N-terminalen Sequenz von 15 Aminosäuren die nukleäre Lokalisation vermitteln können (Gashler et al., 1993; Matheny et al., 1994).

Die Regulation der Expression des Egr-1 Gens wurde anhand der beteiligten Signaltransduktionswege als auch anhand des Promotors untersucht. Der Egr-1 Promotor enthält CARG-Boxen, CC(A/T)<sub>6</sub>GG, die die Kernsequenz des Serum-Response-Elements (SRE; Übersicht in Treisman, 1995) darstellen und in deren Nähe sich Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der ETS-Klasse befinden. SREs sind in den Promotoren vieler 'immediate-early' Gene vorhanden. Zwei Moleküle SRF (Serum Response Factor) und ein Ets-Molekül binden kooperativ am SRE und bilden einen ternären Komplex aus, der die transkriptionelle Aktivierung des Zielgens induziert. Im Promotor des fos-Gens von Mensch (Van Straaten et al., 1993) und *Xenopus* (Mohun et al., 1989) ist jeweils ein SRE beschrieben worden, während die regulatorische Region des Egr-1 Gens mehrere SREs enthält, deren Anzahl und Position sich in Maus, Mensch und *Xenopus* unterscheiden (Tsai-Morris et al., 1998, McMahon und Monroe, 1995). McMahon und Monroe (1995) haben in murinen B-Lymphozyten zeigen können, daß bereits die distalen SREs Nr.4 und Nr.5 (zusammen mit benachbarten Ets-Bindungsstellen) für eine maximale Induktion ausreichen. Außer den SREs wurde eine Reihe weiterer Erkennungssequenzen möglicher regulatorischer Elemente (cAMP Response Element, AP1, CREB, SP1, CAAT-Box, TATA-Motiv; Tsai-Morris et al., 1988; Sakamoto et al., 1991) identifiziert.

Der Signaltransduktionsweg, der zur Aktivierung des Egr-1 Gens führt, verläuft über eine Kaskade von Proteinkinasen der MAP Kinase Familie (MAPK, mitogen-aktivierte Proteinkinase), die sukzessive durch Phosphorylierung aktiviert werden (Übersicht in Marshall, 1995; Cahill et al., 1996). Ein wichtiges Element dieses Signalwegs ist die MAP Kinase, die transient aktiviert wird und deren Regulation durch Protein-Kinasen und Protein-Phosphatasen erfolgt (Guan, 1994; Clarke, 1994). Die Aktivierung des Signalwegs resultiert in einer Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren durch die terminale Kinase dieser Kaskade.

Extrazelluläre Stimuli aktivieren membranständige Rezeptor-Tyrosinkinasen. Die Weiterleitung des Signals erfolgt u.a. über das G-Protein Ras und die Serin/Threonin-Kinase Raf (Avruch et al., 1994). Durch weitere (MAP-) Kinasen wird eine MAP Kinase (z.B. ERK) aktiviert, die nach Translokation in den Zellkern nukleäre Proteine wie Transkriptionsfaktoren (z.B. Elk-1) phosphorylieren kann. Die Bindung von Transkriptionsfaktoren wie SRF und Elk-1 an den Promotor (siehe oben) resultiert in der Rekrutierung der basalen Transkriptionsmaschinerie und der transkriptionellen Aktivierung des Zielgens. Die MAP Kinase-Kaskade ist an der Antwort auf zahlreiche Stimuli beteiligt und in allen bisher untersuchten Eukaryoten konserviert.

Die Egr-1 Expression stellt eine frühe Antwort auf Wachstumsfaktoren und Differenzierungssignale dar und ist an der Regulation sehr verschiedener Gene beteiligt. Durch Aufklärung der 9 bp langen DNA-Zielsequenz des Egr-1 Zinkfinger-Tripletts (GCG GGG GCG) konnte gezeigt werden, daß die Promotorregionen zahlreicher Gene putative Egr-1 Bindungsstellen enthalten. In diesem Zusammenhang sind auch überlappende Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Egr-1 und SP1 dokumentiert worden, wobei SP1 an eine unter-schiedliche, aber dennoch ähnliche GC-reiche DNA-Sequenz (GGG GCG GGG) binden kann. Nachfolgend sind einige Gene und Zellsysteme aufgeführt, für die eine Egr-1 Bindung an den Promotor bzw. eine Beteiligung von Egr-1 an der Regulation beschrieben worden ist: Thymidin Kinase (TK, Crozat et al., 1995), Adenosin Deaminase (ADA; Ackerman et al., 1991), Prohormon Convertase 2 (PC2; Jansen et al., 1997), 'Platelet derived Growth Factor'  $\alpha$  und  $\beta$  (PDGF- $\alpha$ , - $\beta$ ; Khachigian et al., 1995,1996), 'Transforming Growth Factor  $\beta$ ' (TGF- $\beta$ ; Liu et al., 1996a,b), 'basic Fibroblast Growth Factor' (bFGF; Biesiada et al.,1996; Wang et al., 1997a), 'Tissue Factor' (Mackman, 1995),  $\alpha$ -Myosin schwere Kette (Gupta et al., 1991), Interleukin 2 (IL-2; Sherka et al., 1995), CD19 (Riva et al., 1997), Apoptose durch Transaktivierung des p53 Proteins (Liu et al., 1998; Nair et al., 1997), myeloische Differenzierung (Nguyen et al., 1993; Krishnaraju et al., 1995), Differenzierung von Astrozyten (Hu und Levin, 1994) und Differenzierung von Schwannschen Zellen (Topilko et al., 1997).

Im Gegensatz zu Egr-2/Krox-20 (siehe Kapitel 1.4.2) ist eine Beteiligung von Egr-1 an Entwicklungsprozessen während der frühen Embryogenese nicht bekannt. Analysen transgener Mäuse zeigten, daß homozygote Egr<sup>-/-</sup> Tiere ein reduziertes Körpergewicht aufwiesen, steril waren und einen Hormondefekt hatten (Topilko et al.,1997); die Ergebnisse unterschiedlicher Gruppen weichen dabei zum Teil voneinander ab (vergleiche mit Lee et al., 1995; Lee et al., 1996a,b; siehe Kapitel 4.5). Die von Nyugen et al. (1993) postulierte essentielle Funktion von Egr-1 im Rahmen der Makrophagen-Differenzierung konnte nicht bestätigt werden. Es besteht daher die Möglichkeit, daß Egr-1 in der Embryonalentwicklung von Mäusen keine essentielle Funktion besitzt oder durch verwandte Proteine der EGR-Familie, die an die gleiche DNA-Zielsequenz binden können, funktionell ersetzt werden kann.



## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Zinkfinger-Proteine der EGR-Familie von Transkriptionsfaktoren waren zum Teil in zahlreichen Untersuchungen zur Struktur, Regulation und zur Funktion gut charakterisiert worden, wobei die funktionellen Daten meist auf Zellkultur-Experimenten oder adulten Tiermodellen basierten. Weitgehend unbekannt dagegen war, inwieweit EGR-Proteine auch an der ganz frühen Vertebratenentwicklung beteiligt sind. Das Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob in *Xenopus laevis* neben dem von Bradely et al. (1992) beschriebenen Krox20/Egr2-Gen weitere Mitglieder der EGR-Familie existieren. Im Anschluß an eine Isolierung entsprechender Gene sollte anhand der Expression in frühen *Xenopus* Embryonalstadien analysiert werden, ob diese ubiquitär oder entwicklungspezifisch exprimiert werden. Im Falle der letzteren Möglichkeit sollten zur weiteren Charakterisierung räumlich-zeitliche Expressionsanalysen und Experimente zur Funktion oder Regulation durchgeführt werden.

## 2. Material und Methoden

Die meisten in dieser Arbeit aufgeführten Methoden waren aus „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“ (Sambrook et al., 1989) entnommen oder waren laboreigene Protokolle.

### 2.1 DNA-Techniken

#### 2.1.1 Standardlösungen und Puffer

Alle Lösungen wurden mit Wasser aus einer Bidest-Anlage angesetzt, gegebenenfalls wurde der pH eingestellt, und je nach Verwendungszweck wurden die Lösungen anschließend sterilisiert. Lösungen und Nährmedien wurden durch Autoklavieren für 20 min bei 121°C sterilisiert. Bestand die Gefahr der Bildung unlöslicher Präzipitate, wurden die betreffenden Komponenten getrennt autoklaviert. Hitzelabile Substanzen wurden über Membranfilter (0.2 µm Porengröße, Sartorius) sterilfiltriert, ebenso wurde bei Glukose und Maltose verfahren. Vor jeder Benutzung wurde die Reinheit der Lösungen optisch kontrolliert.

**Tris/HCl-Puffer 7.5 oder 9.5:** 1M Tris/HCl, pH 7.5 bzw. 9.5

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

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

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

**SSPE (20×):** 3 M NaCl, 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 20 mM EDTA, pH 7.4

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

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

**LiCl-Lösung:** 4 M LiCl

**NaCl-Lösung:** 5 M NaCl

**KCl-Lösung:** 1 M KCl

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

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

**Natrium<sub>2</sub>-Phosphat-Lösung:** 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O

**Ethidiumbromid-Lösung:** 10 mg/ml Ethidiumbromid; 1:20.000 im Agarose-Gel

**Ficoll:** 10% Ficoll, sterilfiltrieren

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

**Maltose-Lösung:** 20% Maltose · H<sub>2</sub>O, sterilfiltrieren, Anwendung: 10 ml/l (0.2%) in Nährlösung

**SDS-Lösung:** 10% Natrium-Dodecylsulfat

**Tween-20-Lösung:** 20% Tween-20

**Denhardt's (100 ×):** 2% BSA, 2% PVP, 2% Ficoll 400

**CHAPS (10%):** 10% CHAPS

### 2.1.2 Nährmedien und Antibiotika

**Luria-Bertani (LB)-Medium:** 1% Bacto-Trypton (DIFCO), 0.5% Hefeextrakt (DIFCO), 1% NaCl, pH 7.5; festes LB-Medium enthielt einen Zusatz von 1.5% (w/v) Agar (DIFCO). Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50°C konnten den Medien Antibiotika aus sterilen Stammlösungen zur selektiven Anzucht zugegeben werden. Für LB-Mg<sup>2+</sup>/Maltose Lösung wurden diese Komponenten dem Medium vor der Inokulation aus sterilen Vorratslösungen zugegeben.

**NZY-Medium:** 1% NZ-Amin (Casein Hydrolysat), 0.5% Hefeextrakt (DIFCO), 0.5% NaCl, 8.1 mM MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, pH 7.5; festes NZY-Medium enthielt einen Zusatz von 1.5% (w/v) Agar (DIFCO). Für Top-Agar wurde 0.7% (w/v) Agar zugesetzt.

**Ampicillin:** 100 mg/ml Ampicillin, Anwendung: ad 75 µg/ml

**Tetracyclin:** 5 mg/ml Tetracyclin in Ethanol (100%), Anwendung: ad 12.5 µg/ml

**Kanamycin:** 10 mg/ml Kanamycin, Anwendung: ad 50 µg/ml

**Penicillin/Streptomycin (Sigma):** 10000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin, Verdünnung ad 1:1000

### 2.1.3 Bakterien-Flüssigkulturen und Stammkulturen

Die aeroben Anzuchten erfolgten in 12-ml-PPN-Röhrchen oder in Erlenmeyerkolben aus Duranglas bis 2000-ml Volumen (Schott), die mit 10-15% des Nennvolumens mit Nährmedium gefüllt wurden. Für Vorkulturen wurden jeweils Stammkulturen reaktiviert. In 12 ml PPN-Röhrchen wurden 5 ml des entsprechenden Stammanzuchtmediums mit einer Kolonie einer Stammkultur inokuliert. 100 µl der Vorkultur dienten als Inokulum der Hauptkultur. Die Inkubation aller Kulturen erfolgte bei 37°C und 240 Upm in einem Rundschüttelinkubator (New Brunswick Scientific). Die Stämme XL1-Blue-MRF' und XL0LR wurden für alle laufenden Arbeiten im Abstand von 6-10 Tagen in entsprechende Flüssigkulturen überimpft und frisch angezogen.

Zur Stammhaltung wurden die Stämme in Flüssigmedium kultiviert und nach Wachstum über Nacht mit 1 Volumen 90% Glycerol (v/v) versetzt und bei -70°C eingefroren. Die Bakterienstämme wurden aus Stammkulturen auf entsprechende Agarplatten ausplattiert und eine Kolonie hiervon zum Animpfen einer Flüssigkultur verwandt.

### 2.1.4 Anzucht elektrokompetenter Bakterienzellen

Zunächst wurde der gewünschte Bakterienstamm auf LB-Agarplatten ausgestrichen (z.B. *E. coli* XL1-Blue mit 12.5 µg/ml Tetracyclin) und bei 37°C inkubiert, bis die Kolonien einen Durchmesser von 0.5-1 mm hatten. Ein 1000 ml Erlenmeyerkolben mit 250 ml Nährlösung wurde mit ca. 5 Kolonien beimpft, bei 37°C mit 200 Upm bis OD<sub>600</sub> von 0.8-1.0 (mid log-Phase) inkubiert und anschließend in einem Eisbad gekühlt. Die Zellen wurden bei 4°C für 10 min in einer Sorvall CL6B-Kühlzentrifuge pelletiert (GSA-Rotor; 7000 Upm) und mit vorgekühlten Puffern gewaschen. Bei den sequentiellen Waschschrritten wurden die Zellen jeweils vollständig resuspendiert: 1× 1 Vol. 10% (v/v) Glycerin in dH<sub>2</sub>O, 1× 1 Vol. 10% (v/v) Glycerin in dH<sub>2</sub>O, 1× 1/20 Vol. 10% (v/v) Glycerin in dH<sub>2</sub>O. Das Zellpellet wurde in 1/500 bis 1/1000 Volumen der ursprünglichen Zellsuspension in 10% (v/v) Glycerin in dH<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Zellen wurden in 1.5 ml Eppendorfreaktionsgefäße à 40 µl aliquotiert, in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -70°C gelagert.

### 2.1.5 Elektrotransformation von *E. coli* Bakterien

Zur Transformation wurde das „*E. coli* Pulser“ Elektroporationsgerät der Firma Biorad verwendet. Alle Schritte wurden bis zur Pulsgabe auf Eis durchgeführt. Dazu wurde die Zellsuspension und DNA-Lösung bei RT aufgetaut, dann auf Eis gekühlt. Zu den 40 µl Zellen in einem 1.5 ml Eppendorfreaktionsgefäß wurde 1 µl des Ligationsansatzes (ca. 10 ng DNA) gegeben und gut vermischt. Der Transformationsansatz wurde in die Elektroporationsküvette (d = 0.1 cm) an die Aluminiumelektrode pipettiert und möglichst vollständig auf den Küvettenboden geklopft. Die Pulsgabe wurde mit 1.8 kV (parallel zur Probe; 25 µF) ausgeführt und ergab bei Pulszeiten von 3.9-4.5 msec gute Ergebnisse. Nach der Pulsgabe wurden sofort 0.5 ml LB-Medium in die Küvette pipettiert, mit der Suspension gemischt und verschiedene Volumina mittels steriler Glaskugeln auf Selektiv-LB-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden invers über Nacht bei 37°C inkubiert. Konnte zur Insertkontrolle eine Blau/Weiß-Selektion ( $\alpha$ -Komplementation) durchgeführt werden, so wurden vor dem Ausplattieren der Zellen 40 µl IPTG-Lösung und 40 µl X-Gal-Lösung aufgebracht.

**IPTG (Isopropylthiogalaktosid):** 100 mM IPTG in dH<sub>2</sub>O.

**X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosidase):** 20 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid

### 2.1.6 Restriktionsenzymatische Spaltung

Zu analytischen Zwecken wurden 200 ng Plasmid-DNA in einem 20 µl Ansatz für eine Stunde mit  $\geq 2$  U Enzym verdaut. Die Gesamt-Enzymmenge im Ansatz sollte 10% des Volumens nicht übersteigen, um unspezifische Restriktion durch die Enzyme ('star'-Aktivität) zu vermeiden. Der Ansatz enthielt 1/10 Volumen des entsprechenden 10 $\times$  Restriktionspuffers. Die Hälfte des Ansatzes wurde in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Zu präparativen Zwecken (zur Isolierung eines Inserts, als 'Template' für *in vitro* Synthese von RNA) wurden 10 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl über Nacht mit 30 U Restriktionsenzym verdaut. Ein Aliquot wurde zur Kontrolle auf ein Gel aufgetragen. Der Rest wurde je nach Versuch auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen oder direkt aufgereinigt.

### 2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die analytische und präparative Elektrophorese von DNA wurde in horizontalen Elektrophoresekammern (hauseigene Werkstatt) durchgeführt. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente lagen die eingesetzten Agarosekonzentrationen zwischen 0.6 und 2.5% (w/v) in 1 $\times$  TBE-Puffer mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid (= Elektrodenpuffer). Nach Zugabe einer Farbstoff-Schwerelösung zur aufzutrennenden DNA wurden die Elektrophoresen bei 80-150 V (konstant) durchgeführt.

Anschließend wurden die DNA-Banden mittels eines UV-Transilluminators (Herolab) sichtbar gemacht und anhand eines Videodokumentationssystems (EASY View) dokumentiert. Zur Größenbestimmung unbekannter DNA-Fragmente diente als DNA-Größenstandard 'One-kb-Ladder' (Gibco/BRL).

**Farbstoff-Schwerelösung:** 10 mM Tris/HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, 0.025% Bromphenolblau, 0.025% Xylenzanol, 30% Vol. Glycerin

**'One kb Ladder':** 0.5 Boehringer Puffer H (10 $\times$ ), 0.4  $\times$  TE, 50 ng/µl „One kb Ladder“ (1 µg/µl), 50% Vol. Farbstoff-Schwerelösung

### 2.1.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde sowohl zu analytischen wie zu präparativen Zwecken eingesetzt. Als 'Template' wurden isolierte Plasmid-DNA, als auch Bakterienkolonien oder Aliquots von Bakterien- und Phagen-Flüssigkulturen eingesetzt. Bei jedem Versuch wurden eine Positivkontrolle (PCR-Produkt bekannter Größe) und eine Negativkontrolle (dH<sub>2</sub>O anstelle der 'Template'-DNA) durchgeführt. Ein PCR-Ansatz enthielt folgende Komponenten:

10 × Polymerase Puffer	1/10 Vol.
dNTPs	je 0.2 mM
Oligonukleotid 1	0.15 bis 1.5 µM
Oligonukleotid 2	0.15 bis 1.5 µM
'Template'-DNA	bis 10 ng
DNA-abhängige DNA-Polymerase (Perkin Elmer, 5 U/µl)	0.5 - 1 U/20 µl

Spezifische Primer wurden in einer Endkonzentration von 0.15 µM eingesetzt, während degenerierte Primer in einer der Degeneration entsprechend höheren Konzentration eingesetzt wurden, höchstens jedoch in einer Endkonzentration von 1.5 µM. Sollte mit einem spezifischen Vektor-Primer und einem anderen Insert-Primer ein DNA-Stück aus einem Phagengemisch amplifiziert werden, so wurde auch der spezifische Primer in einer Endkonzentration von 1.5 µM zugegeben. Das Volumen der Ansätze variierte zwischen 20 µl und 80 µl Gesamtvolumen.

Alle PCR-Ansätze wurden mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet, um Verdunstungen während der Temperaturzyklen zu verhindern. Es wurden folgende Thermocycler benutzt: „Uno“, „Trio“ (beide Biometra) und Crocodile II (Appligene). Für den „Trio“-Thermoblock und das „Crocodile“ wurden 0.5 ml Eppendorf-Gefäße verwandt. Für den „Uno“-Thermoblock wurden Platten mit 96 konischen Vertiefungen der Firma Costar verwandt. Zur Vermeidung von Verdunstung und Kontamination wurden diese Platten während der Reaktionen mit einer selbstklebenden Kunststoff-Folie abgedeckt.

Zyklenzahl und Dauer der einzelnen Temperaturschritte wurden den Versuchen entsprechend variiert. Für die Dauer der Extension galt die Richtlinie von einer Minute pro kb. Ein Standardprogramm mit 35 Zyklen sah wie folgt aus:

<u>Denaturieren</u>	1x	2 min	95°C
Denaturieren	35x	[1 min	95°C
'Annealing'		1 min	56°C
<u>Polymerisieren</u>		1 min	72°C ]
Extension	1x	3 min	72°C

**Nukleotid-Mix (dNTPs; Biomol, Hamburg):** dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 100 mM, wurden in gleichen Volumina vereinigt zu einer Endkonzentration von je 25 mM.

*Analytische PCR-Ansätze* enthielten gewöhnlich 22.5 µl Gesamtvolumen. Ein Ansatz enthielt: 2.25 µl 10× PCR Puffer (Perkin Elmer), 'Forward' und 'Reverse' Primer Lösung aus 15 µM oder 50 µM Stammlösungen. Nach Zugabe von DNA-'Template' und Taq-Polymerase wurde dH<sub>2</sub>O zu einem Gesamtvolumen von 22.5 µl addiert, gemischt und mit Mineralöl überschichtet. Nach der PCR-Reaktion wurde dem Ansatz 0.5 Volumen Farbstoff-Schwerelösung zugegeben und das halbe PCR-Volumen gelelektrophoretisch analysiert.

*Präparative PCR* wurde in einem Volumen von 80 µl durchgeführt. Als ‘Template’ wurden 1-10 ng DNA eingesetzt. Nach der PCR-Reaktion wurden 2-5 µl des Ansatzes zur Kontrolle über ein Agarosegel aufgetrennt. Ergab das PCR-Produkt nach Auftrennung eine einzelne Bande, wurde der Rest über einen Anionenaustauscher von nicht eingebauten Mononukleotiden und Salzen befreit (Nucleotide Removal Kit, Qiagen).

### **2.1.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten**

DNA-Fragmente wurden durch PCR-Reaktion oder durch Restriktionsverdau hergestellt. Es wurden zwei Methoden der Aufreinigung verwendet, um DNA-Fragmente von DNA-Kontamination, Nukleotiden, Enzymen und Salzen zu befreien. Die erwähnten Puffer wurden von der Firma Qiagen mitgeliefert; ihre Zusammensetzung war nicht bekannt.

#### **2.1.9.1 PCR Purification Kit (Qiagen)**

Präparative PCR-Ansätze, die sich in der Gelelektrophorese als frei von Nebenprodukten erwiesen, wurden über eine Silica-Gel-Membran gereinigt und in dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Hierzu wurde der ölfreie Unterstand des Ansatzes in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit dH<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt. 5 Volumen (500 µl) Puffer PB wurden zugefügt, gemischt und die Mischung auf die Säule aufgebracht. Nach Zentrifugation für 1 min bei 14.000 Upm wurde mit 750 µl Puffer PE gewaschen und ebenso zentrifugiert. Die Säule wurde in ein steriles 1.5 ml Eppendorfgefäß überführt und zweimal mit je 15 µl dH<sub>2</sub>O für 1 min bei 14.000 Upm eluiert. 2-3 µl des Eluats wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, um die Konzentration des PCR-Produkts für eine Ligation oder Sequenzierung abschätzen zu können.

#### **2.1.9.2 Nucleotide Removal Kit (Qiagen)**

Durch Restriktionsverdau linearisierte Plasmide wurden mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen) über eine Silica-Gel-Membran aufgereinigt. Zum Ansatz wurden 10 Volumen Puffer PN gegeben, gemischt, die Mischung auf eine QIAquick Säule gegeben und für 1 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Es wurde 1× mit 750 µl Puffer PE gewaschen, erneut zentrifugiert und mit dH<sub>2</sub>O in ein steriles 1.5 ml Eppendorfgefäß eluiert.

#### **2.1.9.3 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen**

DNA-Fragmente wurden präparativ nach Restriktions- und Phosphatasebehandlung und elektrophoretischer Auftrennung aus Agarose-Gelen isoliert. Auf einem UV-Transilluminator mit 366 nm Wellenlänge wurden die gewünschten DNA-Fragmente mit einem sterilen Skalpell herausgeschnitten und mittels des QIAex Kits (Qiagen) extrahiert. Dazu wurden die ausgeschnittenen Gelstücke mit dem dreifachen Volumen des Puffers QX1 versetzt und bei 50°C für 10 min unter mehrmaligem Schütteln gelöst. Der Ansatz wurde auf eine QIAquick Säule gegeben, 1 min zentrifugiert und jeweils mit 500 µl QX1 bzw. PE-Puffer gewaschen. Abschließend wurde die DNA mit 50 µl dH<sub>2</sub>O eluiert.

### 2.1.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA und RNA wurde in einem Spektralphotometer bei 260 nm gegen einen Leerwert bestimmt. Gemessen wurden 1:50-Verdünnungen der Lösungen. Es gelten folgende Beziehungen: **DNA:** 1 OD<sub>260</sub> entsprechen 50 µg/ml dsDNA bzw. 1 OD<sub>260</sub> entsprechen 33 µg/ml Oligonukleotid; **RNA:** 1 OD<sub>260</sub> entsprechen 40 µg/ml.

Als Maß für die Qualität der DNA (Proteinkontamination) wurde die jeweilige OD bei 280 nm bestimmt und der Quotient aus OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> berechnet. Für proteinfreie DNA gilt: OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> = 1.8:1. Die Konzentration sehr kleiner Mengen oder Volumina wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung durch Vergleich mit DNA-Standards bekannter Konzentration abgeschätzt.

### 2.1.11 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine Rezirkularisierung von Vektoren, bei denen durch Restriktionsverdau mit nur einem Enzym oder durch Doppelverdau kompatible Enden entstehen konnten, zu vermeiden, wurden diese an ihren 5'-Enden dephosphoryliert. Durch Zugabe von 2 U Kälber-Intestinal-Phosphatase (CIP, Boehringer) und 1/10 10× CIP-Puffer behandelte Vektoren konnten in der folgenden Ligation nicht mit sich selbst ligieren. Dadurch konnte bei nachfolgender Selektion auf den entsprechenden Medien der Hintergrund an Klonen mit Vektoren ohne Insert reduziert werden. Einfach verdaute Vektoren wurden aufgereinigt, zweifach verdaute Vektoren wurden anschließend gelelektrophoretisch von dem herausgeschnittenem Fragment gereinigt und aus dem Agarose-Gel isoliert.

**CIP-Puffer (10×, Boehringer):** 100 mM Tris/HCl (pH 8.3), 10 mM ZnCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>

### 2.1.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten und Plasmid-Vektoren wurde die Vektor-DNA zuvor dephosphoryliert (2.7.7). Die Mengenverhältnisse von Vektor zu Insert wurde wie folgt gewählt: Bei gleicher Länge von Vektor und Insert (≅ 3 kb) wurde ein molares Verhältnis von 1:1 angestrebt. Je kürzer das Insertionsfragment, desto höher sollte sein Überschub im Ligationsansatz sein. Für ein 1 kb Fragment wurde ein etwa eineinhalbfacher molarer Überschub gewählt. Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10 µl bei 18°C über Nacht oder bei Raumtemperatur für mindestens 2 h.

**Ligationsansatz:** x µl Vektor-DNA, y µl Insert-DNA, 1 µl Ligationspuffer (10 x), 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl), dH<sub>2</sub>O ad 10 µl.

**Ligationspuffer (10×):** 660 mM Tris/HCl, 50m M MgCl<sub>2</sub>, 10m M DTE, 10m M ATP; pH 7.5

### 2.2.13 Detektion positiver Bakterienklone

Zur Detektion von Bakterienkolonien, die das gesuchte Ligationsprodukt in sich trugen, wurden zwei Methoden angewandt. Entweder wurde eine PCR direkt von der Bakterienkolonie ('Colony-PCR') bzw. von einem Aliquot einer Flüssigkultur durchgeführt, oder es wurde eine Isolation der Plasmide im analytischen Maßstab (TELT-Plasmidpräparation) mit anschließender restriktionsenzymatischer Analyse der Plasmid-DNA durchgeführt. Für die PCR-Analysen wurden die Primer so gewählt, daß entweder ein im Insertionsfragment positionierter Primer und ein Vektor-spezifischer Primer ein DNA-Fragment bestimmter Länge amplifizierten oder daß zwei Vektor-spezifische Primer über das gesamte Insertions-

fragment hinaus ein Produkt ergaben. Wurden eindeutige Ergebnisse erzielt, konnte direkt eine Flüssigkultur im präparativen Maßstab angezogen werden.

*Kolonie-PCR* wurde in 22.5 µl Ansätzen durchgeführt. Alle Komponenten exklusive der DNA wurden in einem PCR-Gefäß vorgelegt. Mit einem sterilen Zahnstocher oder einer sterilen Pipettenspitze wurde von einer vereinzelter Kolonie ein Teil abgenommen und die Spitze 2-3mal in den PCR-Ansatz getaucht. Die Spitze wurde dann zum Animpfen einer 5 ml Kultur in ein 12 ml PPN-Röhrchen (Greiner) mit entsprechendem Antibiotikum-Kulturmedium gegeben. Der PCR-Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet und die PCR gestartet. In eine Kultur-PCR wurden 2.5 µl einer 5 ml Über-Nacht Bakterienkultur in einem Gesamt-PCR-Volumen von 22.5 µl eingesetzt.

#### **2.1.14 Subklonieren von PCR-Produkten**

PCR-Produkte konnten nach Aufreinigung mittels des PCR Purification Kits (Qiagen) direkt, aber ungerichtet in den Vektor pGEM-T (Promega) kloniert werden. pGEM-T stellt eine modifizierte Form des Vektors pGEM-5Zf(+) dar und eignet sich zum ungerichteten Klonieren von PCR-Produkten. Diese tragen zu etwa 50% 3'-überhängende Adenine, die von der DNA-Polymerase angefügt werden. Der Vektor ist im Polylinker mit dem Enzym EcoRV linearisiert, und die entstandenen stumpfen Enden sind mit einem 5'-überhängenden Thymidin versehen. PCR-Produkt und Vektor lassen sich durch die so entstandenen, zueinander komplementären Enden, leichter ligieren. Ein pGEM-T Ligationsansatz setzte sich zusammen aus 1 µl Ligase Puffer (10×), 1 µl pGEM-T Vektor (100 ng/ml), x µl PCR-Produkt (in dH<sub>2</sub>O), 1µl T4 DNA-Ligase (Promega), dH<sub>2</sub>O ad 10 µl.

Sollte ein PCR-Produkt gerichtet in Vektoren kloniert werden, wurden die PCR-Primer je um 6-9 Nukleotide an ihren 5'-Enden verlängert, deren Sequenz für Schnittstellen bestimmter Restriktionsendonukleasen kodierten. Das so erhaltenen PCR-Produkt konnte anschließend verdaut und nach Aufreinigung gerichtet in einen entsprechend behandelten Vektor ligiert werden. Ein Ligationsansatz enthielt folgende Komponenten: 1 µl Ligase Puffer (10×, Boehringer), 100 ng Vektor-DNA, x µl PCR-Produkt (in dH<sub>2</sub>O), 1 µl T4 DNA-Ligase (Boehringer), dH<sub>2</sub>O ad 10 ml. Die Ligation wurde über Nacht bei 18°C durchgeführt.

Bei der Auswahl der Restriktionsendonukleasen wurde darauf geachtet, das beide Enzyme spezifisch in Hochsalzpuffer schneiden, um unspezifische ('star')-Aktivitäten zu vermeiden. Nach Amplifikation wurden 60 µl PCR-Ansatz einmal mit Chloroform extrahiert, 7 µl 10× RE-Puffer und je 1.5 µl Restriktionsenzym (10 U/µl) hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 2 h bei 37°C verdaut und wie unter 2.1.12 beschrieben weiterbehandelt.

Bei einem PCR-Produkt, das mit Primern ohne Restriktionsschnittstellen amplifiziert worden war, mußten überhängende Einzelstränge vor der Ligation zu Doppelsträngen aufgefüllt ('blunting') werden. Dieses wurde durch eine Behandlung mit T4-DNA-Polymerase (Boehringer) erreicht. Zu 60 µl PCR-Ansatz wurden 7 µl T4-DNA-Polymerase-Puffer, 0.5 µl einer 40 mM dNTP-Lösung und 2 µl T4-DNA-Polymerase (4 U/µl). Der Ansatz wurde bei 37°C für 30 min inkubiert. Das PCR-Produkt wurde durch Gelelektrophorese gereinigt, extrahiert und in 25 µl TE aufgenommen. Zur Ligation wurde die DNA durch eine T4-Polynukleotid-Kinase (PNK, Boehringer) an den 5'-Enden phosphoryliert. Dazu wurde zur DNA-Lösung 3 µl T4-Kinase-Puffer, 2 µl T4-PNK (10 U/µl) gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach



erneuter Aufreinigung wurde das PCR-Produkt in einem adäquaten Volumen TE resuspendiert und in der Ligation eingesetzt (2.1.12).

**T4-Polynukleotid-Kinase Puffer (10×):** 0.5 M Tris/HCl (pH 7.5), 0.1 M MgCl<sub>2</sub> (1 M), 10 mM DTT (0.2 M), 10 µg BSA (1 mg/ml)

### 2.2.15 Extraktion von Plasmid-DNA

Zur Kontrolle von Insertionsfragmenten und für die primäre Sequenzierung wurden Plasmide im analytischen Maßstab isoliert. Für Sequenzierungen, Restriktionskarten und Präparationen von 'Template'-DNA für die Synthese von RNA-Proben wurden Plasmide aus präparativen Ansätzen eingesetzt.

#### 2.1.15.1 Isolierung von Plasmiden im analytischen Maßstab (TELT)

Zur Kontrolle von Transformanten wurden Plasmide zur anschließenden enzymatischen Analyse wie nachfolgend aus *E. coli* isoliert. In einem 1.5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 1.5 ml Zellsuspension einer 5 ml Über-Nacht-Kultur 5 min bei 6000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und erneut 1.5 ml Zellsuspension zugegeben. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand sorgfältig abgenommen, das Pellet in 300 µl TELT-Puffer resuspendiert und 15 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml) zugegeben. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden Zelltrümmer und Proteine durch Inkubation für 3 min in einem kochenden Wasserbad denaturiert. Danach wurden die Proben für 5 min auf Eis gekühlt und anschließend für 10-15 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Zur verbleibenden Plasmid-Lösung wurden zur Fällung 0.7 Vol. (200 µl) Isopropanol gegeben. Die Plasmide wurden durch Zentrifugieren für 15 min bei 14.000 Upm gefällt, einmal mit 70% Ethanol gewaschen und bei 37°C getrocknet. Anschließend wurde das Plasmidpellet in 40 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert, dem zur vollständigen Entfernung von RNA-Kontaminationen 1 µl einer 1 mg/ml konzentrierten DNase-freien RNase A-Lösung zugegeben wurde. Die so erhaltene Plasmid-DNA konnte für die meisten weiteren Schritte, wie Restriktionsanalysen oder Subklonierungen, ohne weitere Reinigung eingesetzt werden. Für eine Sequenzierung wurden 3-5 µl eingesetzt.

**TELT-Puffer:** 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA (pH 8), 3.2 M LiCl, 0.5% Triton X-100

**Lysozym-Lösung:** 10 mg/ml Lysozym (Muramidase) (Biomol, Hamburg)

#### 2.1.15.2 Isolierung von Plasmiden im präparativen Maßstab (Qiagen)

Die präparative Aufreinigung von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte anhand des Qiagen Plasmid Midi Kits. Diese Methode beruht auf alkalischer Lyse der Zellen mit anschließender Reinigung der Plasmide über einen Anionenaustauscher. Als Startvolumen wurden 50 ml Über-Nacht Flüssigkulturen in LB-Medium verwendet. Die Zellen wurden in 50 ml Falcon-Röhrchen abzentrifugiert (4000 Upm, 15 min, 4°C, Sorvall RC-5B), das Zellpellet in 4 ml Puffer P1 vollständig resuspendiert und nach Zugabe von 4 ml Puffer P2 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 4 ml Puffer P3 zugegeben, einige Male invertiert und bei 10.000 Upm für 20 min in einem SS34 Rotor (4°C) zentrifugiert. Der zelltrümmerfreie Überstand wurde über eine mit 3 ml Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-tip 100 Säule gegeben, anschließend wurde die Säule mit 10 ml Puffer QC gewaschen. Die Plasmide wurden mit 5 ml Puffer QF eluiert und mit 0.7 Vol. Isopropanol (3.5 ml) durch Zentrifugieren (11.000 Upm, 15 min, 4°C) präzipitiert. Das Plasmid-Pellet

wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 100 µl Puffer TE aufgenommen. Zum Lösen der DNA wurde der Ansatz für 5 min auf 65°C erhitzt.

**Puffer P1:** 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0), 0.1 mg/ml RNase A

**Puffer P2:** 200 mM NaOH, 1% SDS

**Puffer P3:** 3 M Kalium-Acetat (pH 5.5)

**Puffer QBT:** 750 mM NaCl, 50 mM MOPS (pH 7.0), 15% Ethanol, 0.15% Triton X-100

**Puffer QC:** 1 M NaCl, 50 mM MOPS (pH 7.0), 15% Ethanol

**Puffer QF:** 1.25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.5), 15% Ethanol

### 2.1.16 Präparation von genomischer DNA (gDNA) aus *Xenopus laevis*

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte mittels eines Extraktionskits (Qiagen) aus Blut von *Xenopus laevis*. Zur Gewinnung von Blut wurde ein Frosch dekapitiert und 5 ml Blut in 10 ml 1% Heparin/0,8% NaCl-Lösung aufgefangen. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation bei 2.000 Upm für 10 min bei 4°C sedimentiert, einmal in 0,8% NaCl gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 Volumen TE100 und 4 Volumen Glycerin (87%) aufgenommen. Die Zellen wurden bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

Für die präparative Aufreinigung von genomischer DNA aus Blut wurden 0,4 ml der eingefrorenen Blutzellen mit 20 ml PBS verdünnt und auf zwei 50 ml Falcon-Röhrchen verteilt. Nach Zugabe von jeweils 10 ml Puffer G1 und 30 ml eiskaltem dH<sub>2</sub>O wurden die Ansätze zur Durchmischung invertiert bis die Suspensionen lichtdurchlässig wurden. Anschließend wurde das lysierte Blut 10 min auf Eis inkubiert, 15 min zentrifugiert (4000 Upm; 4°C) und der Überstand verworfen. Zu den Zellkernsedimenten wurden je 2 ml eiskalter Puffer G1 und 6 ml eiskaltes dH<sub>2</sub>O gegeben, die Sedimente durch Vortexen gelöst und vereinigt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die pelletierten Zellkerne in 10 ml Puffer G2 durch Vortexen auf höchster Stufe für 10-30 sec resuspendiert. Dazu wurden 200 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml, MERCK) gegeben und die Ansätze bei 50°C für 60 min inkubiert. Der Ansatz wurde für 5 sec auf höchster Stufe gevortext und auf eine zuvor mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-tip 500 Säule aufgetragen. Die Säule wurde anschließend mit 20 ml Puffer QC gewaschen und die gebundene DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert. Zur Präzipitation der DNA wurden 0,7 Volumen Isopropanol (10,5 ml) zugesetzt, der Ansatz durch invertieren durchgemischt und bei 10.000 Upm für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70% Ethanol gewaschen, in 200 µl TE aufgenommen und über Nacht bei 55°C gelöst. In der Regel wurden 400-500 µg genomischer DNA isoliert. Die Zusammensetzung der Qiagen-Puffer G1 und G2 waren nicht bekannt.

**TE 100:** 10 mM Tris/HCl (pH 7.5), 100 mM EDTA (pH 8)

### 2.1.17 Isolierung von λ-DNA

Die Aufreinigung von λ-DNA erfolgte mittels des λ-DNA Kits der Firma Qiagen. Das Protokoll basiert auf einer PEG Präzipitation, gefolgt von einer Anionenaustausch-Chromatographie. λ-DNA Flüssigkulturen wurden nach Übernacht-Inkubation mit Chloroform (1 µl/ml) versetzt und zur Abtrennung von Bakterienbestandteilen zentrifugiert. 50 ml Kultur wurden 100 µl Puffer L1 zugesetzt und 30 min bei 37°C geschüttelt. Nach Zugabe von 10 ml eiskaltem Puffer L2 wurde nach vorsichtigem Mischen 60 min auf Eis inkubiert, 10 min mit mindestens 10.000× g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in

3 ml Puffer L3 resuspendiert, nach Zufügen von 3 ml Puffer L4 20 min bei 70°C erhitzt und dann auf 0°C abgekühlt. 3 ml Puffer L5 wurden vorsichtig untergemischt, bevor nach Zentrifugation (15000× g, 30 min, 4°C) der Überstand unverzüglich abgetrennt wurde. Wiederholung der Zentrifugation für 10 min ergab ein klares partikelfreies Lysat, welches auf eine mit 3 ml Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-tip 100 Säule gegeben wurde. Nach dem Waschen der Säule mit 10 ml Puffer QC wurde die  $\lambda$ -DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert und mit 0.7 Vol. Isopropanol durch Zentrifugation (15000× g, 30 min, 4°C) präzipitiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 100  $\mu$ l TE aufgenommen.

**Puffer L1:** 300 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, 0.2 mg/ml BSA, 20 mg/ml RNase A, 6 mg/ml DNase I

**Puffer L2:** 30% Polyethylenglykol (PEG 6000), 3 M NaCl

**Puffer L3:** 100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 25 mM EDTA

**Puffer L4:** 4% SDS

**Puffer L5:** 3 M KAcetat (pH 5.5)

**Puffer P1:** 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0), 0.1 mg/ml RNase A

**Puffer P2:** 200 mM NaOH, 1% SDS

**Puffer P3:** 3 M Kalium-Acetat (pH 5.5)

**Puffer QBT, Puffer QC, Puffer QF:** siehe 2.1.15.2

### 2.1.18 Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Doppelstrang-DNA wurde mit dem Dye-Terminator-Cycle-Sequencing-Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Der Vorgang basiert auf der Didesoxy-Methode von Sanger et al. (1977). In einem einzigen Reaktionsansatz werden die Didesoxyanaloga aller vier dNTPs zugefügt. Die verschiedenen ddNTPs, deren Einbau in die DNA zu einem nukleotidspezifischen Kettenabbruch führt, sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Gleichzeitig wird eine Detektion des Abbruchfragments anhand des 3'-terminalen Nukleotids ermöglicht. Das entstehende Gemisch von DNA-Strängen unterschiedlicher Länge wird über ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die abbruchspezifischen Fluoreszenzsignale werden mittels eines Lasers detektiert und über eine Photozelle einem computergestützten Auswertungsprogramm übermittelt.

Sequenzierreaktionen wurden in 0.5 ml Eppendorf-Gefäßen angesetzt und enthielten 8  $\mu$ l 'Dye Terminator Ready' Mix, 0.5  $\mu$ g dsDNA-'Template', 3.2 pmol Oligonukleotid und dH<sub>2</sub>O ad 20  $\mu$ l. Zur Sequenzierung von PCR-Produkten und anderen kürzeren DNA-Fragmenten wurde eine entsprechend der Fragmentlänge geringere DNA-Menge eingesetzt, so daß die Molarität der 'Template' erhalten blieb.

Die Proben durchliefen im Thermocycler (Perkin Elmer) 25 Zyklen des folgenden Programms: 96°C 30 s, 60°C 15 s, 60°C 4 min. Zur Aufreinigung wurde der ölfreie Unterstand mit 5  $\mu$ l 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 2.5 Vol. Ethanol absolut p.a. versetzt, gemischt und für 15-30 min bei 14.000 Upm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 250  $\mu$ l 70% Ethanol gewaschen, getrocknet, in 3  $\mu$ l Formamid/10 mM EDTA resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt. Kurz vor dem Beladen des Gels wurden die Proben für 2 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung der Produkte der Sequenzreaktion wurde von einem Mitarbeiter des Instituts in einem 7% denaturierenden Polyacrylamidgel durchgeführt.

## 2.1.19 Analyse membrangebundener DNA-Fragmente mit nicht-radioaktiven Sonden ("Southern Blot")

### 2.1.19.1 Darstellung Digoxigenin-markierter Sonden durch PCR

Für die Digoxigenin-Markierung eines Oligonukleotids mittels PCR wurde ein 50 µl-Ansatz folgender Zusammensetzung pipettiert: 5 µl Perkin-Elmer 10× PCR-Puffer, 5 µl 10× 4dNTP-DIG-Mix, je 1 µl Primer P1 bzw. P2 (15 µM Stammlösung), 1 µl DNA (25-50 ng), 36.5 µl H<sub>2</sub>O und 0.5 µl Taq-Polymerase. Für Proben bis 1.5 kb Länge wurden Zyklusparameter mit einem Temperaturprofil von 3 min 95°C, 25-30× [1 min 95°C/ 1 min 58°C/ 1 min 72 °C], 2 min 72°C verwendet. Anschließend wurden die Proben mit dem PCR-Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt, mit 45 µl dH<sub>2</sub>O eluiert und mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. In die Hybridisierung wurde das Äquivalent einer im Gel gut sichtbaren Bande, d.h. ca. 100 ng markiertes PCR-Produkt eingesetzt.

**4dNTP-DIG-Mix (10×):** 2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP, 1.9 mM dTTP, 0.1 mM 11-2'-Digoxigenin-dUTP (Boehringer) in dH<sub>2</sub>O

### 2.1.19.2 Hybridisierung gelelektrophoretisch getrennter DNA

Zunächst wurde die DNA durch Agarose-Gelelektrophorese nach Fragmentgrößen aufgetrennt und die Positionen der zu isolierenden DNA-Fragmente mit Nadelstichen markiert. Dann erfolgte der Transfer der DNA auf eine Nylon-Membran (Qiabrane Nylon Plus) mittels Kapillarblot-Technik in 0.4 N NaOH nach Herstellerangabe. Nach dem Transfer über Nacht wurden die Markierungen auf die Membran übertragen, die Membran in 2× SSC gespült und nach Quervernetzung durch UV-Strahlung (Stratalinker, Stratagene; "Auto-Crosslink") direkt in die Hybridisierung eingesetzt.

Die Prähybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C in einer rotierenden Röhre in einem Hybridisierungs-ofen (Heraeus). Die Digoxigenin-markierte PCR-Sonde wurde 3 min bei 100°C erhitzt, sofort auf Eis gekühlt und nach Austausch des Hybridisierungspuffers zugegeben. Es wurde 4 h bei 62°C in der Röhre hybridisiert. Anschließend wurden die Membranen einmal bei 25°C in 2× SSC/0.1% Tween 20, sowie dreimal bei 62°C in 0.3× SSC/0.1% Tween-20 gewaschen. Als Vorbereitung auf die Antikörperreaktion erfolgten jeweils zwei Waschschrte á 10 min (25°C) in 1× PBS bzw. 1× MAB. Zum Blocken wurden die Membranen eingeschweißt in Kunststoffolie in 1× MAB/ 2% BMB für 30 min inkubiert. Nach Austauschen des Puffers wurde der Antikörper zu einer Endkonzentration von 1:5000 zugesetzt. Nach 30 min wurde dreimal 10 min in 1× MAB/ 0.1% Tween-20 gewaschen und 15 min in 1× APB umgepuffert. Die Farbreaktion wurde in Petrischalen durchgeführt, indem die Filter in 10 ml APB/NBT/BCIP-Lösung geschwenkt wurden; eine positive Farbreaktion war nach 15-30 min sehr gut sichtbar.

**Denaturierungslösung:** 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH

**Neutralisierungslösung:** 1.5 M NaCl, 0.5 Tris-HCl (pH 8.0)

**Waschlösung:** 4× SSC

**Hybridisierungspuffer:** 5× SSPE, 5× Denhardt's, 50 mM Phosphatpuffer (pH 7.5), 0.1% Tween 20, 0.1 mg/ml Spermien-DNA

**Puffer für Antikörper-Inkubation:** s. 'whole mount' *in situ* Hybridisierung (2.7)

### 2.1.20 Plaquehybridisierung von $\lambda$ -Phagen-DNA ('Plaque-Lift Screening')

Zur Hybridisierung wurden Phagen in Konzentrationen von  $10^{-3}$  bis  $10^{-8}$  auf je 2 LB-Agarplatten ausplattiert. Dazu wurden 100  $\mu$ l des Bakterienwirtsstammes ( $OD_{600}=1.0$ ) zusammen mit dem entsprechenden Volumen Phagen bei 37°C für 15 min bei leichter Bewegung inkubiert. Vermischt mit auf 50°C vorgewärmtem NZY-Topagar (0.7% Agarose in NZY- oder LB-Medium) wurde die Phagensuspension auf vorgewärmten LB-Agarplatten ausplattiert, 15 min bei 25°C stehengelassen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Hybridisierungsmembranen (Hybond-N, Amersham) wurden für 2 min auf den Topagar gelegt und mit einer Kanüle zur Orientierung durchstochen. Im Anschluß wurden die Membranen für jeweils 2 min in der entsprechenden Lösung denaturiert, neutralisiert und gewaschen, bevor sie noch leicht feucht ('semidry') in einem Stratalinker (Stratgene) UV-quervernetzt wurden. Die Hybridisierung wurde wie in Abschnitt 2.1.19.2 beschrieben durchgeführt. Positive Einzelplaques konnten mittels einer sterilen Pasteurpipette isoliert werden.

### 2.1.21 Sequenzspezifische Mutagenese

Um ein Xegr-1 Protein zu generieren, das aufgrund eines Aminosäureaustausches nicht mehr durch NAB-Repressorproteine gebunden werden kann, wurde mittels des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratgene) eine sequenzspezifische Punktmutation ( $I_{261}[ATC] \rightarrow F [TTC]$ ) eingeführt.

Ein Plasmid wurde in Anwesenheit zweier Oligonukleotid-Primer, die komplementär zu den entgegengesetzten Strängen des Vektors waren und die entsprechende Mutation enthielten, in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Durch Pfu DNA-Polymerase wurden die mutierten Primer verlängert und resultierten in zirkulären, nicht verknüpften Strängen. Mittels Restriktionsverdau mit Dpn I wurde nur methylierte, nicht mutierte 'Template'-DNA abgebaut, während die synthetisierte, mutierte DNA erhalten blieb. Diese wurde in XL1-Blue *E.coli* transformiert, die über ihren Reparaturmechanismus in der Lage sind, die Strangbrüche in den mutierten Plasmiden zu reparieren.

Die Mutagenese wurde gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt; dabei enthielt der Ansatz 50 ng pCS2+NLS/Xegr1-ORF Plasmid, je 125 ng Oligonukleotid (F1(I261F), R1(I261F)) und wurde mit einer Zyklenzahl von  $n=16$  amplifiziert. Die Mutation im resultierenden Plasmid (pCS2+NLS/ I261F) wurde durch Sequenzierung überprüft.

## 2.2 RNA-Techniken

Um eventuell kontaminierende RNasen zu inaktivieren, wurden Gefäße und Lösungen möglichst autoklaviert (30 min, 121°C). Hitzelabile Substanzen wurden in fester Form in DEPC-Wasser eingewogen. Geräte, die nicht autoklaviert werden durften, wurden in 0,5 N NaOH für 2 h inkubiert und anschließend mit DEPC-dH<sub>2</sub>O gründlich gespült. Bei allen Arbeiten wurden Einmalhandschuhe getragen.

**DEPC-dH<sub>2</sub>O:** 0.1% Diethylpyrocarbonat in dH<sub>2</sub>O; Inkubation für 4-12 h bei 37°C und für 30 min bei 121°C autoklavieren

## 2.2.1 RNA-Isolierung aus *Xenopus*

### 2.2.1.1 Embryonalstadien

Zur Extraktion von Gesamt-RNA aus *Xenopus* Embryonen (10 Stück je Stadium) wurden zunächst 0.4 ml Extraktionspuffer in einem 1.5-ml-Eppendorfreaktionsgefäß auf 45°C in einem Thermoblock erwärmt. Nach Zugabe von 20 µl einer Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) wurde der Ansatz sofort auf die noch gefrorenen Embryonen pipettiert. Mittels einer 1-ml-Einmalspritze wurden die Embryonen mehrmals durch eine G30-Kanüle homogenisiert und die DNA geschert. Der Ansatz wurde bei 45°C für 45 min inkubiert und anschließend phenolextrahiert. Die RNA wurde nach Zugabe von 1/10 Volumen 10 M NH<sub>4</sub>Acetat und 2.5 Volumen 100% Ethanol durch Zentrifugation in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (14.000 Upm, 30 min, RT) pelletiert und in 40 µl DEPC-dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Um für nachfolgende RT-PCR Experimente eine Kontamination durch genomische DNA auszuschließen, wurde die RNA-Lösung mit RNase freier DNase (Boehringer) behandelt. Dazu wurden 5 µl 10× DNase-Puffer, 2 µl 20 mM Dithiothreitol, 1 µl RNasin (40 U/µl, Stratagene), 2 µl RNase freie DNase (20 U/µl) gegeben und die genomische DNA anschließend für 30 min bei 37°C verdaut. Die Lösung wurde Phenol/Chloroform extrahiert und die RNA wie oben sedimentiert. Nach kurzer Trocknung in einer Vakuumzentrifuge (Speed-Vac) wurde die RNA in 25 µl DEPC-dH<sub>2</sub>O aufgenommen, die Konzentration photometrisch bestimmt und mit DEPC-dH<sub>2</sub>O auf 1 µg/µl eingestellt. In der Regel wurden 30-40 µg total RNA isoliert.

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

**NH<sub>4</sub>Acetat (10 M):** 10 M NH<sub>4</sub>Acetat in DEPC-dH<sub>2</sub>O

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

### 2.2.1.2 Adulte Gewebe und Organe

Wenn möglich, wurden Gewebe und Organe nach der Präparation von Hoden zur Spermengewinnung aus *Xenopus* (2.6.2) entnommen, mit 1× MBSH blutfrei gewaschen, in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und in 1.5-ml-Eppendorfreaktionsgefäßen bei -70°C gelagert. Zur Extraktion von RNA wurden die Gewebe oder Organe in flüssigem N<sub>2</sub> tiefgefroren und mittels eines in flüssigem N<sub>2</sub> abgekühlten Mörser pulverisiert. Das Pulver wurden in ebenso vorgekühlte 1.5-ml-Eppendorfreaktionsgefäße in Aliquots à 50 µl Volumen aufgeteilt. Die RNA wurde im weiteren, wie unter 2.2.12 beschrieben, extrahiert.

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

### 2.2.2.1 Semi-quantitative RT-PCR

Die RT-PCR wurde zur Analyse des Expressionsmusters in Embryonalstadien und adulten Organen eingesetzt. Für alle Reaktionen wurde das RT-PCR Kit von Perkin-Elmer verwendet. Um DNA-Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle Pipettierschritte mit filtergestopften Spitzen und Pipetten durchgeführt. Ein Reverse-Transkriptase Ansatz enthielt 2 µl 10× PCR Puffer II, 4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung, je 2 µl dATP-, dCTP-, dGTP-, dTTP-Lösung (je 10 mM), 1 µl RNase-Inhibitor (20 U/µl), 1 µl Random Hexamere (50 µM), 1 µl Reverse Transkriptase (50 U/µl), 1 µl gesamt RNA (= 0.5 µg) und dH<sub>2</sub>O in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Der Ansatz wurde gemischt, mit 50 µl Mineralöl als

Verdunstungsschutz überschichtet und in einem Thermoblock folgendem Temperaturprofil unterworfen: reverse Transkription 20 min 42°C, Denaturierung 5 min 99°C und Abkühlung auf 5°C.

Die anschließende PCR (100 µl) wurde nicht-radioaktiv oder radioaktiv durchgeführt; letztere enthielt zusätzlich 0.25 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (10 µCi/µl; Amersham). Bei den verwendeten Zyklenzahlen *n* (Xegr-1 *n* = 28, Xegr-3 *n* = 28 und Histon H4 *n* = 20) konnte jeweils von einer linearen Amplifizierung der PCR-Produkte ausgegangen werden. Radioaktiv-markierte PCR-Produkte wurden anschließend auf einem 6% Polyacrylamid/Harnstoff-Gel in 1× TBE als Laufpuffer bei 400 V (konstant) für 2 h aufgetrennt, wobei pro RT-PCR 8 µl Ansatz mit 2.5 µl Formamid-TBE-Farbstoff-Mix aufgetragen wurden. Als Marker diente 'One kb ladder', dessen Fragmente mit Polynukleotidkinase (PNK) radioaktiv markiert waren (2.2.2.3). Das Gel wurde nach dem Lauf auf Whatman3M Filterpapier übertragen, unter Vakuum bei 65°C getrocknet, mit Saranfolie umhüllt und über Nacht gegen einen „PhosphorImager-Screen“ (Molecular Dynamics) exponiert. Für nicht-radioaktive RT-PCR wurden in der Regel zwei PCR-Zyklen mehr eingesetzt, um die niedrigere Sensitivität auszugleichen; die Analyse erfolgte in Agarosegelen.

#### 2.2.2.2 Auftrennung im Polyacrylamid/Harnstoff-Gel

Ein denaturierendes 6% Polyacrylamid/Harnstoffgel wurde zwischen Glasplatten der Maße 27 × 20 cm mit 1 mm Abstand zueinander gegossen und in eine Standard Gelkammer (Werkstatt des Instituts) eingebracht. Vor dem Gießen des Gels wurden beide Glasplatten mit Repell-Silan behandelt. Vor dem Auftragen der Proben erfolgte ein 10 min Vorlauf.

**Formamid-TBE Farbstoff-Mix:** 50% Formamid (100%, deionisiert), 1× TBE, 0.025% Bromphenolblau, 0.025% Xylenzanol

**Repellsilan:** 5% Dimethyldichlorsilan in Chloroform

**6% Polyacrylamid/Harnstoff-Stamm (1×):** 8 M Harnstoff, 5.7% Acrylamid, 0.3% Bisacrylamid in 1× TBE; Deionisieren: Mischbettionenaustauscher (Biorad A6501-X8CD), Filtrieren: 0.45µm. Ansatz für 50 ml Gellösung: 6% AA/Urea (1×), Filtrieren: 0.22 µm; 44 µl TEMED (100%), 180 µl APS (10%)

#### 2.2.2.3 Phosphorylieren von DNA-Längenstandard-Fragmenten

Zur radioaktiven Markierung von „One kb Ladder“-DNA-Fragmenten wurden diese enzymatisch am 5'-Ende mit radioaktivem [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP versehen. Der Ansatz enthielt 1 µl (= 1 µg) 'One kb Ladder', 2 µl 10× T4-PNK (Polynukleotidkinase)-Puffer, 2 µl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP, 1 µl T4-PNK (10 U/µl, New England Biolabs) und dH<sub>2</sub>O in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend mittels des 'Nucleotide Removal Kits' von nicht angefügten Nukleotiden gereinigt. Hierbei wurden die DNA-Fragmente zweimal mit 400 µl Puffer PE gewaschen und in 50 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Das Volumen wurde auf 100 µl mit Formamid/10 mM EDTA aufgefüllt. Mit einem „Quick Counter“ (BIOSCAN/QC200) wurde der Zerfall pro Minute (dpm, disintegrations per minute) bestimmt und so eingestellt, daß pro Spur eine Aktivität von etwa 20.000 dpm aufgetragen wurde.

#### 2.2.3 *In vitro* Synthese von RNA

Für den Nachweis von *in vivo* RNA-Transkripten in der 'whole mount' *in situ* Hybridisierung wurde die 'antisense' RNA-Sonde (in 3'-5' Richtung transkribiert) mit Digoxigenin-rUTP markiert. Sollte 'sense'

RNA (in 5'-3' Richtung transkribiert) als mRNA zur Injektion in *Xenopus* Embryonalstadien verwandt werden, wurde sie am 5'-Terminus mit einem 'RNA Cap' Strukturanalogon (7mG(5')<sub>ppp</sub>(5')G, New England Biolabs) versehen. In beiden Fällen wurden die Lösungen und Enzyme des RNA-Transkriptions-Kits (Stratagene) verwandt.

### 2.2.3.1 Linearisieren der Plasmid-DNA

10 µg Plasmid wurden in 50 µl Gesamtvolumen über Nacht mit einem geeigneten Restriktionsenzym verdaut. Um unspezifische Aktivität der Enzyme zu vermeiden, betrug die Enzymmenge nicht mehr als 30 U. Die DNA wurde anhand des 'Nucleotide Removal Kits' (Qiagen) aufgereinigt und in 50 µl RNase-freiem dH<sub>2</sub>O aufgenommen. 1 µl wurde auf ein Testgel aufgetragen, um die Vollständigkeit von Verdau und Aufreinigung zu kontrollieren.

### 2.2.3.2 *In vitro* Synthese von RNA für *in situ* Hybridisierungen

Die Lösungen und Enzyme des RNA-Transkriptions-Kits (Stratagene) wurden in folgender Reihenfolge zusammenpipettiert: 5 µl 5× Transkriptions-Puffer, je 1 µl 10 mM rATP, rCTP, rGTP, 0.36 µl Digoxigenin-rUTP (Boehringer), 0.64 µl rUTP, 1 µl 0.75 M DTT, 1 µl RNasin (40 U/µl), 1 µg linearisierte DNA-'Template', 1 µl T3- oder T7- oder SP6-RNA-Polymerase (10 U/µl) und RNase-freies dH<sub>2</sub>O zu einem Gesamtvolumen von 25 µl. Der Ansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend die 'Template'-DNA durch Zugabe von 2 µl RNase-freier DNase I (Boehringer) für 15 min bei 37°C verdaut.

### 2.2.3.3 *In vitro* Synthese von 'Cap'-mRNA für Mikroinjektionen

Folgende Komponenten wurden in angegebener Reihenfolge vereinigt: 10 µl 5× Transkriptions-Puffer, 2 µl 0.75 M DTT, 1 µl RNasin (40 U/µl), je 5 µl 10 mM rATP, rCTP, rUTP, 5 µl 1 mM rGTP, 5 µl 10 mM 'm<sup>7</sup>GTP-Cap' [7mG(5')<sub>ppp</sub>(5')G], 2.5 µg linearisierte DNA-'Template', 2 µl RNA-Polymerase (SP6, T7 oder T3; 10 U/µl) und RNase-freies dH<sub>2</sub>O zu einem Gesamtvolumen von 50 µl. Der Ansatz wurde für 2-4 h bei 37°C inkubiert und anschließend die 'Template'-DNA durch Zugabe von 2 µl RNase-freier DNase I (Boehringer) für 30 min bei 37°C verdaut.

### 2.2.3.4 Aufreinigen *in vitro* synthetisierter RNA

Salze und Nukleotide wurden mit dem RNeasy-Kit (Qiagen) abgetrennt. Der Transkriptionsansatz wurde auf 100 µl mit RNase-freiem dH<sub>2</sub>O aufgefüllt. 350 µl Puffer RLT wurden hinzugegeben und vermischt. Anschließend wurden 250 µl Ethanol absolut p.a. zugefügt und mit der Pipette gemischt. Die Mischung wurde auf eine RNeasy-Säule gegeben und bei 10.000 Upm für 15 sec zentrifugiert. Es wurde zweimal mit 500 µl Puffer RPE gewaschen und die RNA zweimal mit 10 µl RNase-freiem dH<sub>2</sub>O in ein steriles, RNase-freies Eppendorfgefäß eluiert. 2 µl wurden in einem frisch gegossenen Agarose-Gel aufgetrennt, um die Transkriptionseffizienz optisch zu ermitteln. Die Zusammensetzung der Qiagen-Puffer war nicht bekannt.

### 2.2.4 RNase-Protektion

RNase-Protektion wurde durchgeführt, um das 5'-Ende der Xegr-1 cDNA zu bestimmen. Eine radioaktiv-markierte 'antisense' RNA-Sonde wurde durch *in vitro* Transkription in Anwesenheit von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP



synthetisiert und gegen polyA<sup>+</sup>RNA hybridisiert. Nach RNase-Verdau wurden die Proben auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Zur Darstellung der radioaktiven Sonden wurden je 2 µl 10 mM Ribonukleotid (rATP, rCTP, rGTP) und 5 µl linearisierte 'Template'-DNA in der Vakuumzentrifuge fast bis zur Trockne eingengt. Es wurden eine radioaktiv-markierte 'antisense'-Probe (pGEM-T/F272\_R+83; 0.2 µg/µl, Sal I linearisiert, 'antisense': T7) und eine nicht markierte 'sense'-Sonde (pGEM-T/ F272\_R+83; 0.2 µg/µl, Apa I linearisiert, 'sense': SP6) hergestellt. Für die Transkription in 10 µl Gesamtvolumen wurden 1 µl 100 µM UTP, 2 µl Transkriptionspuffer, 1 µl DTT, 1 µl RNase-Inhibitor, 1 µl T7 RNA-Polymerase und 4 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP (20 µCi/µl) bzw. dH<sub>2</sub>O zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Der anschließende DNase-Verdau wurde nach Zugabe von 1 µl RNase-freie DNase I (1 µg/µl) 15 min bei 37°C durchgeführt. Die Probe wurde über eine RNeasy-Säule (Abschnitt 2.2.3.4) gereinigt und in 30 µl DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O eluiert.

Zur Hybridisierung wurde die entsprechende Menge RNA (PolyA<sup>+</sup>-, 'sense'- oder Gesamt-RNA) in 0.5 µl PCR-Gefäßen pelletiert, getrocknet und in 24 µl Formamid aufgenommen. Nach Zugabe von 3 µl 10× Hybridisierungspuffer und 3 µl gereinigter, radioaktiv-markierter Riboprobe wurden die Ansätze mit 30 µl Öl überschichtet und 5 min bei 80°C denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 45°C. Der Verdau nicht hybridisierter RNA wurde nach Zugabe von 350 µl RNase-Gebrauchslösung 1h bei RT inkubiert. Nach dem RNase-Verdau wurden die Ansätze 15 min mit 10 µl 20% SDS und 2 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) inkubiert (37°C), Phenol/Chloroform-gereinigt und auf einem 8% Polyacrylamid/Harnstoffgel aufgetrennt. Dabei wurden von den Kontrollen 10.000-20.000 dpm aufgetragen. Das Gel wurde nach dem Trocknen über Nacht auf einem PhosphorImager-Schirm (Molecular Dynamics) exponiert. Da bei der RNase-Protektion nur hybridisierte, doppelsträngige RNA geschützt wird, kann anhand der Größe des resultierenden spezifischen Signals die Länge des protektierten Fragments, d.h. die Position des Transkriptionsstarts bestimmt werden.

**Hybridisierungspuffer (10×):** 4 M NaCl, 400 mM PIPES (pH 6.4), 10 mM EDTA

**RNase-Puffer:** 750 µl 5 M NaCl, 100 µl 0.5 M EDTA (pH 8.0), 100 µl 1 M Tris-Puffer (pH 7.5), dH<sub>2</sub>O ad 10 ml. Gebrauchslösung frisch ansetzen aus 1 ml RNase-Puffer, 4 µl RNase A (2 µg/µl), 0.4 µl RNase T1 (2 µg/µl).

### 2.3 Proteintechniken: *in vitro* Transkription und Translation

Das TNT-Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) eignete sich dazu, von einem Expressionsvektor in einem einzigen Ansatz die Synthese von mRNA (Transkription) und die Umsetzung der RNA-Sequenz in Proteinsequenz (Translation) durchzuführen. Das System wurde zur Kontrolle der Funktion des Expressionsvektors pCS2+MT/XEGR-1 verwandt.

Zu analytischen Zwecken genügte ein halber TNT-Ansatz im Gesamtvolumen von 25 µl. Es wurden folgende Komponenten vereinigt: 12.5 µl TNT Kaninchen Retikulozytenlysate, 1 µl TNT Reaktionspuffer, 0.5 µl (= 5 U) SP6 RNA-Polymerase, 0.5 µl 1 mM Aminosäuregemisch ohne Methionin, 4 µl <sup>35</sup>S-Methionin (1000 Ci/mmol bei 10 µCi/ml), 0.5 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl), 1 µg zyklische Plasmid-DNA ('Template') und RNase-freies dH<sub>2</sub>O zu einem Gesamtvolumen von 25 µl. Der Ansatz wurde gemischt und für 2 h bei 30°C inkubiert. 3 µl des Ansatzes wurden mit 17 µl Protein-Schwerelösung gemischt, für 10 min bei 100°C im Wasserbad denaturiert und bis zum Auftrag auf ein Proteingel auf Eis aufbewahrt. Das

14×16 cm Gel enthielt 12% Acrylamid/ 0.1% SDS. Als Kontrollansatz diente eine mitgelieferte SP6 Kontroll-DNA.

## 2.4 Isolierung von XEGR-Klonen aus cDNA-Banken

Die Durchmusterung von *Xenopus* Phagenbibliotheken nach EGR-homologen Proteinen wurde mit einer nicht-radioaktiven Methode durchgeführt. Fraktionierte cDNA-Bibliotheken wurden mit spezifischen Primern mittels PCR durchgemustert. Fraktionen, die ein positives Signal zeigten, wurden einer seriellen Verdünnungs- und Amplifikations-Prozedur unterworfen, um den Anteil des gesuchten Phagen gegenüber den restlichen im Gemisch anzuheben. Dazu wurde ein Aliquot der in der PCR positiven Phagenfraktion zur Infektion einer frischen Wirtsbakterien-Lösung verwandt und in 64 Mikrotiterplatten-Fraktionen aufgeteilt. (In jeder Amplifikationsrunde wurden parallel verschiedene Phagemengen im Verhältnis von 1:10 zueinander in Titerplatten ausplattiert.) Nach Inkubation und Lyse der Bakterien wurden die Phagenüberstände mittels PCR daraufhin untersucht, ob sie den gesuchten Phagen enthielten. Von positiven Phagenfraktionen wurde anhand einer Verdünnungsreihe der Titer positiver Phagen und die minimale positive Menge bestimmt, die für eine erneute Verdünnungs- und Amplifikationsrunde eingesetzt werden konnte. Nach wiederholten Amplifikationsrunden wurden die Phagen plattiert und durch Plaques-hybridisierung (2.1.20) überprüft. War ein reiner Phagenklon isoliert und amplifiziert worden, konnte mit Hilfe eines Helferphagen zunächst ein Phagemid exzisiert werden, das außer einem definierten Vektoranteil das gesamte cDNA-Insert des Phagen enthielt. Das Phagemid verhielt sich nach Infektion eines zweiten Bakterienstammes wie ein Plasmid.

Zur Isolierung von Xegr-1 wurde eine  $\lambda$ -Zap Express Phagenbibliothek (Stratagene) von T. Hollemann (1995) verwendet. Sie enthielt cDNAs aus *Xenopus laevis* Kopf bzw. Schwanzspitzen (Stadium 28-31). Die RNA war mit 'random' Primern oder mit poly(T)-Primern in cDNA umgeschrieben worden. Die primären Phagen waren in 166 Aliquots von je ca. 50.000 unabhängigen Phagen aliquotiert worden und wiesen jeweils eine Konzentration von ca.  $10^{10}$  pfu/ml (plaque forming units/ml) auf.

Für Xegr-3 wurde eine Uni-Zap-XR Phagenbibliothek, die aus einer *Xenopus laevis* A6 Nierenzelllinie erstellt worden war (Petersen, 1995) verwendet. Es wurden 48 Aliquots mit je ca. 50.000 primären Phagen in einer Konzentration von ca.  $10^8$  pfu/ml getestet.

Die folgenden Abschnitte beschreiben den detaillierten Ablauf des Phagen-'Screenings' zur Isolierung der Xegr-1 cDNA. Die Identifizierung eines Phagenklons der ein Xegr-3 Insert enthält wurde analog durchgeführt.

### 2.4.1 Anreichern eines Kandidaten-Phagen

Mit Hilfe spezifischer Primer wurden PCR-Reaktionen auf Aliquots der Phagen-Fraktionen durchgeführt (22.5  $\mu$ l Ansatz; 3 min 95°C, 40× [45 sec 95°C, 45 sec 56°C, 30 sec 72°C], 2 min 72°C). In der ersten Amplifikationsrunde wurden  $2.5 \cdot 10^7$  und  $2.5 \cdot 10^6$  pfu eines Phagenüberstandes zur Infektion von Bakterien des Stammes *E. coli* XL1-Blue MRF' eingesetzt. Die Bakterien wurden vor der Infektion in einer 50 ml Über-Nacht Kultur frisch angezogen (LB/Tetracyclin/10 mM MgSO<sub>4</sub>/0.2% Maltose), für 10 min bei 4.000

Upm in einem GSA-Rotor pelletiert und in 10 mM MgSO<sub>4</sub> auf OD<sub>600</sub>= 0.5 eingestellt. Zur Infektion der Bakterien wurden in einem 12 ml PPN-Röhrchen 600 µl der Bakterien-Suspension mit dem Phagen-Aliquot vereinigt und für 20 min bei 37°C geschwenkt. Wurde nach mehreren Amplifizierungsrunden eine sehr geringe Phagenmenge (z.B. 2.5·10<sup>3</sup> pfu) für die Infektion von Bakterien verwandt, so wurden entsprechend weniger Wirtsbakterien eingesetzt, um zu vermeiden, daß die Bakterien die Phagen vollständig überwuchsen und eine Lyse der Bakterien unmöglich wurde. Nach Zugabe von 6.4 ml NZY-Medium wurde der Ansatz gemischt und zu je 100 µl auf 8×8 = 64 Vertiefungen einer Titerplatte aufgeteilt. Die Vertiefungen der Platte wurden mit Tesafilm abgeklebt und die Platten über Nacht bei 37°C und 250 Upm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Am Folgetag wurde die Lyse der Bakterien optisch überprüft. Gut sichtbare Zelltrümmer der lysierten Bakterien und ein klarer Phagenüberstand waren ein Hinweis auf optimale Amplifizierung.

Um positive Titerplatten-Fractionen zu finden, wurden PCR-Reaktionen in Vereinigungen („pools“) der Titerplatten-Reihen von je 8 Vertiefungen durchgeführt. Jeweils 2.5 µl der Reihen A(1-8) bis H(1-8) und 1(A-H) bis 8(A-H) wurden vereinigt. Von den 16 erhaltenen Mischfractionen (‘Pools’) wurden je 2.5 µl Phagenlösung in die PCR-Reaktion eingesetzt. Anschließend wurden die zu einem positiven ‘Pool’ gehörenden Einzelfractionen überprüft. Positive Positionen konnten dann durch Überkreuzung positiver horizontaler und vertikaler Pools erkannt werden. Von diesen Positionen wurde der Phagentiter und die minimale positive Menge an Phagenlysat bestimmt. Die Menge des für die Infektion verwandten Phagen-Aliquot war dann optimal gewählt, wenn nur eine der 64 Fractionen den gesuchten Phagen enthielt. Positive Einzelfractionen wurden in 1.5 ml Eppendorfgefäße überführt, zur Konservierung der Phagen mit zwei Tropfen Chloroform überschichtet und bei 4°C aufbewahrt.

Das optimale Phagenvolumen für die nächste Amplifikationsrunde wurde ermittelt, indem eine PCR auf einer Verdünnungsreihe der überführten positiven Fraction durchgeführt wurde. Je 2.5 µl der Verdünnungen 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-9</sup> wurden in analytischen PCR-Reaktionen untersucht. Es wurden diejenigen zwei Phagenmengen anschließend ausplattiert, die oberhalb der kleinsten Menge lagen, die in der PCR noch ein Signal gegeben hatte.

Um frühzeitig Sequenzinformation über den amplifizierte Klon zu erhalten, konnte durch PCR auf einem Phagenaliquot ein Teil des cDNA-Insertionsfragments amplifiziert und sequenziert werden.

#### 2.4.2 Vereinzeln eines Phagen

Nach drei bis fünf Amplifikationsrunden wurde der Anteil des gesuchten Phagen an allen Phagen in der Kultur untersucht, um zu entscheiden, ob ein Ausplattieren und Vereinzeln des gesuchten Phagen sinnvoll war, oder ob eine weitere Amplifikationsrunde nötig wurde. Aus einer Verdünnungsreihe von 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-9</sup> wurden je 2.5 µl für eine quantitative PCR eingesetzt und dieselben Mengen auf NZY-Agarplatten ausplattiert. Die Durchmusterung von Einzelplaques nach dem gesuchten Phagenklon lohnte sich, wenn diejenige Phagenmenge ein positives PCR-Signal ergab, die auf der Agarplatte gerade noch Plaques hervorbrachte.

Das Plattieren von Phagen wurde wie folgt durchgeführt: In 1.5 ml Eppendorf-Gefäßen wurden 600 µl *E. coli* XL1-Blue MRF' (OD<sub>600</sub>= 0.5 in 10 mM MgSO<sub>4</sub>) mit je 2.5 µl der Phagenverdünnungen vereinigt und für 20 min bei 37°C geschwenkt. Die Mischung wurde zu 3 ml NZY-Top Agar gegeben, der vorher auf 48°C äquilibriert wurde. Nach Zugabe des Phagen-Bakterien-Gemisches zum Agar wurde kurz gemischt,

der Inhalt sofort auf vorgewärmte NZY-’bottom’ Agarplatten ( $\varnothing$  9.5 cm) gegeben und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden mit geöffnetem Deckel für 1 h bei RT und anschließend invers über Nacht bei 37°C inkubiert.

Ein Plaque sollte dann etwa 1 mm Durchmesser besitzen und möglichst klar sein. Zur Untersuchung einzelner Phagenklone wurden Plaques mit einer sterilen Glaspipette in je 100  $\mu$ l SM-Puffer überführt und eluiert. Ein Aliquot des Phagen-Überstandes wurde mittels PCR untersucht. Ein positiver Phagenklon wurde mit zwei Tropfen Chloroform versehen und bei 4°C aufbewahrt.

**SM-Puffer:** 10 mM Tris/HCl (pH 7.5), 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 0,01% Gelatine; sterilfiltrieren (0.45 $\mu$ m)

### 2.4.3 Generieren einer hoch konzentrierten Phagenlösung

Für die Exzision eines Phagemids samt cDNA-Insertionsfragment aus einem Phagen wurde eine hohe Konzentration des Phagen (’high titer’) benötigt. Dazu wurden solche Phagemengen plattiert, die ein konfluentes Wachstum der Phagenklone gewährleisteten. Zum Isolieren der Phagen aus dem Agar wurde der Top-Agar einer Platte abgekratzt und mit 2 ml SM-Puffer in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 75  $\mu$ l Chloroform wurde der Ansatz gemischt, mit einer Gilson-Pipette mazeriert und über Nacht bei 4°C eluiert. Die Röhrchen wurden für 10 min bei 10.000 Upm zentrifugiert und der Überstand in 1.5 ml Eppendorfgefäße überführt. Nach Zugabe von Chloroform zu einer Endkonzentration von 0.3% wurde der Phagenüberstand bei 4°C gelagert.

### 2.4.4 *in vivo* Exzision

Für die Exzision des Xegr-1 Klons aus einer  $\lambda$ -Zap Express Phagenbibliothek wurden die *E. coli* Stämme XL1-Blue MRF’ und XL0LR morgens aus einer Über-Nacht-Kultur in entsprechendem Medium neu angezogen; XL0LR wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> = 1 kultiviert. 200  $\mu$ l *E. coli* XL1-Blue-MRF’, OD<sub>600</sub> = 1.0 in 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 250  $\mu$ l des angereicherten Phagen-Lysats und 1  $\mu$ l ExAssist Helferphage wurden für 15 min bei 37°C unter Schwenken inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml LB-Medium wurde die Mischung für 2.5 h bei 37°C geschüttelt. In diesem Stamm wurde ein definierter Bereich des Phagen einzelsträngig amplifiziert, zu einem Phagemid verpackt und aus dem Wirtsbakterium ausgeschleust, ohne dieses zu lysieren. Durch Inkubation für 15 min bei 70°C wurden die Wirtsbakterien selektiv abgetötet. Sie wurden pelletiert (15 min bei 4.000 Upm im Sorvall, SS34 Rotor) und der Überstand, der das pBluescript-Phagemid enthielt, in 12 ml PPN- Röhrchen überführt und bei 4°C gelagert. Mit den Phagemiden wurde der *E. coli* Stamm XL0LR infiziert, in dem sich die Phagemide anschließend wie Plasmide verhielten. Zur Infektion wurden in zwei 1.5 ml Eppendorfgefäßen 200  $\mu$ l *E. coli* XL0LR (frisch, OD<sub>600</sub> = 1) mit 10  $\mu$ l bzw. mit 100  $\mu$ l Phagemid vereinigt. Nach 15 min Schwenken bei 37°C wurden 300  $\mu$ l LB-Medium zugegeben und für weitere 45 min geschwenkt. Je Ansatz wurden zweimal 200  $\mu$ l auf LB/Kanamycin Agarplatten ausplattiert und über Nacht invers bei 37°C inkubiert. Einzelne Klone wurden zum Inokulieren von Flüssigkulturen verwandt. Aus diesen wurde das Plasmid im präparativen Maßstab isoliert.

Die Isolation eines Xegr-3 Klons aus einer Uni-Zap-XR Phagenbibliothek erfolgte unter Verwendung des angereicherten Helferphagen R408 analog wie für Xegr-1 beschrieben. Aus pBluescript-Phagemiden konnten nach Infektion mit dem Bakterienstamm XL1-Blue Plasmidklone isoliert werden.

## 2.5 Isolierung von Klonen aus genomischen $\lambda$ -Phagenbanken

Die Analyse genomischer  $\lambda$ -Phagenbibliotheken wurde wie in Abschnitt 2.4 beschrieben durchgeführt. Es stand eine genomische Lambda FIX II Bibliothek (I. David) zur Verfügung, die 9-23 kb lange Fragmente genomischer *Xenopus laevis* DNA enthielt. Als bakterielle Wirtsstämme zur Durchmusterung und Amplifikation dienten XL1-Blue MRA und die lysogene Form XL1-Blue MRA(P2).

Nach mehreren Titrations- und Amplifikationsrunden konnte ein positiver genomischer Klon isoliert werden. Nach Aufreinigung im präparativen Maßstab (2.1.14) wurde der Klon zum Teil direkt sequenziert. Da das genomische Fragment größer als 12 kb war und auch durch 'Long-Range'-PCR nicht darzustellen war, wurde zur Subklonierung eine Restriktionsspaltung (präparativer Ansatz mit 4  $\mu$ g  $\lambda$ -DNA je Restriktionsenzym) durchgeführt. Anschließend wurde 1/10 des Ansatzes im Agarosegel aufgetrennt und ein Southern Blotting mit einem spezifischen Digoxigenin-markierten PCR-Produkt durchgeführt. Von drei detektierten Banden wurde diejenige mit der stärksten Signalintensität (Hind III-Fragment, ca. 4 kb) in den pGEM-3zf(+) Vektor (Promega) subkloniert. Nach der Sequenzierung des Fragments konnten durch einen Sequenzvergleich mit homologen 5'-flankierenden Sequenzen des Egr-1 Gens potentiell regulatorische Elemente identifiziert werden, die wie in den Abschnitten 2.11 und 2.12 beschrieben, untersucht wurden.

## 2.6 Gewinnen von *Xenopus* Embryonalstadien

### 2.6.1 Versuchstiere

*Xenopus laevis*, der Afrikanische Krallenfrosch, gehört zur Familie der Pipidae, Unterfamilie Xenopinae. Pigmentierte und unpigmentierte Krallenfrösche wurden von Dipl. Ing. Horst Kähler (Hamburg), von den Firmen Xenopus I (USA) und Nasco (USA) sowie von African Xenopus Facility C.C. (Südafrika) erworben. Die Tiere wurden gemäß den Bestimmungen des Tierschutzes gehalten und behandelt. *Xenopus* Embryonalstadien wurden gemäß Nieuwkoop und Faber (1967) bestimmt.

### 2.6.2 Präparation von Testis

Um die Gelege *in vitro* befruchten zu können, wurden vor Beginn der Eiablage Testes von *Xenopus*-Männchen präpariert. Zu diesen Zweck wurde ein Männchen dekapitiert und ventral aufgeschnitten. Die weißlichen, ovalen Hoden wurden entnommen und bis zum Gebrauch in eiskaltem 1 $\times$  MBSH-Puffer gelagert. Bei Bedarf konnten die Testes bis zu 5 Tagen in 1 $\times$  MBSH-Puffer mit 10 U Penicillin/10  $\mu$ g Streptomycin bei 4°C aufbewahrt werden.

**MBSH (1 $\times$ ):** 10 mM HEPES (pH 7.4), 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.82 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.41 CaCl<sub>2</sub>, 0.66 KNO<sub>3</sub>

### 2.6.3 Stimulation der Eiablage

Um die Eiablage für den nächsten Morgen zu stimulieren, wurden einem Weibchen gegen 17 Uhr 50-100 U humanes Gonadotropin (1000 U/ml) (Sigma) und gegen 23 Uhr 400-600 U je nach Größe des Weibchens mittels einer 1 ml Spritze mit G27-Kanüle in den dorsalen Lymphsack injiziert. Zur meistens spontanen Eiablage am nächsten Tag wurden die Weibchen über eine leere Petrischale gehalten.

### 2.6.4 Befruchtung und Entwicklung

Die Gelege wurden mit den Spermien aus den präparierten Hoden befruchtet. Etwa 1/5 eines Testis wurde in 100  $\mu$ l 1 $\times$  MBSH mit einer Mikroschere mazeriert, wodurch die Spermien freigesetzt wurden. Die in 1 $\times$  MBSH inaktiven Spermien wurden unmittelbar vor Gebrauch mit 900  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O vermischt. Durch die Erniedrigung der Ionenkonzentration erlangten die Spermien ihre volle Beweglichkeit. Mit einer abgeschnittenen gelben Pipettenspitze wurden die Spermien dann auf den Gelegen verteilt. Die Gelege wurden so auseinandergezogen, daß die Eier einschichtig lagen und nach zwei Minuten mit 0.1 $\times$  MBSH überschichtet. Eine Stunde nach der Befruchtung wurden die Gelege durch Inkubation für 3-5 min in 2% Cystein (pH 7.8) von ihren Gallerthüllen befreit und anschließend mehrmals mit 0.1 $\times$  MBSH gespült. Die Embryonen wurden auf einer Temperierplatte (hauseigene Werkstatt) bei 14-20°C bis zum gewünschten Stadium (Nieuwkoop und Faber, 1967) inkubiert.

Waren die Embryonen für 'whole mount' *in situ* Färbungen (Abschnitt 2.7) bestimmt, wurden sie in 5 ml Schraubdeckelglasröhrchen (Schütt) auf einem Drehrad für eine Stunde in 1 $\times$  MEMFA fixiert und anschließend in 100% Ethanol bei -20°C gelagert. Stadien vor dem Schlüpfen aus der Vitellinmembran wurden vor dem Fixieren manuell mit Uhrmacherpinzetten von dieser befreit.

**2% Cystein-HCl:** 2% L-Cystein-HCl · H<sub>2</sub>O, pH einstellen (NaOH) auf 7.8

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

**MEMFA (1 $\times$ ):** 1 $\times$  MEM, 3.7% Formaldehyd-Lösung (37%)

### 2.6.5 Behandlung von Embryonen mit UV und LiCl

Zur Untersuchung der Genexpression wurden mittels UV-Strahlung bzw. Lithium-Ionen embryonale Phänotypen erzeugt, die aufgrund der Beeinträchtigung der Bildung der Keimblätter und Körperachse einen entsprechend veränderten Körperbauplan aufwiesen.

Embryonen wurden ventralisiert, indem ihr vegetaler Pol im Zeitraum vor der ersten Zellteilung (30-40 min nach Befruchtung) für 90 sec mit UV-Licht bestrahlt wurde (ca. 8 mw/cm<sup>2</sup>). Die Durchführung erfolgte in 0.1 $\times$  MBSH in „petriperm“-Schalen (Heraeus) mit UV-durchlässiger Membran. Für dorsalisierte Phänotypen wurden frühe Blastula-Stadien (64-128-Zell-Stadium) für zehn Minuten in 0.3 M LiCl inkubiert und anschließend mehrmals in 0.1 $\times$  MBSH gewaschen.

## 2.7 'Whole Mount' *in situ* Hybridisierung

In 'whole mount' *in situ* Hybridisierungen wurde das räumlich-zeitliche Expressionsverhalten der Gene untersucht. Mit Hilfe von Digoxigenin-markierter 'antisense'-RNA wurde die endogene RNA *in situ* markiert und in einer Farbreaktion sichtbar gemacht. Als Negativkontrolle diente markierte 'sense'-RNA.

### 2.7.1 Rehydrieren der Embryonen

Die entsprechenden Embryonen wurden mit 5 ml Lösung pro Schritt rehydriert. Dabei wurden pro 5 ml Schraubdeckelglasröhrchen nicht mehr als 20 Embryonen gleichzeitig behandelt.

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

@ = Kopfüber (Drehrad)

### 2.7.2 Proteinase K-Behandlung

Um die Embryonen durchlässiger für die Sonden-RNA zu machen, wurden sie für 20 min in 1 ml PTw-Puffer inkubiert, dem 0.5 µl 20 mg/ml Proteinase K-Lösung (Endkonzentration 10 µg/ml, Merck) zugegeben wurde. Die Embryonen wurden dabei optisch kontrolliert. Zeigten sich leichte Schäden an einem Embryo, wurde die Behandlung sofort abgebrochen.

### 2.7.3 Refixieren

Die durch die Proteinase K-Behandlung fragilen Embryonen wurden durch Acetylierung und Inkubation in PTw/Formaldehyd-Lösung refixiert. Die Embryonen wurden in 0.1 M Triethanolamin (pH 7.5) umgepuffert, durch zweimalige Zugabe von Acetanhydrid acetyliert und anschließend in PTw + 4% FA refixiert.

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

Der PTw-Puffer wurde bis auf 1 ml entfernt und 250 µl Hybridisierungs-Lösung hinzugegeben. Waren die Embryonen in die schwerere Hybridisierungs-Lösung abgesunken, wurde der Überstand durch 500 µl dieser Lösung ausgetauscht und der Ansatz für 10 min bei 60°C inkubiert. Die Lösung wurde wiederum gewechselt und die Embryonen für 6 h bei 60°C prähybridisiert. Die Lösung wurde gegen 500 µl Hybridisierungs-Lösung mit 1 µg/ml Proben-RNA ausgetauscht und über Nacht bei 60°C hybridisiert.

### 2.7.4 Waschen

Um unspezifisch gebundene Sonden-RNA zu entfernen, wurden die Embryonen unter stringenten Bedingungen bei 60°C gewaschen und mit 10 µg/ml RNase A und 10 U/ml RNase T1 verdaut.

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

### 2.7.5 Antikörper-Inkubation

Vor Inkubation mit dem Detektions-Antikörper wurden die Embryonen in 2% Boehringer Mannheim Block (BMB) und 20% Serum inkubiert, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden.

— = Horizontale Wippe

	Puffer	Dauer (min)	T (°C)	Anzahl
1.	MAB + 2% BMB	60	RT	1 × —
2.	MAB + 2% BMB + 20% Serum	60	RT	1 × —
3.	MAB + 2% BMB + 20% Serum + AK (1/5000)	240	RT	1 × —
4.	MAB (Waschen)	30	RT	2 × —
5.	MAB (Waschen)	über Nacht	4°C	1 × —

### 2.7.6 Farbentwicklung

Die Zeitdauer der Farbentwicklung wurde so gewählt, daß das spezifische Farbsignal maximal war, während eine Hintergrundfärbung das Signal noch nicht überdeckte.

	Puffer	Dauer	T (°C)	Anzahl
1.	MAB	60 min	RT	1 ×
2.	APB	5 min	RT	2 ×
3.	NBT/BCIP	bis 24 h	RT	1 ×
4.	MEM	15 min	RT	1 ×
5.	MEM	Übernacht	4°C	1 ×

**PTw (1×):** 1× PBS, 0.1% Tween-20

**Hybridisierungs-Puffer:** 50% Formamid (deionisiert), 5× SSC, 1 mg/ml Torula RNA, 100 µg/ml Heparin, 1× Denhardt's, 0.1% Tween-20, 0.1% CHAPS, 10 mM EDTA, RNase freies dH<sub>2</sub>O

**RNasen:** 20 µg/ml RNase A, 10 U/ml RNase T1

**MAB (2×):** 200 mM Maleinsäure, 300 mM NaCl, pH 7.5

**BMB (10%):** 1× MAB, 10% BMB (Boehringer Mannheim Blocking Reagent, #1096 176). Erhitzen zum Lösen, autoklavieren und in Aliquots einfrieren.

**Antikörper:** Sekundärer Ziege-anti-Maus Antikörper konjugiert an alkalische Phosphatase wurde von Boehringer Mannheim bezogen.

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

**Färbelösung NBT/BCIP:** BM Purple AP Substrate precipitating (Boehringer Mannheim, #1442-074) wurde als Fertiglösung bei RT eingesetzt.

## 2.8 *in situ* Hybridisierung von Dünnschnittschnitten

### 2.8.1 Fixierung

Die Embryonen wurden in 1× MEMFA für 2 h bei Raumtemperatur auf einer Wippe fixiert. Anschließend wurden sie in 100% Ethanol überführt und bei -20°C aufbewahrt.



### 2.8.2 TESPА-Beschichtung der Objektträger für Schnittpräparate

Objektträger wurden für 1 h in 1% HCl in 70% Ethanol gewaschen, mit dH<sub>2</sub>O gespült und bei 70°C getrocknet. Danach wurden sie für 10 sec - 2 min in 2% (v/v) TESPА ((3-Triethoxysilyl)-propylamin, Sigma) in Aceton getaucht, in Aceton gespült und bei 80°C im Trockenschrank getrocknet. Die behandelten Objektträger konnten staubfrei bei Raumtemperatur gelagert werden. Zum Teil wurden sie vor Beginn der Herstellung von Schnittpräparaten zur Aktivierung für 1 h in 2.5% (v/v) Glutaraldehyd in 1× PBS eingelegt. Nach Waschen mit dH<sub>2</sub>O wurden die Objektträger luftgetrocknet.

### 2.8.3 Einbettung in Paraffin und Anfertigung von Schnitten

Das Paraffin (PolyFin, Polyscience Inc.) wurde bei 60°C verflüssigt. Die Embryonen wurden je zweimal für 20 min bei Raumtemperatur erst in 100% Ethanol, dann in Xylol dehydriert. Anschließend folgte eine Infiltration des Paraffins durch Inkubation der Embryonen für mindestens zweimal 1 h bei 60°C. Zur Einbettung wurden flexible Kunststoffformen (1.2 cm × 1.5 cm × 2.2 cm, Peel-a-way Molds T12, Polysciences Inc.) verwendet. Auf einer nichttemperierten Unterlage wurde das Paraffin in die Formen vorgelegt, der äquilibrierte Embryo unverzüglich hinzugefügt und unverzüglich mit einer auf 60°C vorgewärmten Glasnadel ausgerichtet. Nach 30 min wurde der ausgehärtete Block herausgelöst. Zum Anfertigen der Schnitte wurde der Paraffinblock trapezförmig zurechtgeschnitten und durch kurzzeitiges Anschmelzen der Unterseite auf einem hölzernen Probenhalter (1 cm × 2 cm × 3 cm) ausgerichtet „aufgeklebt“.

Der Probenhalter mit dem Objekt wurde im Halter eines Mikrotoms (Leica Instruments) fixiert. Mittels Rotationstechnik wurden Bänder von Serienschritten mit einer Schnittdicke von 8-12.5 µm erzeugt. Die einzelnen Schnitte wurden mit einer Pinzette sequentiell auf mit TESPА-beschichtete Objektträger überführt, die zuvor mit entgastem 50% Ethanol benetzt worden waren. Anschließend plazierte man die Objektträger auf einer 40°C warmen Heizplatte, damit sich die Schnitte ausbreiten konnten, und trocknete über Nacht.

### 2.8.4 Entparaffinierung, Rehydration und Refixierung

Um das Wachs zu entfernen wurden die Schnitte zweimal 10 min in Xylol gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte in einer abnehmenden Ethanolreihe (100% bis 30%) je 2 min rehydriert. Zur Refixierung wurde 20 min lang in 4% Formaldehyd in 1× PBS, pH 8.0 inkubiert.

### 2.8.5 Vorbehandlung und Prähybridisierung

Nach dem Spülen der Schnitte in 2× SSPE wurden die Objektträger zur Permeabilisierung der Präparate für 30 min bei 37°C in Proteinase K-Lösung inkubiert (3 µg/ ml Proteinase K in 0.1 M Tris, pH7.5, 10 mM EDTA). Nach Spülen mit 2× SSPE wurde für 15 min eine Inkubation in 0.2 M HCl durchgeführt. Die Acetylierung erfolgte nach erneutem Spülen in 2× SSPE, indem die Schnitte in 0.1 M Triethanolamin, pH 8.0 überführt wurden und unter Bewegung 0.25% Acetanhydrid zugesetzt wurde. Eine zweite Zugabe erfolgte nach 5 min, nach 5 min Inkubation wurden die Objektträger in 2× SSPE gewaschen.

Alle Verfahrensschritte, für die eine Hybridisierungstemperatur von 60-65°C erforderlich war, wurden in feuchten Kammern in einem Hybridisierungssofen (Heraeus) durchgeführt. Dazu wurden die auf Stützbänken waagrecht ausgerichteten und mit Lösung überschichteten Objektträger in einer feuchten

Kammer inkubiert, deren Gefäßboden mit in 1× PBS getränktem Filterpapier ausgelegt war. Zur Prähybridisierung wurden die Objektträger mit je 300 µl Hybridisierungslösung beschickt und bei 65°C für 2 h inkubiert.

### 2.8.6 Hybridisierung

Die Denaturierung der RNA Sonde erfolgte für 5 min bei 70°C. Nach Entfernen überschüssigen Puffers wurden die Objektträger mit Sondenlösung (1 µg/ml) überschichtet und in der feuchten Kammer bei 60°C über Nacht inkubiert. Hybridisierungs-Lösung und weitere Reagenzien: s. Abschnitt 2.7, 'whole mount' *in situ* Hybridisierung.

### 2.8.7 Waschen, Antikörper-Inkubation und Nachweis der Sonde (Posthybridisierung)

Die Objektträger wurden mit 2× SSPE bei 65°C gespült; es folgten zwei Waschschritte bei 65°C für 10 min mit je 300 µl a) Hybridisierungspuffer und b) 50% Hybridisierungspuffer/ 50% Formamid, 2× SSPE, 0.3% CHAPS. Nach Zugabe von 500 µl 2× SSPE, 0.3% CHAPS (30 min, 25°C) und Spülen in 2× SSPE (30 min) wurden die Schnitte mit RNase A behandelt (0.02 µg/µl in 4× SSPE, 37°C für 10 min). Anschließend wurde erst für 45 min bei 65°C mit 50% Formamid/2× SSPE und dann mit je 500 µl 2× SSPE/ 0.3% CHAPS (10 min, 25°C) gewaschen. Dann wurden die Objektträger für dreimal 10 min in Puffer-1 äquilibriert und zum Blockieren unspezifischer Antikörperbindungsstellen mit je 500 µl 1% BMB/20% Serum in Puffer-1 für 2 h inkubiert. Nach Austausch des Puffers wurde der Antikörper in einer Konzentration von 1:500 bis 1:4000 zugegeben. Der einstündigen Inkubation folgten zwei Waschschritte: 3× 10 min in Puffer-1 und 10 min in Puffer-3. Der Nachweis der hybridisierten RNA Sonde erfolgte durch Farbentwicklung mittels NBT/BCIP Lösung (2-16 h, 25°C). Zur Steigerung der Nachweisempfindlichkeit für RNA schwach exprimierter Gene wurde eine Färbelösung mit Polyvinylalkohol hohen Molekulargewichts verwendet (10% PVA (w/v); De Block und Debrouwer, 1993), wobei die Objektträger vertikal für 2-16 h bei 30°C inkubiert wurden. Die Farbreaktion wurde durch Waschen in dH<sub>2</sub>O (3× 5 min) gestoppt. Um das Verhältnis Signalintensität/ Hintergrundfärbung zu verbessern wurden die Präparate für wenige Sekunden in Methanol getaucht und in rascher Folge in einer alkoholischen Reihe (20-40 sec in jeder Lösung) rehydriert, bevor sie für 40 min in MEMFA refixiert wurden. Abschließend wurden die Schnitte mehrmals in 1× PBS/ Tween gewaschen und mit Glycerin/1× PBS unter Deckgläschen eingeschlossen.

**Puffer-1:** 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl

**Puffer-3:** 100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Tween-20

**Tris-NaCl-PVA Stammlösung:** 10% (w/v) PVA (30.000-70.000 MW), 100 mM Tris (pH 9.5), 100 mM NaCl

**PVA Färbelösung:** 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM BCIP, 0.2 mM NBT in Tris-NaCl-PVA Stammlösung

### 2.8.8 Dokumentation der Dünnschnitte

Die Präparate wurden mit einem Phasenkontrastmikroskop mit Nomarski-Optik (Zeiss) bewertet. Die digitale Bildaufzeichnung erfolgte mittels einer CCD-Kamera (Sony) und entsprechender Software (Scion).

## 2.9 Mikroinjektion in *Xenopus*-Embryonen

*In vitro* transkribierte mRNA wurde mit Hilfe eines Mikroinjektors 5242 (Eppendorf) in einzelne Zellen früher *Xenopus*-Embryonalstadien injiziert. Die RNA wurde in ausgezogene (Kapillar-Puller, Leitz) Borosilikat Glaskapillaren gefüllt (GC100F-10, Clark Electromedical Instruments). Die Kapillare wurde in einen mechanischen Mikromanipulator gespannt, der mit einem Luftdrucksystem in Verbindung stand. Unter optischer Kontrolle wurde die Spitze der Kapillare mit einer Uhrmacherpinzette geöffnet. Injektionsdruck und -dauer wurden so eingestellt, daß pro Injektion ein RNA-Volumen von maximal 10 nl austrat. In Zellen des Zwei- oder Vier-Zell-Stadiums wurde ein Volumen von je 10 nl mRNA-Lösung injiziert. In einzelne Zellen späterer Stadien wurden 5 nl mRNA-Lösung injiziert.

*Xenopus* Embryonen wurden wie in Abschnitt 2.6 beschrieben generiert. Für die Injektion wurden sie in Injektionspuffer überführt und auf Objektträgern vorgelegt, die zuvor mit Repell-Silan-behandelt worden waren.

Nach der Injektion wurden die Embryonen für 1h in Injektionspuffer gehalten, der anschließend für einige Stunden gegen Post-Injektionspuffer ausgetauscht wurde. Die weitere Entwicklung lief in 0.1× MBSH-Puffer ab, der 10 U Penicillin/10µg Streptomycin enthielt. Die Embryonen wurden kultiviert bis nicht injizierte Kontrollembryonen das entsprechende Stadium erreicht hatten. Albinos wurden für 1 h in MEMFA fixiert, in 100% Ethanol überführt und bei -20°C gelagert. Pigmentierte Embryonen wurden für mehrere Stunden fixiert und dann bei 4°C in MEMFA gelagert. Die erzielten morphologischen Effekte wurden bewertet und einzelne Embryonen photographisch dokumentiert. Hierzu diente ein Stemi SV 6 (Zeiss) Stereomikroskop mit Kameraaufsatz (Zeiss); es wurden Ektachrome 64T (Kodak) Kunstlicht-Diafilme verwandt.

**Injektionspuffer:** 1% Ficoll, 0.5× MBSH

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

## 2.10 Analyse induzierter animaler Kappen ('Animal Caps')

Um zu untersuchen, ob Xegr-1 einen Einfluß auf die Mesoderm-Induktion hat, wurden animale Polkappen durch Mesoderm induzierende Faktoren stimuliert. Mittels einer histologischen Analyse wurde geprüft, inwieweit Xegr-1 die Art des entstehenden mesodermalen Gewebes beeinflussen kann. Die Präparation und Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. H. Grunz (Gesamthochschule Essen).

### 2.10.1 Induktion und Präparation animaler Kappen („Animal Caps“)

Zur Induktion wurden die Wachstumsfaktoren bFGF, Activin und BMP-4 verwandt. Im Fall von bFGF und Activin wurden die Explantate nach der Isolation in der Proteinlösung inkubiert. BMP-4 und Xegr-1 wurden als mRNAs in beide Blastomeren des 2-Zell-Stadiums injiziert.

Für die Präparation animaler Kappen wurden cysteinisierte Embryonen verwendet. Die Vitellinmembran wurde manuell mit einer ausgezogenen Glasnadel und einer Pinzette vom vegetativen Pol aus entfernt. Mittels ausgezogener Glasnadeln wurde das Blastocoeldach herausgeschnitten und in kleine Petrischalen mit 0.7% Agarose in 0.5× MBSH überführt. Sollten die animalen Kappen stimuliert werden, erfolgte die

Inkubation unmittelbar nach der Exzision für 2 h in Mikrotiterplatten. Nicht zu inkubierende Explantate wurden in Barth-Lösung/0.1% BSA gehalten.

**Barth-Lösung:** A: 88 mM NaCl, 1.005 mM KCl, 0.408 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.339 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.828 mM MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O; B: 2.381 mM NaHCO<sub>3</sub>; C: 0.211 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.276 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Lösungen getrennt ansetzen, dann zusammenführen; pH 7.4

**Wachstumsfaktoren** zur Inkubation: bFGF (Amersham) und Activin (H. Grunz) verdünnt in Barth-Lösung/0.1% BSA

### 2.10.2 Histologische Analyse

Die Explantate wurden inkubiert, bis die Kontroll-Embryonen mindestens das Stadium 42 erreicht hatten. Je fünf Kappen wurden mit Glaskapillaren in Bouin's Fixativ überführt. Die histologischen Färbungen wurden nach der modifizierten Azan-Färbetechnik nach Heidenheim durchgeführt. Die histologische Analyse sowie die lichtmikroskopische Auswertung wurden freundlicherweise in der Abteilung von Prof. H. Grunz an der Gesamthochschule Essen ausgeführt.

**Bouin's Fixativ:** 150 ml Pikrinsäure, 50 ml Formaldehyd, 10 ml Eisessig

## 2.11 Analyse von Promotorelementen durch Band-Shift Experimente

Der Vergleich des genomischen Fragments mit den 5'-flankierenden Sequenzen der homologen Egr-1 Gene zeigte z. T. konservierte Promotorelemente (CarG-Box / ets Bindungssequenz). Da die entsprechend bindenden humanen Proteine (SRF bzw. ELK-1) bekannt waren, konnte untersucht werden, ob sich *in vitro* DNA/Protein-Wechselwirkungen nachweisen lassen. Die Spezifität der Bindungen wurde anhand von Mutanten mit veränderter Erkennungssequenz untersucht. Das Oligonukleotid für Xegr-1 entspricht der Nukleotidsequenz von -389 bis -425, die Mutanten weisen Punktmutationen in den Erkennungssequenzen auf. Als Kontrolle diente ein c-fos Oligonukleotid. Die Proteine wurden ausgehend von humaner cDNA *in vitro* translatiert und waren mit sechs Histidinmolekülen markiert; sie wurden von Prof. Nordheim zur Verfügung gestellt. Komplementäre Oligonukleotide, die die zu untersuchenden Sequenzen aufwiesen, wurden nach 5 min im 100°C-Wasserbad über Nacht abgekühlt und die überhängenden Enden mit Klenow-Fragment aufgefüllt und <sup>32</sup>P-markiert (10.000 cpm). Nach Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide mittels einer Nunc-Trap G-50 Säule wurden die Oligonukleotide zusammen mit je 1 µg Protein SRF und/oder ELK-1 bei 25°C für 30 min inkubiert. Die Protein/DNA-Komplexe wurden auf einem 5% Polyacrylamidgel in 0.5× TBE für 2 h bei 220V aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und auf einem Röntgenfilm bzw. „PhosphorImager Screen“ exponiert.

### Oligonukleotide

xegr-1 wt	F	5'- <b>ATCCGGAAAGCCCTTAAAAGGAGCAGGAA</b>
xegr-1 wt	R	5'- <b>CGGGGTTCCTTCCTGCTCCTTTTAAGGGCTTTCC</b>
SREmut	F	5'- <b>ATCCGGAAAGC<u>a</u>CTT<u>c</u>AAAtGAGCAGGAA</b>
SREmut	R	5'- <b>CGGGGTTCCTTCCTGCTC<u>a</u>TTT<u>g</u>AAGtGCTTTCC</b>
EBSmut	F	5'- <b>ATCC<u>t</u>tAAAGCCCTTAAAAGGAGC<u>a</u>ttAAG<u>c</u>tA</b>
EBSmut	R	5'- <b>CGGGGT<u>a</u>gCTT<u>a</u>aTGCTCCTTTTAAGGGCTTT<u>a</u>a</b>
c-fos wt	F	5'- <b>GATCCACACAGGATGTCCATATTAAGGACATCCTGTGC</b>
c-fos wt	R	5'- <b>GATCCGACAGGATGTCCTAATATGGACATCCTGTGTGT</b>

**Proteine**

SRF-6His (Jahnknecht et al., 1991); N6His-Elk-1 (Jahnknecht and Nordheim, 1992)

## 2.12 Analyse mikroinjizierter Promotorkonstrukte durch Detektion von $\beta$ -Galaktosidase in *Xenopus* Embryonen

Zur Analyse des Xegr-1 Promotors wurden genomische Fragmente vor die codierende Sequenz des  $\beta$ -Gal Proteins in den pCS2+c $\beta$ gal Vektor (Rupp et al., 1994; Turner und Weintraub, 1994) kloniert. Dieser Vektor produziert ein  $\beta$ -Gal Protein, das im Zytoplasma lokalisiert ist und durch X-Gal Färbung nachgewiesen werden kann. Nach Linearisierung und Aufreinigung wurden die Promotorkonstrukte in die vier Blastomeren des 4-Zellstadiums in *Xenopus* Embryonen mikroinjiziert. Hatten die Embryonen das Gastrula-Stadium erreicht wurden sie nach Entfernen der Vitellinmembran 1 h fixiert: entweder wurden sie direkt in 1 $\times$  MEMFA überführt oder nach dreimaligem Waschen in 1 $\times$  PBS in 2% Formaldehyd, 0.2% Glutaraldehyd, 0.02% Nonidet P40, 0.1% Na-Deoxycholat in 0.1 $\times$  PBS inkubiert. Nach Spülen in 1 $\times$  PBS erfolgte die X-Gal Färbung für 1 h bis über Nacht bei 30°C. Die Färbelösung setzte sich wie folgt zusammen: 1 $\times$  PBS plus 5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.02% Nonidet P40; X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktospyranosid) in DMF wurde zu 1 mg/ml frisch hinzugefügt. Nach Abschluß der Färbung wurden die Embryonen in 1 $\times$  PBS gewaschen, in MEMFA refixiert und in 100% Ethanol bei -20°C aufbewahrt.

**2.13 Oligonukleotide**

Oligonukleotide wurden von den Firmen Tib Molbiol (Berlin), Applied Biosystems (Weiterstadt) und Eurogentec (Seraing, Belgien) bezogen. Die Primer sind wie folgt bezeichnet: (F) für 'forward' (oberer Strang in 3'-Richtung) bzw. (R) für 'reverse' (unterer Strang in 3'-Richtung). Primer, die zum Klonieren verwendet wurden enthalten zum Teil Erkennungssequenzen für bestimmte Restriktionsenzyme.

Bezeichnung	Sequenz 5'-
<b>EGR-1</b>	
EGR1(D2)F	GAG ATG TTA GCC TGG TAT CTG C
EGR1(D2)R	GTA CTG TTG ATG GTC TTG AGG TCC
EGR1(12/T3-55)F	CGA TTG CAG AAC CGG CGA CAA C
EGR1(12/T3-332)R	CAG CAT CAT CTC CTC CAG TTT G
EGR1(12/T7-419)R	TTG GGT TAC ATT CTA CAG AAA
EGR1(12/R-772)R	CCC TGT TGT TGT GGA AAI AGA
EGR1 F-459 (14/55F)	TTG CCA TCT CTA ACA TAT ACT
EGR1 F-391 (14/F2)	TTG CCA GAA GTG ATG AGA GGA
EGR1 R-513 (14/F2)	CTG AGA AGG GGT AAG ATG TTG AC
EGR1 F-611	AAG GGA TTT TTA CTC TAT ACA
EGR1 R-261	ATC AGG TCA GCG AGG ATA CAC
EGR1 F-218	TTG CCA AAA CGG AGA TGC T
EGR1 R-542	TCC AAG GAG AAC CGA CCA GTA
EGR1 5-Sokol	CGC GGT ACC ATG GCA GTT GCC AAA ACG GA
EGR1 5-pCS	GCG GAA TTC AGC AGT TGC CAA AAC GGA GAT

EGR1 3-end	CCG CTC GAG GTC TTA CCA AAT CTC AAT TG
EGR1 ORF/F-723	CGC GAA TTC ACC CTT CCA GGC TAT GGA
EGR1 ORF/R-1173	CCG AGA TCC TTT TGC CTC AAG TG
EGR1 ORF/R-1493	CCG TCT AGA TAC CAA ATC TCA ATT GT
EGR1 AS-5'XhoI	CTG CTC GAG CCG TGC GGG GGA AGC GAT TGC
EGR1 AS-3'EcoRI	CCG GAA TTC TTT ATA AAT TTA CAT TTC AG
EGR1 F1(I261F)	CCT GTC TAC CTT CAA GGC CTA TGC AAC C
EGR1 R1(I261F)	GGT TGC ATA GGC CTT GAA GGT AGA CAG G

### EGR-1 genomisch

---

g1 F-474 (4SRE)	ATC ATT ACT ACT ATT GCA CCT
g1 R-231 (4SRE)	CTA AAT CTA TCT CAC ATA TCC G
g1 F-556	CTT TGT GGC ATC AGC TCA CTG G
g1 R-446	ACA AGT TGT GGT GCA TGT GAG C
g1 R-281 (F556a)	ATA GGC TGG TTT GGC TTC C
g1 R-364 (F474a)	AGC ATT TAT TGT AAG TGT G
g1 F-339 (R446a)	TTG TCC CAT TTC GCC TCG C
g1 F-171 (R231a)	TAG TTT AGC ATT CAC AGC C
g1 F-272 (SRE1)	TTA CAT GGC CTA AGC TGC C
g1 R-265 (SP6)	TGT CAT TCA ACA ACT ACT GG
g1 R+83 TSS	TGT TGC AAT TAA AGC TTT GCT GGC T
g1 R+40 TSS	GTT GTC GCC GGT TCT GCA ATC GCT T
g1 H5(Xho.Hind)F	GCA GCT CGA GAA GCT TAA CTA AAG TAG GCT
g1 H5-beta gal	TTG TGA TCA GCC ATC AGC TTC TCG GGA ATC C

### NAB

---

Xnab1-50F	CAA CCT CTC ACA TCG CTG C
Xnab1-422R	CAT TCA GAA ACT GAG AGA GC
mmNAB-F2	CGC GAA TTC ATG CAC AGA GCT CCC TCT CCC ACA
mmNAB-R2	CCG CTC GAG TCA CTG CCG GCT GGC TTC TGC CTC
rrNAB1-F1	CGA GGA TTC ATG GCC TTC TGT CAA CGC CTC CCT
rrNAB1-R1	GAA TCT AGA CTA TCT TGA GTC TTC GGG CTC TGT
rrNAB1-F2	CCA TCG ATT CGC CAC AGC CTT ACC TAG G
rrNAB1-R2	TGC TCT AGA CTA TCT TGA GTC TTC GG
F-1 (I261F)	CCT GTC TAC CTT CAA GGC CTA TGC AAC C
R-1 (I261F)	GGT TGC ATA GGC CTT GAA GGT AGA CAG G

### EGR-3

---

EGR3(E1)F	CTA CCA CAA CAC AGA GAT GCC T
EGR3(E1)R	AGA GAG GGT TGG TGG CTC ATA C
EGR3-F 535	TTC TGG CAC ATA CAC ACA TGC
EGR3-F 426	GCA CGT AGT GAT GAG AGG AAG
EGR3-R 253	CTG AAA CGT GCC ACT GTA GGA
EGR3-F 274	GCT GGT TCA AGA ATA AAA TGT
EGR3-R 340	TCT TGG AAC AGI TAT TAC AGG
EGR3-F 285	GCA TTT TCA TCA CAC TCC TG
EGR3-F 176 (F285)	ACA GGG AAC TTG TGG TAA AT
EGR3-R 191 (R340)	CCC AAT AAA ACT CTA TGA CA
EGR3-R 677	GGA CAT TGT TTG GGG TAC AC
EGR3-R 1258	GAA ACA TAG AAT CCA CAT CA
EGR3-R 2020	TAA CTG GTG TGT TTT GGC AA

### degenerierte Primer

---

EGR-1F	TTY WSH MGN WSH GAY GAR YT
EGR-1R	YTC RTC DSW NCK DGC RAA YYT
EGRall-2F	CCI ATG ATI CCI GAY TAC
EGR1-3F	TTY CCI CAR CAR CAR GGI GA
EGR2-4F	GGI ATG ATI AAY RTI GAY ATG
EGR3-5F	TAY CAY CAY CCI AAY GAY ATG G

EGR2,3-5R	CKY TCR TGI ACI GGI GTY TT
EGRall-2R	TCR CAY TGR AAI GGY TTI TGI CC
EGR-4R	CKY TCR TGI GGI GGI GTY TT

#### sonstige Primer

---

Xbra-F	GGA TCG TTA TCA CCT CTG
Xbra-R	GTG TAG TCT GTA GCA GCA
Chd-F	CTA AGG GCC CAT GGT TCA CGA T
Chd-R	ATT GGC ACG GAT TGG GTT GGT A
XL(K20)-3R	CAC GTG GAC TGG GGT CTT AC
XHiston4-F	CGG GAT AAC ATT CAG GGT ATC ACT
XHiston4-R	ATC CAT GGC GGT AAC TGT CTT CCT
R-LacZ124	CCT CTT CGC TAT TAC GCC AG
SP6	TTA GGT GAC ACT ATA GAA TAC
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

## 2.14 Plasmide

Zur Darstellung der mRNAs für die Injektionen wurden cDNAs oder entsprechende Fragmente in den Expressionvektor pCS2+ bzw. dessen Modifikationen (Rupp et al., 1994; Turner und Weintraub, 1994) kloniert. Der pCS2+ Vektor besitzt einen starken eukaryotischen Promotor (sCMV IE94), gefolgt von einem prokaryotischen SP6-Promotor, der die *in vitro* Synthese der RNA erlaubt. Es folgt eine Polyadenylierungssequenz des SV40-Virus, die von zwei Polylinkern umgeben ist. In SP6-transkribierter 'CAP'-mRNA war dieses Polyadenylierungssignal am 3'-Ende enthalten. Modifizierte pCS2+ Versionen konnten eine Epitopmarkierung (MT, 6× myc) und/oder eine Kernlokalisationssequenz (NLS bzw. MTNLS) enthalten, oder zytoplasmatische  $\beta$ -Galaktosidase (c $\beta$ gal) bzw. ein Fusionskonstrukt exprimieren. Plasmide, die aus anderen Laboren bezogen wurden, sind durch Angabe der Erstveröffentlichung gekennzeichnet.

**pBK-CMV/Xegr1 cDNA** enthält 2807 Nukleotide der Xegr-1 cDNA (Sequenz siehe Abb. 3-2). Ab Nukleotid 211 existiert ein 1494 bp langer offener Leserahmen. Die cDNA ist über die Restriktionsstellen 5'EcoR I und 3'Xho I in den pBK-CMV Vektor kloniert. Für *in vitro* Transkription ('antisense' RNA): Linearisierung mit EcoR I; T7.

**pCS2+MT/Xegr1 ORF** enthält die Nukleotide 3-1494 der kodierenden Sequenz (Nukleotide 214-1701 der cDNA). Mittels PCR (Primer: EGR1-5'pCS/-3'end) wurde aus der cDNA ein entsprechendes Fragment amplifiziert und über die eingeführten Restriktionsstellen 'in-frame' mit dem Myc-Tag in den pCS2+MT Vektor kloniert (5'EcoR I, 3'Xho I; MT liegt N-terminal). Das resultierende Protein enthält die Aminosäuren 2-497. Linearisierung für *in vitro* Transkription: Not I, SP6. Das Plasmid **pCS2+NLS/Xegr1 ORF** wurde unter Verwendung des Vektors pCS2+NLS analog kloniert.

**pCS2+MTNLS/E1 ZF-enR** stellt ein Fusionsprotein aus einem Sequenzbereich (Aminosäure 242-390), der die Xegr-1 Zinkfinger-Domäne enthält, und der engrailed Repressor-Domäne dar. Die Klonierung erfolgte über Restriktionsschnittstellen, die durch Primer (EGR1ORF/F-723 (EcoR I); EGR1ORF/R-1173

(Spe I) in das amplifizierte Fragment eingeführt worden waren, in den EcoR I/Xba I-geschnittenen Vektor pCS2+MTNLS-enR. Zur *in vitro* RNA-Synthese für Injektionen wurde mit Apa I linearisiert und SP6 transkribiert.

**pCS2+MTNLS/E1 ZF-E1a** enthält das gleiche Xegr-1 Insertionsfragment wie das Zinkfinger-engrailed Konstrukt pCS2+MTNLS/E1ZF-enR. Der Sequenzbereich wurde durch PCR (Primer EGR1ORF/**F**-723 (EcoR I); EGR1ORF/**R**-1173 (Spe I)) aus dem Plasmid pCS2+NLS/I261F amplifiziert. Das EcoR I/Spe I-geschnittene Insert wurde in die EcoR I/Xba I-Schnittstellen des pCS2+MTNLS/E1A Vektors kloniert. Zur *in vitro* RNA-Synthese für Injektionen wurde mit Not I linearisiert und SP6 transkribiert.

**pCS2+/antisense Xegr1** enthält 2546 bp der cDNA, die in „entgegengesetzter“ Orientierung in den pCS2+ Vektor kloniert wurden. Dazu wurde auf dem Plasmid pBK-CMV/Xegr1cDNA eine PCR mit den Primern EGR1AS-5' Xho I und EGR1AS- 3' EcoR I durchgeführt. Das 5' Xho I/ 3' EcoR I-geschnittene Amplifikat wurde in die 5' EcoR I/3' Xho I-Restriktionstellen des pCS2+ Vektors ligiert. Zur Darstellung von 'antisense'-RNA, die durch Cap-Strukturanalogon (Kapitel 2.3.3) und Polyadenylierung stabilisiert ist, erfolgte die Transkription nach Linearisierung (Not I) in 'sense'-Orientierung (SP6).

**pCS2+NLS/I261F** stellt das Plasmid pCS2+NLS/Xegr1-ORF dar, bei dem eine gezielte Punktmutation eingeführt wurde (Primer: EGR1-**F**1(I261F)/-**R**1(I261F)); siehe Kapitel 2.1.21). Der resultierende Aminosäureaustausch (I<sub>261</sub>[ATC]→F [TTC]) betrifft eine Aminosäure in der Repressions-Domäne des Xegr-1 Proteins und soll die Bindung von NAB-Repressorproteinen verhindern (siehe auch Kapitel 3.3.3.3). Zur *in vitro* RNA-Synthese für Injektionen wurde mit Not I linearisiert und SP6 transkribiert.

**pGEM-T/X-NAB1** enthält ein 600 bp großes Fragment, das homologe Bereiche zur NAB1-Sequenz der Ratte besitzt. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des partiellen X-NAB1 cDNA ist in Abb. 3-19 dargestellt. Ausgehend von der isolierten cDNA Sequenz wurden spezifische Primer für die RT-PCR Analyse generiert. Zur Darstellung von 'antisense'-Proben für *in situ* Hybridisierungen wurde mit Nco I linearisiert und SP6 transkribiert.

**pCS2+NLS/rrNAB1** enthält die kodierende Sequenz für NAB1 (Ratte; Russo et al., 1995; Start des Proteins ist nach Mitteilung von J. Svaren das Met-86). Das Ausgangsplasmid Plasmid war JDM1641 (J. Svaren), das ein Sac II/Age I-Fragment (ratNAB1) enthielt und in den Plasmidvektor pCB6 (Kpn I/Cla I) kloniert worden war. Mittels PCR (rrNAB1-F2/R2) wurde ein Fragment mit 5' Cla I (=BspD I)/ 3' Xba I-Schnittstellen generiert, das in den BspD I/ Xba I-geschnittenen pCS2+NLS Vektor kloniert wurde. Das Start-Methionin 86 wurde dabei zerstört. Zur *in vitro* RNA-Synthese für Injektionen wurde mit Not I linearisiert und SP6 transkribiert.

**pCS2+NLS/mmNAB2** enthält die kodierende Sequenz des murinen NAB2 Gens (Svaren et al., 1996). Als Ausgangsmaterial für die Klonierung diente das Plasmid JDM2013 (J. Svaren). Es enthält ein Not I/Xho I-Fragment des murinen NAB2 in pBluescript-II(SK), das das 5' Ende und den gesamten ORF umfaßt. Mit den Primern mmNAB-F2/-R2 wurde ein PCR-Fragment mit Restriktionsschnittstellen (5' EcoR I, 3' Xho I)



generiert und in pCS2+NLS subkloniert. Zur *in vitro* RNA-Synthese für Injektionen wurde mit Not I linearisiert und SP6 transkribiert.

**pGEM-3zf(+)/g1H5** enthält ein genomisches Xegr-1 Fragment von 4116 bp Länge (Sequenz siehe Abb. 3-22). Infolge der Bestimmung des Transkriptionsstarts (siehe Kapitel 3.4.2) ergibt sich für das isolierte Xegr-1 Promotorfragment eine Länge von 3091 bp (d.h. das erste Nukleotid des genomischen Fragments entspricht der Promotorposition -3091). Es wurde aus einer Hind III-geschnittenen Präparation einer genomischen  $\lambda$ -Fix II Phagenbibliothek isoliert und in pGEM-3zf(+) subkloniert. Der genomische Klon wurde zur Darstellung der Promotorkonstrukte (pCS2+c $\beta$ gal/A1, pCS2+bgal/B1, pCS2+bgal/B2) sowie des Fragments für die RNase-Protektionsanalyse (pGEM-T/F272\_R+83) verwendet.

**pGEM-T/F272\_R+83** enthält die Nukleotide 2735-3191 des genomischen Xegr-1 Fragments. Mittels PCR (Primer: g1F-272 (SRE1)/g1R+83 TSS) wurde aus dem genomischen Xegr-1 Klon ein Fragment amplifiziert und in den Vektor pGEM-T subkloniert. Transkripte dieses Plasmids wurden in der RNase-Protektionsanalyse eingesetzt: zum einen als radioaktiv-markierte 'antisense'-Sonde (Linearisierung Sal I, Transkription T7); zum anderen als nicht markierte 'sense'-Sonde (Linearisierung Apa I, Transkription SP6).

**pCS2+c $\beta$ gal/A1** enthält 1892 bp Xegr-1 Promotorsequenz und 5'-UTR; Nukleotide -1662 (Bcl I) bis +230 (Bcl I) in BamH I Restriktionsstelle von pCS2+c $\beta$ gal. Das zu klonierende Fragment wurde durch PCR generiert (Primer F: T7 (Hind III)/R: g1H5- $\beta$ gal (Bcl I)). Die  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ gal)-kodierende Sequenz befindet sich 'in frame' 3' zur Promotorsequenz. Alle drei SREs sind enthalten. Das Fusionsprotein enthält neben dem  $\beta$ gal-Anteil zwei zusätzliche Aminosäuren. Die Injektion in Embryonen erfolgte in Form von zirkulärer oder linearisierter DNA (Linearisierung: Bsa I/Hind III; 6686 bp).

**pCS2+c $\beta$ gal/B1** enthält 2973 bp Xegr-1 Promotorsequenz; Nukleotide -3091 (Hind I) bis -119 (BamH I). Die  $\beta$ -Galaktosidase-kodierende Sequenz befindet sich 'in frame' 3' zur Promotorsequenz. Nur das distale SRE III ist enthalten. Das Fusionsprotein enthält neben dem  $\beta$ gal-Anteil 82 zusätzliche Aminosäuren. Injektion zirkulär oder linear (Linearisierung: Bsa I/Hind III; 7686 bp).

**pCS2+c $\beta$ gal/B2** enthält 3320 bp Xegr-1 Promotorsequenz; Nukleotide -3091 (Hind I) bis +230 (Bcl I). Das Fragment (Hind III/BamH I; B1) wurde in den Vektor (Hind III/BamH I) kloniert, nach Verdau des neuen Vektors mit BamH I wurde ein BamH I/Bcl I Fragment (aus PCR-Produkt für A1) einkloniert. Die  $\beta$ -Galaktosidase-kodierende Sequenz befindet sich 'in frame' 3' zur Promotorsequenz. Das Fusionsprotein enthält neben dem  $\beta$ gal-Anteil zwei zusätzliche Aminosäuren. Die gesamte Promotorsequenz ist enthalten. Injektion zirkulär oder linear (Linearisierung: Bsa I/Hind III; 8041 bp).

**pSP64T/Xbra** enthält die gesamte cDNA von *Xenopus* Brachyury (Cuncliff und Smith, 1992). Klonierungsstelle: Bgl II. Linearisierung: Sal I ('sense', SP6) bzw. Bgl II ('antisense', T7).

**pSP35/chd** enthält die kodierende Region von *Xenopus* Chordin (Sasai et al., 1994). Für 'antisense' RNA Synthese: Linearisierung EcoR I; Transkription: T7.

**pNTM2/Bsc [Eomes]** enthält 1467 bp eomes cDNA (Aminosäuren 215-692; Ryan et al., 1996). Klonierung: 5'-EcoR I, 3'-Not I in pBlueskript SK(-). Für 'antisense' RNA Synthese: Linearisierung EcoR I; Transkription: T3.

**pCS2+/XSRF** enthält die kodierende Region (Nukleotide 551-2142) des *Xenopus* SRF-Gens (Mohun et al., 1991). Das Fragment wurde mit Bgl II-Linkermolekülen in die Bgl II Schnittstelle insertiert. Zur Darstellung von 'antisense' RNA für *in situ* Hybridisierungen wurde mit Eco RI linearisiert und mit T7 transkribiert.

**pBK-CMV/ER81** enthält die von Chen et al. (Manuskript in Vorbereitung) 5'Xho I/ 3'EcoR I-klonierte cDNA des *X.l.ER81*-Gens. Zur Darstellung von 'antisense' RNA für *in situ* Hybridisierungen wurde mit EcoR I linearisiert und mit T7 transkribiert.

**pBluescript II SK(-)/Xegr-3 [Fragment]** enthält ein 4525 bp großes Xegr-3 Fragment, das aus einer *Xenopus* Nieren-cDNA Bank (A6 Nierenzellen, Fraktion MP1.2, Petersen, 1995; in  $\lambda$ -Uni-ZAP, Stratagene) isoliert wurde (Sequenz siehe Abb. 3-5). Klonierungsstellen im Vektor: EcoR I und Xho I.

## 2.15 Chemikalien, Geräte und Computer

Biochemische Feinchemikalien wurden von den Firmen Boehringer Mannheim, Fluka, Roth, Serva, Sigma und Biomol bezogen. Alle anderen Chemikalien stammten von den Firmen Fluka, Baker oder Merck und wiesen den Reinheitsgrad p.a. auf. Die komplexen Mediumbestandteile wurden von DIFCO Laboratories bezogen. Gebrauchswaren und Geräte wurden, wenn nicht gesondert angegeben, von folgenden Firmen bezogen: Abimed (Hannover), Costar (Bodenheim), Eppendorf (Hamburg), Falcon (Heidelberg), Schütt (Göttingen), Greiner (Frickenhausen), Kranich (Göttingen), Qiagen (Hilden), Sarstedt (Langenhagen) und Siemens (Hamburg).

Die Auswertung von DNA- und Proteinsequenzen erfolgte mit Hilfe des „DNA Star“ Softwarepakets auf einem Apple Macintosh Computer. Bildbearbeitung und Grafiken wurden anhand der Programme Adobe Photoshop 4.0 und Freehand 7.0 ausgeführt. Die vorliegende Arbeit wurde an einem IBM kompatiblen Computer unter Verwendung von MS WinWord 6.0 erstellt.

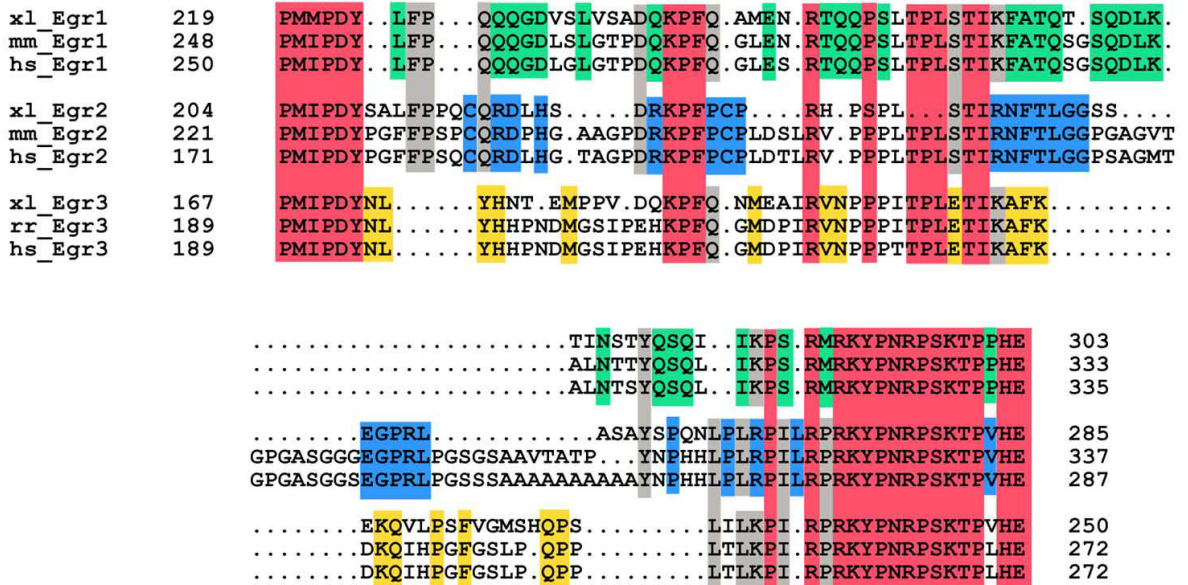
### 3. Experimente und Ergebnisse

Als Mitglieder der EGR-Familie sind bislang Egr-1, -2, -3 und -4 isoliert worden. Während einzelne Subtypen aus anderen Vertebraten bereits isoliert waren (siehe Einleitung), war für *Xenopus laevis* zu Beginn der vorliegenden Arbeit nur das Krox-20/Egr-2 Gen bekannt (Bradley et al., 1992). Die Krox-20 Expression ist in der frühen Froschembryogenese auf das Nervensystem beschränkt und zeigt im sich entwickelnden Hinterhirn ein segmentspezifisches Muster. Aufgrund dieser Beobachtung stellte sich die Frage, ob a) weitere Egr-Gene im Krallenfrosch konserviert sind und b) diese, sofern vorhanden, auch eine Funktion während der frühen Embryonalentwicklung haben. Die Zielsetzung dieser Arbeit war es daher, zu versuchen, entsprechende Mitglieder aus *Xenopus laevis* zu isolieren und zu charakterisieren. Der erste Teil der Arbeit beschreibt die Isolierung der cDNAs für Xegr-1 und Xegr-3, sowie die Analyse der zeitlichen und räumlichen Expression. Der zweite Abschnitt beschäftigt sich mit der Funktion des Xegr-1 Gens in der frühen Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*.

#### 3.1 Isolierung EGR homologer cDNAs aus *Xenopus laevis*

Die Verwandtschaft zwischen den Mitgliedern der EGR-Familie läßt sich am besten durch einen Vergleich von Sequenzbereichen bestimmen, die außerhalb der hoch konservierten Zinkfinger-DNA-Bindungsdomäne liegen. Dabei zeigt sich, daß die Homologie zwischen Egr-1, -2 und -3 untereinander höher ist, als zu Egr-4, da es außerhalb der Zinkfinger-Region homologe Bereiche gibt, die nur in den ersten drei EGR-Subtypen vorkommen (Crosby et al., 1992). Dazu gehört vor allem die stark basische Region, die in der aminoterminalen Region direkt vor dem Zinkfinger-Triplett liegt. Auch ein Teil der für Egr-1 definierten Repressionsdomäne (Gashler et al., 1993), samt der für die Repression durch NAB-Proteine notwendigen Aminosäure Isoleucin (Svaren et al., 1996; siehe Kapitel 3.3 und 4.5), die in Egr-1, -2 und -3 konserviert ist, fehlt in Egr-4. Aufgrund der stärkeren Abweichung der Egr-4 Sequenz von den anderen Egr-Proteinen wurde Egr-4 bei dem Versuch, in *Xenopus* nicht bekannte Egr-Proteine zu isolieren, nicht weiter berücksichtigt.

Ausgehend von einem Sequenzvergleich der Aminosäuren PMIPDY...KTPVHE (Aminosäurepositionen siehe Abb. 3-1) wurden degenerierte Oligonukleotide für konservierte Sequenzelemente außerhalb der Zinkfinger-Domäne generiert, die entweder für die Egr-1/-2/-3 Familie oder für einzelne Subtypen charakteristisch waren. Die Primer waren 3' des in Egr-1 konservierten Introns positioniert und so gewählt, daß nach der ersten PCR-Amplifikation eine weitere PCR zur Anreicherung mit innen liegenden Primern durchgeführt werden konnte („semi-



**Abb. 3-1 Einteilung der EGR-Familie in Subtypen.** Der Sequenzvergleich des Proteinfragments [PMIPDY...KTPVHE] von *Xenopus*, Maus und Mensch zeigt, daß es Bereiche gibt, die in allen drei Subtypen konserviert sind (rot markiert). Daneben existieren Regionen, die spezifisch für einen Subtyp sind (Egr-1, grün; Egr-2, blau; Egr-3, gelb) Anhand dieser spezifischen Aminosäuresequenzen können die isolierten Fragmente, xl\_Egr-1 und xl\_Egr-3, eindeutig den entsprechenden Subfamilien zugeordnet werden. Punkte kennzeichnen Zwischenräume, die für eine optimale Ausrichtung eingeführt wurden. Das Fragment ist N-terminal vor der Zinkfinger-Domäne lokalisiert. Die Aminosäure-Positionen sind angegeben. Egr-1: *Xenopus*, diese Arbeit; Maus, Sukhatme et al., 1988; Mensch, Suggs et al., 1990. Egr-2: *Xenopus*, Bradley et al., 1992; Maus, Chavrier et al., 1988; Mensch, Joseph et al., 1988. Egr-3: *Xenopus*, diese Arbeit; Ratte, Yamagata et al., 1994; Mensch, Patwardhan et al., 1991. hs, Mensch; mm, Maus; rr, Ratte; xl, *Xenopus*.

nested“ bzw. „nested PCR“). Subtypenspezifische und übergreifende Oligonukleotide wurden in verschiedenen Paarungen und Kombinationen eingesetzt.

### 3.1.1 Isolierung eines Xegr-1 Fragments

Zu Anfang wurde eine RT-PCR auf Gesamt-RNA von *Xenopus* Embryonalstadien (NF 17, 28) durchgeführt, deren klonierte Produkte jedoch keine weiterführenden Resultate lieferten. Daher wurde auf *Xenopus* genomischer DNA eine ‘Nested’- bzw. ‘Semi-Nested’- PCR durchgeführt, deren äußere Primer für Aminosäuresequenzen kodierten, die in allen Egr-Genen vorhanden waren (‘PMIPDY’: EGRall-2F; ‘GHKPFQC’: HC-2R), und innere Primer, die spezifisch für die Egr-1 Subfamilie waren (‘FPQQQGD’: EGR1-3F; ‘KTPVHE’: EGR1-4R). In Abhängigkeit von der Primerkombination, der Hybridisierungstemperatur und der Zyklenzahl wurden PCR-Fragmente unterschiedlicher Länge generiert. Ein 255 bp großes Fragment wurde isoliert (1.PCR: EGRall-2F/HC2R, 48°C, 40 Zyklen; 2.PCR: EGRall 2F/EGR1-4R, 52°C, 40 Zyklen), subkloniert und sequenziert. Ein Vergleich der von diesem genomischen DNA Fragment kodierten Aminosäuresequenz mit den homologen EGR-Proteinen zeigt die eindeutige Zuordnung zum Egr1-Subtypus (Abb. 3-1).

Um festzustellen, ob dieses Gen in der frühen Embryonalentwicklung exprimiert ist, wurde anhand des klonierten Fragments eine grobe Charakterisierung vorgenommen: Zum einen wurde

mit Xegr-1 spezifischen Primern (EGR1[D2]-F/-R) eine RT-PCR auf Gesamt-RNA früher Stadien bzw. adulter Gewebe durchgeführt, die zeigten, daß entsprechende cDNAs sowohl in der frühen Entwicklung als auch im adulten Frosch vorhanden waren. Zum anderen wurde in einer 'whole mount' *in situ* Hybridisierung nachgewiesen, daß die entsprechende RNA bereits während der Gastrulation ein spezifisches Expressionsmuster zeigte.

### 3.1.2 Isolierung einer Xegr-1 cDNA

Da Xegr-1 bereits in frühen Stadien eine spezifische Expression aufwies, wurde die vollständige cDNA Sequenz ermittelt. Ausgehend von dem klonierten Xegr-1 Fragment wurden spezifische Primer generiert, um mittels PCR cDNA Bibliotheken zu durchmustern. Hierzu wurde eine *Xenopus*  $\lambda$ -ZAP Express 'tail' cDNA Bibliothek (Dr. T. Hollemann) benutzt. Diese enthielt mit Oligo-d(T) in cDNA transkribierte mRNA aus der Schwanzspitze von *Xenopus* Embryonalstadien (NF 28-31) und umfaßte Einzelfraktionen mit je 50.000 primären Phagen zu  $10^{10}$  pfu/ml. 35 Einzelfraktionen ('tail' 5.1-5.35) wurden in einer analytischen PCR mit Xegr-1 spezifischen Primern (EGR1[D2]-F/-R) getestet; dabei zeigten 14 Fraktionen ein PCR-Produkt erwarteter Länge. Die Spezifität des Produktes wurde in der Fraktion, die das stärkste Signal aufwies, mit weiteren Primern (EGR1-F/-R2; EGR1-F2/-R2) verifiziert. Um den Anteil des gesuchten Phagen im Gemisch anzureichern wurde eine serielle Verdünnungs- und Amplifikationsprozedur durchgeführt. Nach drei Amplifikationsrunden wurde ein Aliquot der positiven Einzelfraktion in unterschiedlichen Konzentrationen ausplattiert und durch 'Plaque-Lift Screening' analysiert. Um einen reinen Phagenklon zu identifizieren, wurden die Filter gegen eine durch PCR generierte Digoxigenin-markierte Sonde (Primer EGR1[D2]-F/-R) hybridisiert. In der anschließenden PCR-Analyse waren sieben von zehn isolierten Einzelklonen positiv. Nach Anreicherung der reinen Phagen wurden durch *in vivo* Exzision Phagemide erzeugt, aus denen die pBK-CMV Plasmide samt der entsprechenden Insertionsfragmente herausgeschnitten wurden. Die verschiedenen Plasmide wurden im quantitativen Maßstab dargestellt. Eine Restriktionskartierung zeigte, daß vier der sieben Klone identische Insertionsfragmente von 2.8 kb enthielten. Eine Datenbankanalyse (Altschul et al., 1990) ergab für die vier Klone eine hohe Ähnlichkeit mit EGR-1 Sequenzen. Zwei Klone zeigten Ähnlichkeit mit der Sequenz des Proto-Onkogens Pim-1 (Palaty et al., 1994) und eine Sequenz wies nur geringe Übereinstimmung mit EST ('estimated sequenz tag)-Sequenzen auf. Die im Plasmid #4 enthaltene cDNA wurde vollständig sequenziert.

### 3.1.3 Xegr-1 cDNA und Proteinsequenz

Die Xegr-1 cDNA Sequenz stammt von einem einzelnen Klon, umfaßt 2807 Nukleotide und enthält einen offenen Leserahmen von 1704 Nukleotiden. Als Startkodon wurde das erste ATG an Nukleotidposition 211 vermutet, da es das am weitesten 5' liegende ATG darstellt und mit 5'-CTG ATG G-3' dem Kozak-Konsensus für Startsequenzen 5'-A/G-X-X-A-U-G-G-3' (Kozak, 1991) am ähnlichsten ist. Der offene Leserahmen (Position 211-1704) codiert für ein Protein von

497 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 54.2 kD. Das *Xenopus* Egr-1 Protein weist damit ähnliche Werte auf, wie die Proteine von Maus (533 Aminosäuren, 56.6 kD; Sukhatme et al., 1988) und Ratte (508 Aminosäuren, 53.9 kD; Milbrandt, 1987). Der 3'-untranslatierte Bereich enthält zwei Polyadenylierungssignale (AAUAAA), von denen das erste an Position 2427 relativ weit vom 3'-Terminus der cDNA entfernt ist. Das zweite Signal (Position 2768) ist demgegenüber nur 16 Nukleotide vom 18 Basen langen Poly(A)Schwanz entfernt.

Das Protein besitzt drei in Folge angeordnete „Zink-Finger“ des C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Typs (Aminosäureposition 308-330, 338-358 und 376-386), die durch die ebenfalls hoch konservierten 'H-C-Links' verbunden sind. In den Zinkfingern und angrenzenden Sequenzen sind zahlreiche basische Aminosäuren vorhanden. Die aminoterminalen 307 Aminosäuren enthalten viel Prolin (13 %) und Serin/ Threonin (26 %). Auch der zur Zinkfinger-Region carboxyterminal gelegene Sequenzbereich zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an Prolin (13%) und Serin/Threonin (39%) aus.

Maus Egr-1 wird durch die Proteinkinase CKII (Casein Kinase II) phosphoryliert (Jain et al., 1996). Von den fünf ermittelten CKII Konsensussequenzen (SX<sub>1-3</sub>D/E) sind vier in der *Xenopus* cDNA erhalten: T<sup>119</sup>XXXE, S<sup>168</sup>XD, S<sup>269</sup>XD und S<sup>346</sup>XXD. Diese potentiellen Phosphorylierungsstellen liegen in Regionen, die wichtig für die Transaktivierung, den Kernimport und die DNA-Bindung sind (Jain et al., 1996).

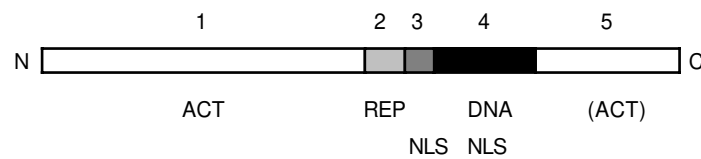
**Abb. 3-2 Xegr-1 cDNA Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz.** Am Rand sind die Positionen der Nukleotide (links) bzw. der Aminosäuren (rechts) angegeben. Die Aminosäuresequenz ist für den längsten offenen Leserahmen gezeigt. Das Stopkodon ist markiert (★). Die C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger-Domäne ist doppelt unterstrichen und die an der Zink-Bindung beteiligten Cysteine und Histidine sind fett hervorgehoben. Die potentiellen Phosphorylierungsstellen (T<sup>119</sup>XXXE, S<sup>168</sup>XD, S<sup>269</sup>XD und S<sup>346</sup>XXD) sind durch kursiven Fettdruck gekennzeichnet. Eine basische Region (Aminosäureposition 285-310), die von Gashler et al. (1993) als Teil eines zweigeteilten Kernlokalisierungssignals des murinen Egr-1 Proteins beschrieben wurde, ist einfach unterstrichen. Zwei Polyadenylierungssignale (Pos. 2427, 2768) sind kursiv gesetzt und einfach unterstrichen. Eine schematische Darstellung der Xegr-1 cDNA ist in Abb. 3-21B gezeigt.

1	CAG GAC TGG GGG AGC CGT GCG GGG GAA GCG ATT GCA GAA CCG GCG ACA ACC CCA GCA GCA	
61	GCC AGC AAA GCT CTA ATC GCA ACA ACA ACA ACA AAA CAC TGG TTA TTA TCA GCA CAA	
121	CAT ACA CAG TGC CCC AAA GCC CAC TGT ACC GAG GGA AGA GAG CTT GCC TGT CTC CCC TCA	
		M A V A K T E M L V 10
181	CCA TTC TCC CTA GGG ATT CCC GAG AAG CTG ATG GCA GTT GCC AAA ACG GAG ATG CTC GTG	
	S P L Q I S D P F S S F P H S P T M D N	30
241	TCA CCT CTG CAG ATC TCT GAT CCG TTC AGC TCT TTC CCC CAT TCC CCT ACT ATG GAT AAC	
	Y P K L E E M M L L N A G G P Q F L G A	50
301	TAC CCC AAA CTG GAG GAG ATG ATG CTG CTC AAT GCC GGG GGA CCT CAG TTC CTG GGC GCC	
	S V P D G S G F N S T V E G A E Q F D H	70
361	TCA GTC CCT GAT GGC AGC GGC TTC AAT TCC ACG GTG GAG GGA GCT GAG CAA TTC GAT CAC	
	L T A D A F S E M S L S S E K A L V E S	90
421	CTA ACA GCA GAT GCC TTC TCT GAA ATG TCA CTG AGC AGT GAG AAA GCT TTG GTA GAA TCC	
	S Y A N Q T T R L P S L T Y T G R F S L	110
481	AGC TAT GCC AAC CAG ACC ACC AGA TTG CCA TCT CTA ACA TAT ACT GGT CGG TTC TCC TTG	
	E P A T N S S N T L W P E P L F S L V S	130
541	GAA CCT GCA ACC AAC AGC AGT AAT ACC CTA TGG CCA GAG CCT CTC TTC AGC CTT GTC AGT	

	G L V G M A N I S P S S A P S S S P S S	150
601	GGA CTT GTG GGG ATG GCC AAT ATA TCC CCC TCT TCT GCA CCT TCA TCT TCA CCG TCC TCA	
	S S S S S S S Q S P P L S C S V Q S N D	170
661	TCC TCC TCT TCA TCA TCA TCA CAG AGC CCC CCT CTG AGT TGC TCT GTA CAG TCA AAT GAC	
	S S P I Y S A A P T F P N S S S E I F P	190
721	AGC AGT CCC ATA TAC TCT GCA GCA CCA ACA TTT CCA AAT TCC AGC TCT GAG ATC TTT CCT	
	D H S P Q P F Q N A S I P Y P P P A Y P	210
781	GAC CAT TCA CCT CAG CCC TTC CAA AAT GCT TCC ATT CCA TAC CCA CCC CCA GCA TAC CCT	
	V S K T T F Q V P M I P D Y L F P Q Q Q	230
841	GTC TCA AAG ACT ACC TTT CAG GTG CCA ATG ATC CCA GAC TAT CTG TTT CCA CAG CAA CAG	
	G D V S L V S A D Q K P F Q A M E S R T	250
901	GGA GAT GTT AGC CTT GTA TCT GCA GAT CAG AAA CCC TTC CAG GCT ATG GAG AGC AGA ACC	
	Q Q P S L T P L S T I K A Y A T H T S Q	270
961	CAA CAG CCT TCT CTC ACA CCC CTG TCT ACC ATC AAG GCC TAT GCA ACC CAC ACT TCC CAG	
	D L K T I N S T Y Q S Q I I <u>K P S R M R</u>	290
1021	GAC CTC AAG ACT ATC AAC AGT ACA TAT CAA TCT CAG ATC ATC AAG CCA AGC AGA ATG AGG	
	<u>K Y P N R P S K T P</u> P H E R P Y G C P V	310
1081	AAA TAC CCA AAC CGC CCC AGT AAG ACA CCT CCT CAT GAG AGG CCA TAT GGT <u>TGC CCA GTT</u>	
	E S C D R R F S R S D E L T R H I R I H	330
1141	<u>GAG TCC TGT GAC AGG AGG TTC TCT AGA TCT GAT GAA CTG ACC AGA CAC ATC CGG ATC CAC</u>	
	T G Q K P F Q C R I C M R N F S R S D H	350
1201	<u>ACT GGG CAG AAG CCC TTC CAG TGC CGC ATA TGC ATG AGG AAT TTT AGC AGA AGT GAC CAC</u>	
	L T T H I R T H T G E K P F A C D I C G	370
1261	<u>TTA ACC ACT CAC ATC CGC ACA CAC ACA GGG GAG AAG CCG TTT GCC TGC GAC ATT TGT GGC</u>	
	R K F A R S D E R K R H T K I H L R Q K	390
1321	<u>AGA AAG TTT GCC AGA AGT GAT GAG AGG AAG AGG CAC ACT AAA ATT CAC TTG AGG CAA AAG</u>	
	D K K A D K A T P V S V A S P V S S Y S	410
1381	GAC AAA AAA GCA GAT AAA GCA ACA CCT GTC TCA GTT GCT TCT CCT GTG TCC TCA TAC TCT	
	P S A S T S Y P S P V P T S Y S S P V S	430
1441	CCA TCG GCG TCA ACA TCT TAC CCC TCT CCA GTG CCA ACT TCT TAT TCG TCA CCC GTT TCT	
	S S Y P S P V H S S F P S P T T G V T Y	450
1501	TCA TCT TAC CCA TCT CCA GTT CAC AGT TCC TTC CCA TCT CCC ACC ACA GGA GTG ACA TAC	
	P S V T S T F Q T H G I T S F P S S I M	470
1561	CCC TCA GTT ACC TCC ACC TTC CAG ACC CAT GGG ATC ACC AGC TTT CCC TCT TCT ATA ATG	
	T N A F S S P M S S A L S D M S L T Y S	490
1621	ACA AAT GCC TTC AGT TCG CCT ATG TCC TCA GCA CTT TCT GAT ATG TCA TTA ACA TAT TCC	
	P R T I E I W *	497
1681	CCA AGG ACA ATT GAG ATT TGG TAA GAC TTT AAT AAG ACT GAT GGG GGG GAG AAA AAA ATA	
1741	CAA ATG AAC AGG CGC AAT CTG AAG ACT TCC AAA GCA TGG TCT CAG AAT GGG TAT TAT TGA	
1801	TGA CCA ATT GAC TTT ACC AAG CAA GGC CAT TAT AAA CTG CTA AGC TTC GAA TGC CTA AGA	
1861	AAC TGC CAT TTT TAT TTT ACA TCC TTT TAA AAA AAA ACA GAC TTT ATT TGC ATG GTT	
1921	AAT TGA AAT AAT TTC AAC ATG ATC CTT TCA AAG ATC AAC TTT TAT TTG CAT AAA GGG ATT	
2081	TTT ACT CTA TAC ATA ATG TAT ATT GTA CAT GTG CAA GTT TTT TTT TCC GTT TTC TTT CTT	
2041	TTT TTT AAT TTT GGT ACT CTT GAT GTG AAA ATT TTG TTC TCC TTG CAT ATT CAT ATG GTA	
2101	TTA TTT GAA ATG AAT AGG ACT CTG TTT GTA AAT GGT ATC TAG TGA TTA TGC TAC CAT GAG	
2161	TTC TTA AGA ACA GCA CTT ATG TAT TTG AGC ATG CGT AAG AGT AAT GTT ACG TTT TAA GTT	
2221	CTA CTT TTT TTG TAT TCT TTT TCT TTT GTA AAT ATC ATC AGA TGG TAC TCT CAC ATG TCA	
2381	GTT GTT TTA TTT TCA AGT CTC AGT AAC TTG GTG CCT TTT TTG TGA AGC CTT GCT GAT GTC	
2341	TCG ACA CGT GTA TCT GCG TGA CCT GAT GCG TTG CAT CTA GCC TTA AGG TAA AAG GGA TTT	
2401	CTT TAA AGA ATG TAT AAG ACC TTT <u>AAA ATA AAA</u> AAT TTA AAA AAA CAC AGA AAA AAA GAT	
2461	ACA GAG CGG AAA ATT GAC AGC TTG AAG CAC AGC TTC GTT TCT GTA GAA TGT AAG CAA AAA	
2521	CTC AAA GTC TAT TTT TGT AAC TGA AAT GTA AAT TTA TAA ATA TAT ATT CCA AGA GTT GGA	
2681	ATG TTG TAG TTA CCT ACT GAG TAG GCA TGG ATT TTG TAT GTT ATA AAC ATG CAG CTC ATT	
2641	ATT TTG TGG TCC TTA TTT TTA CTT TGT AAT TGT GTT GGT TTA AAC AAA GTG ACT GTT TGG	
2701	CTT ACA ACA CAT TTG AAT GCG CTT TAC TGC CAA TGG GAT ATT TGG TGT ACA ACA TAT CCT	
2761	TCA GAA <u>AAA TAA AAT</u> ATA TAA AAT ATT TTA AAA AAA AAA AAA AA	2807

### 3.1.4 Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von Xegr-1 mit den homologen Proteinen anderer Vertebraten

Der Transkriptionsfaktor Egr-1 besitzt einen modularen Aufbau bestehend aus strukturell unabhängigen, funktionellen Domänen. Nach Gashler et al. (1993) läßt sich das Egr-1 Protein in folgende Bereiche gliedern: ① starke Aktivierung, ② Repression, ③+④ Kernlokalisierung, ④ DNA-Bindung und ⑤ schwache Aktivierung.



**Abb. 3-3 Funktionelle Domänen des Egr-1 Proteins.** Die starke Aktivierungsdomäne ① (ACT) umfaßt den N-Terminus und enthält zahlreiche Serine und Threonine. Es folgt eine kurze Region, über die eine Transkription durch Egr-1 reprimiert werden kann (②, REP). Die Domäne ③ (NLS) bezeichnet eine basische Region, die für die Kernlokalisierung notwendig ist. Die DNA-bindende Domäne ④ (DNA/NLS) umfaßt drei C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger und ist zum Teil an der Kernlokalisierung beteiligt. Eine schwächere Transaktivierungsdomäne ⑤ (ACT) ist im Serin/Prolin/Threonin-reichen C-terminalen Bereich des Egr-1 Proteins vorhanden (nach Gashler et al., 1993).

Die Proteinsequenzen von Maus (Lemaire et al., 1988) und Ratte (Milbrandt, 1987) sind zu 98% identisch und ähneln sehr stark dem humanen Egr-1 (92% Identität; Sukhatme et al., 1988). Daher ist der Übersichtlichkeit halber nur ein Vergleich der einzelnen Domänen von *Xenopus*, Mensch und Zebrafisch (Drummond et al., 1994) dargestellt (Abb. 3-4). Dabei fällt vor allem die hohe Konservierung der basischen Domänen ③ und ④ auf, die zu 96% bzw. 98% der des Frosches identisch sind. Die DNA-bindenden „Zinkfinger“ sind beim Frosch, beim Menschen, bei der Maus und der Ratte zu 100% identisch, während die Zebrafisch-Sequenz zwei konservative Aminosäuresubstitutionen aufweist. Die dritte Domäne ist von Matheny et al. (1994) und Gashler et al. (1993) als Teil einer zweigeteilten Kern-lokalisierungssequenz beschrieben worden. Diese könnte zusammen mit der DNA-Bindungsdomäne ein konserviertes Motiv in (EGR-) C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfingern darstellen (Gashler und Sukhatme, 1995). Außerhalb dieser beiden kombinierten Bereiche fällt die Ähnlichkeit stark ab. Die inhibitorische Domäne ② ist für die drei verglichenen Proteine nur noch zu 67% identisch; durch die spezifische Wechselwirkung mit Korepressoren der NAB-Familie (Russo et al., 1995; Svaren et al., 1996) kann die transkriptionelle Aktivierung durch Egr-1 reprimiert werden. Die für die NAB-Bindung essentielle Aminosäure Isoleucin (Russo et al., 1993; *Xenopus*: I<sup>261</sup>, siehe Kapitel 3.3.3.4) ist in allen Vertebraten-EGR Proteinen konserviert (Abb. 3-8). Die beiden flankierenden Aktivierungs



**1 (48%)**

MAVAKTEM.LVSPLQISDPFSSFPHSPTMDNYPKLEEMMLLNAGGPQFLG	49	X. laevis
--A--A--Q-M-----G-----SN-----		H. sapiens
--A-----LPA-----L.-----IM--SA-TP--N		D. rerio

A.....SVPDGSGFNSTVEGAEQ.FDHL	71	
-AGAPEGSGSNSSSSSSGGGGGGGSGN-SSSS-T--PQADTG--PYE--		
-TA.....PEGAVFGSG-PG--.----		

TADAFSEMSEKALVESSYANQTTRLPSLTYTGRFSLEPATNSSNTLW	121	
--ES-PDI-LNN--V--T--PS-----PI-----P--G----		
AG-TL--I-M.--P-SDQT-ST-.---PIS-----T-C--S--		

PEPLFSLVSLVGMANISPS.....SAPSSSPSSSSSSSSSQSP	160	
-----S-T-PPA-.....-SSAP--AA.--A-A----		
A-----INPPPA-IPSSSTQATHP-SSST-SIP-----TS-A		

PLSCSVQSNDSPIYSAAPTFPNSSEIFPDHSPQPFQ...NASIPYPPP	207	
----A-P-----TPNTD---EPQS-A-PGSAGTALQ----		
S-----HQSEPN-----YSSA-PD---ESG-N.-STTVGT-LQ-SSS		

**2**

AYPVSKT...TFQVPMIPDYLFPQQQGDVSLVSADQKPFQAMESRTQ QP	253	
---AA-G...G-----LG-GTP-----GL-----		
T--SA--CNPS-S-----T--SEI--PP---I-TQAG..--		

**(67%)****3 (96%)**

SLTPLSTIKAYATH.TSQDLKTINSTYQSQII KPSRMRKYPNRPSTPP	301	
-----F--QSG----AL-TS----L- -----		
A---H---F--QTG----SV...---L- -----		

**4 (98%)**

HERPYG CPVESCRRFRSRSDELTRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFRSDH	350	
-----A -----		
-----A ----T-----		

**5 (46%)**

LTHIRHTHTGKPFACDICGRKFARSDEKRRHTKIH LRQKDKKADKATP	399	
-----SVV		
-----E-----M-----E-GAT		

V...SVA.....SPVS.....SYSPSASTSYSPVPTSYSSPV	429	
A...-S-TSSLSSYP---ATSYSPVTT--PSP-T-----F--G		
AAVQ-SVSNISISAS----.....-PSP.I-----S.-FP---		

SSSYSPVHSSFPPTTGVTYPSVTSTFQTHGITSFPSSIMTNAFSSPMS	479	
--T-----G---SVAT--S--PPA-PAQ.VS-----AV--S--A.-		
N-C-S----T-Y---SIAT----A-----QVA----T-VAS-IY--VT		

SALSDMSLTYSPTIEIW	497	
-------------------	-----	--

TG----TA-F-----C	543	
------------------	-----	--

TP-P--QSAL----AD-C	511	
--------------------	-----	--

**Abb. 3-4 Sequenzvergleich der Egr-1 homologen Proteine von *Xenopus*, Mensch und Zebra-fisch.** Die funktionellen Regionen wurden entsprechend der Einteilung in Abb. 3-3 bezeichnet: ① starke Aktivierung, ② Repression, ③+④ Kernlokalisierung, ④ DNA-Bindung und ⑤ schwache Aktivierung Die an der Zink-Bindung beteiligten Cysteine und Histidine der C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger in der DNA-bindenden Domäne ④ sind fett hervorgehoben. Die für die von Korepressoren der NAB-Familie notwendige Aminosäure Iso-leucin (Russo et al., 1993) in der Domäne ② (*Xenopus* I<sup>261</sup>) ist durch Unterstreichen und Fettdruck markiert. Striche kennzeichnen identische Aminosäuren, Punkte stehen für eingefügte Zwischenräume. Für jede Domäne ist die Identität in Bezug auf alle drei Sequenzen angegeben. *Xenopus*, diese Arbeit; Mensch, Sukhatme et al., 1988; Zebrafisch (*D. rerio*), Drummond et al., 1994.

domänen ① und ⑤ sind nur noch zu knapp 50% identisch. Der Serin/Threonin-reiche N-Terminus wie auch die an Prolin/Serin/Threonin-reiche carboxyterminale Domäne sind erhalten geblieben. An zwei Stellen der aminoterminalen Domäne lassen sich jedoch Unterschiede feststellen: Die humane Sequenz besitzt eine Serin/Glycin-reiche Region, die weder in *Xenopus* noch im Zebrafisch vorhanden ist. Letzterer weist darüberhinaus eine Insertion aus 11 Aminosäuren auf, die in den beiden höheren Vertebraten nicht erhalten ist.

Der Vergleich der Egr-1 Proteinsequenzen von Frosch, Mensch und Zebrafisch zeigt deutlich, daß Xegr-1 das Homologe in *Xenopus* ist. Aufgrund der hohen Konservierung funktioneller Elemente wie z.B. der DNA-bindenden Zinkfingerdomäne ist es wahrscheinlich, daß Xegr-1 wie die homologen Egr-1 Proteine anderer Vertebraten einen sequenzspezifischen Transkriptionsfaktor darstellt.

### 3.1.5 Isolierung eines Xegr-3 Fragments

Ausgehend von der gleichen primären Amplifikation, die auch für Xegr-1 verwendet worden war (EGRall-2F/HC-2R auf genomischer DNA), konnte durch eine zweite PCR mit einem internen Egr-2 spezifischen Primer ein 243bp großes Fragment erzeugt werden (1.PCR: EGRall-2F/HC2R, 48°C, 40 Zyklen; 2.PCR: EGRall-2F/XL(K20)-3R, 52°C, 40 Zyklen). Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte im Vergleich mit den entsprechenden Fragmenten der homologen Gene in Maus und Mensch (beide Patwardhan et al., 1991), daß das Fragment zum EGR-3 Subtyp gehört.

Eine erste Charakterisierung mittels RT-PCR (EGR3[E1]-F/-R) ergab, daß entsprechende mRNAs in zahlreichen adulten Geweben enthalten sind, aber im Unterschied zu Xegr-1 während der Embryonalentwicklung erst zu einem späteren Zeitpunkt angeschaltet werden. In der 'whole mount' *in situ* Hybridisierung zeigte sich erst ab dem Neurulastadium ein definiertes Expressionsmuster.

### 3.1.6 Isolierung einer Xegr-3 Klons

Zur Darstellung eines Xegr-3 Klons wurden zuerst die Fraktionen verschiedener cDNA Bibliotheken mittels PCR überprüft. Von 48 Fraktionen einer *Xenopus* Nieren cDNA Bibliothek (Petersen, 1995) zeigte nur eine ein PCR-Signal für die Xegr-3 spezifischen Primer. Die verwendete Uni-ZAP-XR Phagenbibliothek war aus einer *Xenopus laevis* A6 Nierenzelllinie hergestellt worden und enthielt zum Zeitpunkt der Analyse 50.000 Primärphagen in einer Konzentration von  $1.5 \cdot 10^7$  pfu/ml. Die positive Fraktion wurde zur Anreicherung amplifiziert und anschließend – analog zur Isolierung von Xegr-1 – mittels der seriellen Verdünnungs- und Anreicherungsmethode analysiert. Nach der dritten Anreicherungsrunde wurde ausplattiert; von

acht isolierten Phagenplaques zeigte in der Kontroll-PCR nur ein Insert ein positives Signal. Aus dem angereicherten Einzelphagen wurden *in vitro* pBluescript-Phagemide exzisiert, aus denen das Plasmid samt Insertions-fragment isoliert wurde. Das gesamte enthaltene Fragment wurde sequenziert.

**Abb. 3-5 Nukleotidsequenz des Xegr-3 Klons und abgeleitete Aminosäuresequenz.** Am Rand sind die Positionen der Nukleotide (links) bzw. der Aminosäuren (rechts) angegeben. Die Aminosäuresequenz ist für den längsten offenen Leserahmen gezeigt. Die begrenzenden Stopkodons sind markiert (\*). Die C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger-Domäne ist doppelt unterstrichen und die an der Zink-Bindung beteiligten Cysteine und Histidine sind fett hervorgehoben. Das Polyadenylierungssignal (Pos. 4479) ist einfach unterstrichen. Für die Nukleotidregion 541-990 läßt sich ein Intron-Exon-Übergang beschreiben (s. Abb. 3-6). Demnach stellt der gezeigte Xegr-3 Klon wahrscheinlich eine nicht oder nur unvollständig gesplice Sequenz dar. Die Aminosäure Aspartat an Position 34 (D<sup>34</sup>; Fettdruck, doppelt unterstrichen) markiert den Start des zweiten Exons. Für die Vergleiche der Aminosäuresequenz wird daher nur die Aminosäuresequenz ab D<sup>34</sup> verwendet.

1	AAT TCG GCA CGA GAC AAA CCA AAC ATG TTA GGT CAC ATG AGC CAA TTA ACA GAC AGA TTT	
61	GTA TCT TTT ACT TCC ACG CTT CTT CCT GTT ACA GTT AGA GCT GCA GTA TTT CTG GTC AGG	
121	TGA TCT CTG AGG CAG CAC AAA GAC CAT CAC AAA ATG ATG GTT CAA GAC AAG AGA TGT AAA	
181	AGG GCA AGA TTT ACT TGT TTG TTT GAT AAG ATT CTT TAA TAT GCC ACT TAA TTT CAT ATA	
241	AAC TAT CTG TTG CTC AAG TAT TCA TTT TGG GAG TAT CGT TTT CCT TTA ATT CTG CCT GAG	
301	GAC ACC ATA ACC ATA AAT AAC CCA TAA TGC AAT TCA TCA GTT ATG AAG AGC TCA GTA CAT	
361	TTC TGG TTA AAT GAT TCA TTA ATA GGC CTG AAT TTG GAG CGA GGC CAC TAG GGT GGC AAA	
421	ATA TTT GGG GGC GGC ATG CTG CCC AGC CTC TTT CAG GGG AAC ACT CCC CAG TGT TCT GGC	
481	ACA TAC ACA CAT GCA CGT GTG CGC TCG CAG GGG GTA GTT CAG GCT AGG ACT GCG TGG CCT	
541	AGA GGT GCC TGC CTA GGA AAT CTG GCC CTG TTT ATT ATT AGG CTA GAA AAT TGG TGT GAA	
601	TTG CAA TTT TAA ATT AAA CAG TTA ATT TTG CAT GAA TAA TTA AAA AGA AAA ATT ATA AAT	
661	TGT GGT GTA AAA CAA ACA ATG TCC CTT CTA AGC AAG CCT TGC CTT GTA CTA ACT GTG TGG	
721	CTA AGG CAT GTG TTA AGG GCT TCC TTG CTC TGG AGT TGG CTG CAC TTC CCA TCA CTA AAA	
781	TAA AGT ACA GCT CTA GTA TAA ATG ACA ACA TGT AGC TGC TAT TTG TAT GGC TTT AAT AGT	
		* M H F L 4
841	GGG TGC CGT TCA GCA ATC ATT TTT GTG CAT AGT GTT AAA TGA GTC CTA ATG CAT TTT CTG	
	F Q S L R P I A K V I I N H G Q Y I L M 24	
901	TTT CAG AGC CTC AGA CCA ATT GCT AAG GTA ATA ATA AAT CAT GGA CAG TAT ATA CTC ATG	
	S V I L F L F P L <u>D</u> N V I D L G L S N D 44	
961	AGT GTC ATA TTG TTT CTT TTT CCT CTA GAT AAT GTG ATA GAC CTG GGC TTG AGC AAT GAC	
	K T S Q D L S Y S G T F Q P G N K T V T 64	
1021	AAA ACC TCC CAG GAT CTC TCC TAC AGT GGC ACG TTT CAG CCA GGT AAT AAG ACG GTC ACT	
	Y L G K F S F D S P S S W C Q E N I I S 84	
1081	TAT TTG GGA AAG TTT TCC TTT GAC TCA CCC TCC AGT TGG TGC CAG GAA AAT ATA ATT AGC	
	L M S T G I L G V P T S Q A T N A G G S 104	
1141	CTT ATG AGC ACT GGC ATC CTT GGT GTG CCC ACT TCA CAA GCA ACA AAT GCT GGA GGA AGT	
	G N G G S N G G L M G Q N Q S D V D S M 124	
1201	GGA AAC GGT GGA AGT AAC GGT GGC CTT ATG GGA CAA AAT CAA AGT GAT GTG GAT TCT ATG	
	F H A L P S Y A G C G D L Y H E Q V G F 144	
1261	TTT CAT GCC CTA CCA TCA TAT GCT GGC TGC GGA GAC CTG TAC CAT GAG CAA GTA GGC TTC	
	Q G G G M A P Y T S Q E Y S S A K Q S L 164	
1321	CAA GGA GGT GGC ATG GCA CCC TAC ACC TCC CAG GAA TAT TCA TCT GCC AAA CAG AGT TTG	
	D F P M I P D Y N L F H H N T E M P P V 184	
1381	GAC TTT CCT ATG ATA CCA GAC TAT AAT TTG TTC CAC CAC AAC ACA GAG ATG CCT CCA GTG	
	D Q K P F Q N M E A I R V N P P P I T P 204	
1441	GAC CAA AAG CCT TTT CAG AAC ATG GAG GCA ATA AGA GTC AAT CCA CCA CCC ATA ACA CCA	
	L E T I K A F K E K Q V L P S F V G M S 224	
1501	CTG GAA ACC ATT AAG GCA TTT AAG GAA AAG CAG GTT TTG CCC AGT TTT GTA GGC ATG AGC	
	H Q P S L I L K P I R P R K Y P N R P S 244	

1561	CAC CAA CCC TCA CTT ATC CTG AAA CCC ATC CGT CCC AGA AAA TAC CCC AAC CGT CCA AGT	
	K T P V H E R P H A C P A E G C D R R F	264
1621	AAA ACC CCT GTC CAT GAA AGG CCT CAT GCC <u>TGC CCT GCA GAA GGC TGC GAC CGT CGT TTC</u>	
	S R S D E L T R H L R I H T G H K P F Q	284
1681	<u>TCA CGC TCT GAT GAG CTG ACA CGC CAT CTG CGT ATC CAC ACG GGA CAC AAG CCC TTT CAG</u>	
	C R I C M R S F S R S D H L T T H I R T	304
1741	<u>TGT CGC ATC TGT ATG CGG AGT TTC AGC CGC TCC GAC CAC CTC ACC ACC CAC ATT CGC ACT</u>	
	H T G E K P F S C D F C G R K F A R S D	324
1801	<u>CAC ACC GGG GAA AAG CCC TTT TCT TGT GAT TTC TGT GGA CGC AAA TTT GCA CGT AGT GAT</u>	
	E R K R H A K I H L K Q K D K K G G D L	344
1861	<u>GAG AGG AAG CGA CAT GCA AAA ATC CAT CTC AAG CAA AAA GAC AAG AAA GGA GGG GAC TTG</u>	
	A V C S P S V G G A P V V T T C G *	364
1921	GCT GTC TGC TCA CCT TCT GTG GGT GGG GCA CCA GTT GTA ACC ACC TGT GGT TAA AGG GTT	
1981	ACT GTC ATG GGA AAA AAA AAT TCT TTG CCA AAA CAC ACC AGT TAA TAG TGC TGC TCC AGT	
2041	AGA ATT CTG CAC TGA AAT CCA TTT CTC AGA AGA GCA AAC AGA ATT TTT TAT ATT TAA TTG	
2101	TGA AAT CTG ACA TGG GGA TAG ACA TAT TGT CAG GTT CCC AGC TGC CCC CAG TCA TGT GAC	
2161	TTG TGT TTG GAT AAA CTT CAG TCA CTC TTT ACT GCT GTA CTG CAG TTT GGA ATG ATA TCA	
2221	CCC CCA CTA TCT TCC TCC CCC CAG CAG CCT AAC AAC AGA ACA ATG GGA AGG TAA CCA GAA	
2281	AGC AGC TCC CTA ACA CAA GAT AAC AGC TGC CTG GTT GAT CTA AGA ACA GCA CTC AGT AGT	
2341	TAA ATA CAG GTC CCA CCG AGA CAC ATT CAA TTA CAC TAA GTA GGA GGA ACA ACA GCC TGT	
2401	CAG AAA GCA GTT CCA TCC TAA AGT GCT GGC TCT TTC TGA AAT CAC ATG ACC AGG CAA AAT	
2461	GAC GTG AGA TGT TAT TAG ATA TTA GAA CTA AAA AAA ATA CAC TTG CTG GTT CAA GAA TAA	
2521	AAT GTT ATA TGG TAG AGT TAA TTA TTT GCA GAG TAA ACA ATG TCA TTT AGA AAT AAA AAC	
2581	TAC ACC ATA AAA ATC ATG ACA GAA TCC TTT TAA GGA CTG TTT CTG GCC AGC CCT GAG TTT	
2641	ATC TAA AAG TGA AGA AAA CAC ACG ATG CAT TCC TGC CTC AGT GAA ATG TGT TTA AAA GAA	
2701	CAT TCC CTG TGC ATT AAT TCC TGA ACA GAC ATT AGC TGA GCA TTG GTA TCG GTT AAA GAC	
2761	CTG CAG AGC ATT ACT CCT TTC TGT CAA GTG TTC TAT ACT GTA CTG CAT AAC ATT TTT CTA	
2821	TGC CCA CCC TTA ACA CGG CAG TGC ATT TTC ATC ACA CTC CTG CAT TAA TAT CCT GAG TGT	
2881	TTA ACT CCA ATG TGT ACC TTG CAG AGC ATG ACT TCA CCT GTT AGG CCA GGA TCC ACT GTG	
2941	TTC CTA GTA TGC TGT ACC AAC AGA ACA CTG CTC CAT CCC TTC TCT GTA TCC ACA CTG CAT	
3001	TAA TAG TGA CAT TAA GCC TAT TAT ACT TGC TCC ATG TAC AGT ATG TGC TCC TGT TAG AAG	
3061	AGT ACA GGG AAC TTG TGG TAA ATT CTA AAA ACA GGG TCC TAC TTT GTA AGG GCT TCT GGT	
3121	CCC TTA ATG CTG CCT AGA CAA GAT TCT GCT GCT GCT CGT ATA CTC CAA CTG TTA TAC CCC	
3181	AGG GTG CTT CTT ACC TAT GTA TCC CCA ATA TAG ACT CTT TCC CTG ACC TTT CTG TTC TCC	
3241	CAC TGG ACA TTA TTT TTT CAG AAC AAA ATT ACT CCT TTT CAA TAT CTG TCT CTC TCT GTC	
3301	TCT GTC TCT CTG TCT CTG TCT CTC TCT CTC TCT CTC TCT CTC TCT CTC TCT CTC AAT CTA	
3361	TCT TTC TAT CTA TCT ATC TAT CTA TCT ATC TAT CTA TCT ATC TAT CTA TCT ATC TAT CTA	
3421	TCT ATC ATC TAT CTA TCT ATC TAT CTA TCT ATC GAT CTA TCT ATC TAT CTA TCT ATC TAT	
3481	CTA TCT ATC TAT CTA ATC TCT CTC TAT CTA TCT CTC TTT CCA ACA GAT TCA ACA CCC TTT	
3541	AGT ATA TTT TCT TTC TCC TCT CTG AGA ATT ACA CTC TCC ATT CTC CTT TCT TAC TCT CAT	
3601	TTT TTT CTC TCT CTC TCA TAC ATG CCC CCC CTA CTT TTC TTT TAA CGT CTG TCA TAG AGT	
3661	TTT ATT GGG AAA AGA AAA CAG CTA CAG CTT GAG TCA CCC TGT GGA TGT GTG TGA GTG TGT	
3721	GGT GGT GGC TGT GAA CGT GTG ACA ATG TGG CAG TGG TTG TGT CTT GTG GGG TCA GTT CTA	
3781	TGG ATG TGG CTA GTC ATT TCA AGG CCT ATC CAC TAC ATG TTA ATA AGA TTA TCT GAA GCT	
3841	TCA TTT GGG GAT TAC ATT TTT ATC AAG ATA CAA GTT TAA TCC TGT AAT AAC TGT TCC AAG	
3901	ATC ACC ATG CCA GTA TGC ACT GGC CTG GCC GGT AAA AAT GAT GGC TGA TCC CAA TGT TAT	
3961	TAA TAG AGA AAA AAG ATA AAT ATA TAG GAA GGC TGG TAT TTT TTA CCA GAA ATG GTG GCA	
4021	GCC CTA CAT ATA GTA CAC CAT AAC CCT GTC CTT CCG TCT CAA TGT GGC ACC GTA TCA TTG	
4081	TCC TTA TTA TTC ATT ATT GAC TTG TTT GTC ATT CAT TTA ATT TCT TTC TTA CTC TTT GTC	
4141	ATC CTA TTC TTC CTT FAT GTT TTA TTC TCA CAG CTC AAG CTC AAA CTT TAT CCT GGT GCA	
4201	CAA TAA GCA AAA TGC GTT ATC TGT AAT CTC ATG TGC ATG CTC CAT CAT TTC CTT TTC TTG	
4261	TAT TTA ACT CAT TAT TCC CTA TGG TAG TAC CTG CTG AAC TAC TTC TGC TCG GCT GCA GAA	
4321	TTA GCA TCT GGT CAA GGT TTA GCG ATG GCA GGG CCC AGG GCA GAA AGG ACT TGT TCT ACT	
4381	TCT GTA AGA GAG GAA CTG CGG CTA TTG TGG GAC ACA GAG GCC AGA GAC AGT TCT TAA CCT	
4441	GCG GTT GTC TGG TTT TCA TTT ATC TTC TTT AAT TCC <u>CAA ATA AAC</u> ACA CAC TAT TTT ATC	
4501	TAT AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA A	4525

### 3.1.7 Xegr-3 Klon und Proteinsequenz

Die isolierte Xegr-3 Klon hat eine Länge von 4525 Nukleotiden. Der längste offene Leserahmen enthält in seinem 5'-Bereich als mögliche Startkodons ein ATG (Nukleotidposition 889), dessen Umgebung jedoch nicht mit der Kozak-Konsensussequenz übereinstimmt (Kozak, 1989). Weiter in 5'-Richtung ist der offene Leserahmen durch zahlreiche Stopkodons in allen drei Leserahmen unterbrochen. Ausgehend vom ersten Methionin ergibt sich eine mögliche Proteinsequenz von 361 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 40 kD. Im Vergleich dazu beträgt die Länge der humanen Egr-3 cDNA 4.3 kb und sagt ein Protein von 386 Aminosäuren und 42.6 kD Molekulargewicht voraus (Patwardhan et al., 1991). Wie die homologen Egr-3 Proteine weist auch die von dem Xegr-3 Klon abgeleitete Aminosäuresequenz ein Zinkfinger-Triplett der C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Struktur auf (Aminosäureposition 255-277, 285-305 und 313-333). Außerhalb der Zinkfinger-Domäne gibt es im Gegensatz zu Xegr-1 keine auffallendes Vorkommen bestimmter Aminosäuremotive. Im langen 3'-untranslatierten Bereich befindet sich an Position 4479 ein Polyadenylierungssignal (AAUAAA), das 19 Basen vor dem Poly(A)Schwanz liegt.

Ein Vergleich der genomischen Struktur verschiedener EGR-Subtypen zeigt, daß die typische Genstruktur aus zwei Exons besteht, die im 5'-Bereich des Gens durch ein Intron getrennt sind (Xegr-1, siehe Kapitel 3.4.3; Maus Krox20/Egr-2, Chavrier et al., 1988a,b; Ratte NGFI-A/Egr-1, Changelian et al., 1989; Mensch Egr-3, Patwardhan et al., 1991; Zebrafisch Egr-1, Drummond et al., 1994). Wie aus einem Vergleich der von dem isolierten Xegr-3 Klon abgeleiteten Aminosäuresequenz mit dem humanen Egr-3 Protein deutlich hervorgeht, existiert im Bereich 3' des Introns eine hohe Sequenzähnlichkeit (Abb. 3-7, Kapitel 3.1.8), während in 5'-Richtung keine Übereinstimmung zu erkennen ist. Dies könnte bedeuten, daß dieser Bereich entweder nicht entsprechend konserviert wurde, oder daß ein alternativer Startpunkt für Xegr-3 existiert. In diesem Fall wäre das klonierte Xegr-3 Fragment das Produkt einer nicht oder nur unvollständig gespleißten RNA. Diese Annahme wird durch die Tatsache gestützt, daß sich in der RT-PCR Analyse bei Verwendung eines 'Forward'-Primers (Egr3-F 535), der 5' zur potentiellen Spleißakzeptorstelle liegt, keine PCR-Produkte nachweisen ließen; dabei wurde RNA von Stadien verwendet, die in der 'whole mount' *in situ* Hybridisierung mit einer Xegr-3 'antisense' RNA-Sonde der 3' untranslatierten Region (UTR) Transkripte zeigten.

Darüber hinaus zeigt der Sequenzbereich an der Position des möglicherweise konservierten Introns Ähnlichkeit mit der Konsensussequenz eines Intron/Exon-Übergangs (Padgett, 1986). Eine theoretisch mögliche Spleißdonorstelle an Position 545 würde ein im Leseraster weiter 5' liegendes Methionin (Nukleotidposition 436) als Start des ersten Exons definieren, wobei die Sequenz um das alternative Startmethionin ebenfalls nicht der Kozak-Konsensussequenz (Kozak, 1989) entspricht (Abb. 3-6). Da jedoch der in der RT-PCR eingesetzte Primer Egr3-F 535 im Bereich dieses theoretischen ersten Exons liegt und keine Transkriptamplifikate nachweisbar sind, dürfte es sich bei dem isolierten Klon um eine nicht bzw. unvollständig gespleißte Sequenz handeln, die das zweite Exon sowie die gesamte 3'-UTR des *Xenopus* Egr-3 Gens enthält.

	Exon 1 [----- Intron -----]	Exon 2	
<b>Konsensus</b>	A G[gt aag t ...	pY <sub>10</sub> nca g]NN	
<b>Xegr-3 Fragment</b>	AGA G[GT GCC TGC ... TTT CTT TTT CCT CTA G]AT	(541-990)	
	Arg A	sp	

**Abb. 3-6 Theoretischer Intron/Exon-Übergang für das Xegr-3 Fragment.** In 5'-Sequenz des Xegr-3 Fragments existieren Bereiche, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Konsensussequenz für Intron/Exon-Übergänge (Padget, 1986) auf weisen. Demnach sind in dem isolierten Xegr-3 Fragment wahrscheinlich genomische Intron-Sequenzen enthalten. Die Aminosäure Aspartat (Asp, D<sup>34</sup>) stellt die erste Aminosäure des zweiten Exons dar.

### 3.1.8 Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von Xegr-3 mit den homologen

#### Proteinen anderer Vertebraten

Über die Proteine der Egr-3 Subfamilie sind weit weniger Informationen vorhanden als über Egr-1 und -2. Nur die Sequenzen für Mensch (Patwardhan et al., 1991; Mages et al., 1993), Ratte (Yamagata et al., 1994) und sowie eine partielle Maus cDNA (Patwardhan et al., 1991) sind bekannt. Da die Aminosäuresequenzen von Mensch und Ratte zu 98% identisch sind, wurde im folgenden Vergleich nur die humane Sequenz betrachtet. Die für den Vergleich in Abbildung 3-7 verwendete *Xenopus* Egr-3 Sequenz stellt die Aminosäuresequenz des längsten, nicht unterbrochenen Leserasters ab Aminosäure 34 (D<sup>34</sup>), d.h. ab Beginn des zweiten Exons dar.

Die Gesamtähnlichkeit der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Xegr-3 Klon und von hsEgr-3 liegt bei 72%. Zur besseren Übersicht wurde eine Einteilung in Domänen analog zum Egr-1 Protein vorgenommen (Abb. 3-3; Kapitel 3.1.4). Die Zinkfinger- und die Kern-lokalisierungsdomäne sind mit jeweils nur einem konservativen Aminosäureaustausch am höchsten konserviert (99% bzw. 96%). Die anderen Bereiche weisen Ähnlichkeiten von 59% - 64% auf. Der Grad der Sequenzähnlichkeit, die sich 3' des Introns in den Domänen ②-⑤ feststellen läßt, entspricht den im Vergleich von Egr-1 mit homologen Sequenzen ermittelten Werten (Abb. 3-4, Kapitel 3.1.4). Die in Egr-1 für die Bindung eines Korepressors der NAB-Familie notwendige Aminosäure Isoleucin (Russo et al., 1993) ist auch in *Xenopus* Egr-3 (I<sup>208</sup>) enthalten.

Der Vergleich der Aminosäuresequenz des zweiten Exons mit der Sequenz der humanen Egr-3 Proteins zeigt eine hohe Konservierung der funktionellen Domänen ② bis ⑤. Auch der von Exon 2 kodierte Bereich der ersten Domäne ist mit 59% gut konserviert. Daher ist anzunehmen, daß der isolierte Klon ein Fragment des Egr-3 homologen Transkriptionsfaktors in *Xenopus* darstellt.

<b>1 (59%)</b>		
.....DNVIDLGLS	42	X.laevis
-TGK-AEK-PVTMSLL-QLPDN-YPEEIPSA-N--SGSSDSVVHYNQMATE--M-I--T		H.sapiens
NDKTSQDLSYSGTFQ..PGNKTVTYLGKFSFDSPSSWCQENIISLMSTGILGVPTSQATN	100	
-E-PNPE----S--PA-----A-----N--D-----A-----PA....		
AGSGNGGSGGLMGQN.QSDVDSMFHALPSYAGCGDLYHEQVGF...QGGMAPYTSQE	156	
S-ALSTQT-TAS.-V-PP-G--EA-YP---P-SN-----S-P-S-HDP--NPGLA-SP-D		
	<b>2 (64%)</b>	
YSSAKQSLD...FPMIPDYNLFHHNTEMPV.DQKPFQNM <sup>208</sup> EAIRVN PPPITPLET <b>I</b> KAF	211	
-Q---PA--SNL-----Y--PND-GSIPEH----G-DP-----T-----		
	<b>3 (96%)</b>	<b>4 (99%)</b>
KEKQVLPSFVGMHQPSLIL KPIRPRKYPNRPSKTPVHERPHA <b>CPAEGC</b> DRRFRSDE	271	
-D--IH-G-GSLP.--P-T- -----L-----		
LTR <b>HLRIHT</b> GHKPFQ <b>CRIC</b> MRSFSRS <b>DHLTTHIR</b> TH <b>T</b> GEKPF <b>SCDFCGRK</b> FARSDER <b>KRH</b>	329	
-----A-----		
<b>5 (64%)</b>		
AK <b>I</b> H LKQKDKK...GG.DLAVCSPSVGGAPVVVTCG	361	
----E--AEK--APS-SSA-P-SL-----A	386	

**Abb. 3-7 Sequenzvergleich der Egr-3 homologen Proteine** von *Xenopus* und Mensch. Die Bezeichnung in funktionelle Regionen erfolgte entsprechend der Einteilung in Abb. 3-3. Die Cysteine und Histidine der C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger in der DNA-bindenden Domäne ④, die an der Zink-Bindung beteiligt sind, sind fett hervorgehoben. Die bei Egr-1 für die von Korepressoren der NAB-Familie notwendige Aminosäure Isoleucin (Russo et al., 1993) in der Domäne ② (*Xenopus* Egr-3: I<sup>208</sup>) ist durch Unterstreichung und Fettdruck markiert. Striche kennzeichnen identische Aminosäuren, Punkte stehen für eingefügte Zwischenräume. Die Identität innerhalb der einzelnen Domänen ist angegeben. *Xenopus*, diese Arbeit; Mensch, Parwardhan et al., 1991.

### 3.1.9 Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von Egr-1, -2 und -3 in *Xenopus laevis*

Die Klonierung einer Xegr-1 cDNA und eines Xegr-3 Fragments ermöglicht einen Vergleich der EGR-Familie innerhalb einer Spezies (Abb. 3-8). Die Proteinsequenz für Xegr-3 ist ab der Aminosäure Aspartat-34 (D<sup>34</sup>), die den Beginn des zweiten Exons darstellt (Abb. 3-6), gezeigt. Die Ähnlichkeiten der einzelnen Proteine untereinander liegen zwischen 47-52%. Die Gesamtidentität aller drei Proteine liegt bei nur 26%. Um eine genauere Differenzierung zu ermöglichen, wurde auch in diesem Fall die für Egr-1 beschriebene Gliederung in Domänen vorgenommen. Dabei zeigt sich, daß die für diese Familie charakteristische Struktur des Zinkfinger-Triplets mit 90-95% am stärksten konserviert ist. Die terminalen Regionen aller drei Proteine weisen dagegen nur geringe Ähnlichkeit auf. Der N-Terminus ist zu 12% identisch, die C-terminale Region zu 5%. Die basische Domäne ③, die einen Teil der Kernlokalisationssequenz darstellt, nimmt mit 49% eine Mittelstellung ein. Bemerkenswert ist ferner die Tatsache, daß die für die Bindung eines Korepressors notwendige Aminosäure Isoleucin (Russo et al.,

1993; Xegr-1, I<sup>261</sup>; Xegr-3, I<sup>208</sup>) trotz geringer Gesamtidentität der Repressionsdomäne (15%) erhalten wurde. Aufgrund der guten Konservierung der Kernlokalisierungs- und DNA-Bindungsdomäne stellen alle drei EGR-Zinkfingerproteine Transkriptionsfaktoren dar, die an die gleiche Erkennungssequenz binden können (Patwardhan et al., 1991; Swirnoff und Milbrandt, 1995).

### 1 (12%)

MAVAKTEMLVSP<sup>1</sup>LQISDPFSSFPHSPTMDNYPKLEEMMLNAGGPQFLGASVPDGGSGFNS 60 XEgr1  
 M-AKAVDK- . . . . . PVT-G--V-QIPEGF--G. -DST-P. -SVTI-PNVDLGGPLIQM- XEgr2  
 . . . . . XEgr3

TVEGAEQFDHLTADAFSEM<sup>2</sup>SLSEKALVESSYANQ<sup>3</sup>TTRLPSLT . . . YTGRFSLEPATN . . 115  
 G-TG . . . . . -GMISVDMNND-RSLDF--SSNYPLA-RTQPIA-M-KI--DHQYSGS  
 . . . . . -NVIDLGLSND-TSQDL--SGTFQPGNKTVT . . -L-KF-FDSPSSWC

SSNTLWPEPLFSLVSGLVGMANIS<sup>4</sup>PSSAPSSSPSSSSSSSSSSSSSSSSQSPPLSCSVQSNDS<sup>5</sup>SPIY 175  
 GW--EGIFN . . . . . AASLLGVP . . . . . C . . . . . T . . . . . NA . . . . . G--N . . . . . M-HPQ-DLE  
 QE-IIS . . . . . -M-TG.ILGVP.T-Q-TNAGG-GNG . . . . . G-NGGLMGQN.--DVD-.MF

SAAPTFFPNS<sup>6</sup>SS.EIFPDHSPQPFQNASI.PYPPPA.YPVSKTTFQV . . . PMIPDY . . LFP 227  
 HIYSPP-Y--CN--YQ-PLRF-CGSPTAASL---PS--SP-GASDGGMF-----SA---  
 H-L-SYAGCGDLYHEQVG . . . . . -GGGMA--TSQE.-SSA-QSLDF . . . . . .N--H

### 2 (15%)

.QQQGDVSLVSADQKPFQAMESRTQ Q.PSLTPLSTIKAYATH<sup>7</sup>TSQDLKTINSTYQSQ . . 282  
 P-C-R-. . . -H-. -R-. . . . . . P CPRHPS--S--RNFTLGG-SEG<sup>8</sup>PRLA-A-SP-NL  
 HNT . EMPP-. . . . . -N--AIRV NP-PI---E----FKEK . . -V--SFGM<sup>9</sup>SHQPSL

### 3 (49%)

### 4 (90%)

. . . . II KPSRMRKYPNRPSKTP<sup>10</sup>PPERPYG CPVESCRRRFSR<sup>11</sup>DELTRHIRIHTGQKPF 336  
 PLRP-L R . . . . . -V- . . . . . P --A-G- . . . . . H-  
 . . . . -L --I-P- . . . . . -V- . . . . . HA --A-G- . . . . . L- . . . . . H-

### 5 (5%)

QCRICMRNFSRSDHL.TTHIR<sup>12</sup>THTGEKPFACDICGRKFARS<sup>13</sup>DERKRHTKIH LROKDKKA 394  
 . . . . . Y . . . . . ER-N  
 . . . . . S . . . . . L . . . . . S-F . . . . . A . . . . . K . . . . . G

.DKATPVSVASPVSSYSPSASTSYSPVPTS<sup>14</sup>SYSSPVSSSYSPVHSSFPSP<sup>15</sup>TTGVTYPSV 453  
 . . S--AAWRQHV . . . . . -R--LKPQSGRDRQPCALLGPA<sup>16</sup>AHWD-IDPNR--\* . . . . . 421  
 GDL- . . . . -C--SVGGA-VVT-CG\*

TSTFQTHGITSF<sup>17</sup>SSIMTNAFSSPMSSALS<sup>18</sup>DMSLTYS<sup>19</sup>PR<sup>20</sup>TIEIW 497  
 . . . . . 421  
 . . . . .

**Abb. 3-8 Sequenzvergleich der EGR-homologen Proteine in *Xenopus laevis*.** Die funktionellen Regionen wurden entsprechend der Einteilung in Abb. 3-3 bezeichnet. Die an der Zink-Bindung beteiligten Cysteine und Histidine der C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger in der DNA-bindenden Domäne ④ sind fett hervorgehoben. Die Aminosäure Isoleucin, die von Russo et al., (1993) beim murinen Egr-1 als wichtig für Bindung von Korepressoren der NAB-Familie beschrieben wurde, ist in allen drei *Xenopus* EGR-Proteinen konserviert (Domäne ②; Xegr-1, I<sup>261</sup>; Fettdruck, unterstrichen). Striche kennzeichnen identische Aminosäuren, Punkte stehen für eingefügte Zwischenräume. Die Werte für die Identität aller drei Sequenzen sind für jede funktionelle Region gegeben. Xegr-1, -3, diese Arbeit; Xegr-2 (Xkrox-20), Bradley et al., 1992.



## 3.2 Untersuchungen zur Expression

Für die Untersuchung der zeitlichen Expression wurden RT-PCR Analysen auf Gesamt-RNA von *Xenopus* Embryonalstadien und adulten Geweben durchgeführt. Das räumliche Expressionsmuster, d.h. die Lokalisation der mRNA im Embryo, wurde durch 'whole mount' *in situ* Hybridisierung in Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien untersucht.

### 3.2.1 Zeitliches und räumliches Expressionsmuster des Xegr-1 Gens

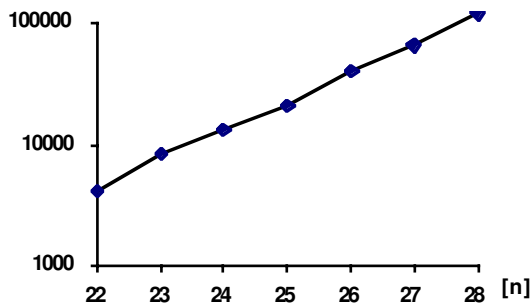
#### 3.2.1.1 Analyse der zeitlichen Xegr-1 Expression durch RT-PCR

Die Durchführung radioaktiver RT-PCR sollte zeigen, zu welchem Zeitpunkt der frühen Embryonalentwicklung Xegr-1 Transkripte vorhanden sind, und in welchen Organen des adulten Frosches die mRNA exprimiert wird.

Methoden wie RNase-Protektion und die Northern-Blot Technik besitzen den Vorteil, über eine markierte Hybridisierungssonde die entsprechende RNA direkt zu detektieren, d.h., diese Methoden stellen die tatsächlich vorhandene Menge spezifischer Transkripte dar. Demgegenüber beruht die RT-PCR Analyse auf der Amplifikation komplementärer DNA (cDNA), die zuvor durch das Enzym Reverse Transkriptase von der RNA transkribiert wurde. Durch die Amplifikation in der PCR können Transkripte aus sehr geringen RNA-Mengen nachgewiesen werden. Um Daten zu erhalten, die sich in ihrer Quantität relativ zueinander vergleichen lassen, müssen die Reaktionsbedingungen der PCR so gewählt werden, daß die Amplifikation proportional zur eingesetzten cDNA-Menge (bzw. der RNA-Menge) verläuft; d.h., nur wenn die der reversen Transkription nachfolgende PCR-Reaktion in einem linearen Bereich durchgeführt wird, können semi-quantitative Aussagen über die Menge des Transkripts gemacht werden. Zur Standardisierung wurde Histon H4 verwendet, da es während der frühen *Xenopus* Embryonalentwicklung konstitutiv exprimiert wird (Niehrs et al., 1994). Ein RT-PCR Ansatz für Histon H4 enthielt stets die gleiche Menge RNA wie der Ansatz des zu analysierenden Gens. Daher konnten die resultierenden Produktmengen miteinander verglichen werden. Die durchgeführten RT-PCR Analysen waren semi-quantitativ, da keine absolute Bestimmung der eingesetzten RNA-Menge erfolgte. Die Spezifität der RT-PCR war abhängig von den Sequenzen der Primer und den Zyklusparametern der PCR (z.B. Anlagerungs-Temperatur) und konnte durch Subklonierung der Produkte und deren Sequenzierung nachgewiesen werden.

Die Abbildung 3-9 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Variation der Zyklenzahl für eine radioaktive RT-PCR Analyse mit den Xegr-1 spezifischen Primern F-2 und R-513. Als 'Template' wurden 0.5 µg Gesamt-RNA (Stadium 10) in einem Gesamtvolumen von 100 µl eingesetzt. Die PCR-Reaktion erfolgte unter Standardbedingungen (3 min 95°C, 1 min 58°C, 1 min 72°C). Nach Abschluß der PCR-Reaktion wurde 1/5 des Ansatzes in einem 6% Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf einem PhosphorImager-Schirm (Molecular Dynamics)

autoradiographiert und digital ausgewertet. Als Ergebnis ist zu erkennen, daß die Produktzunahme im Bereich der eingesetzten Zyklen linear, d.h. proportional zur eingesetzten 'Template'-Menge verläuft. Die durchschnittliche Amplifikationsrate betrug 1.83 und entspricht der Zunahme der Produktmenge bzw. der eingebauten Radioaktivität je Zyklus.

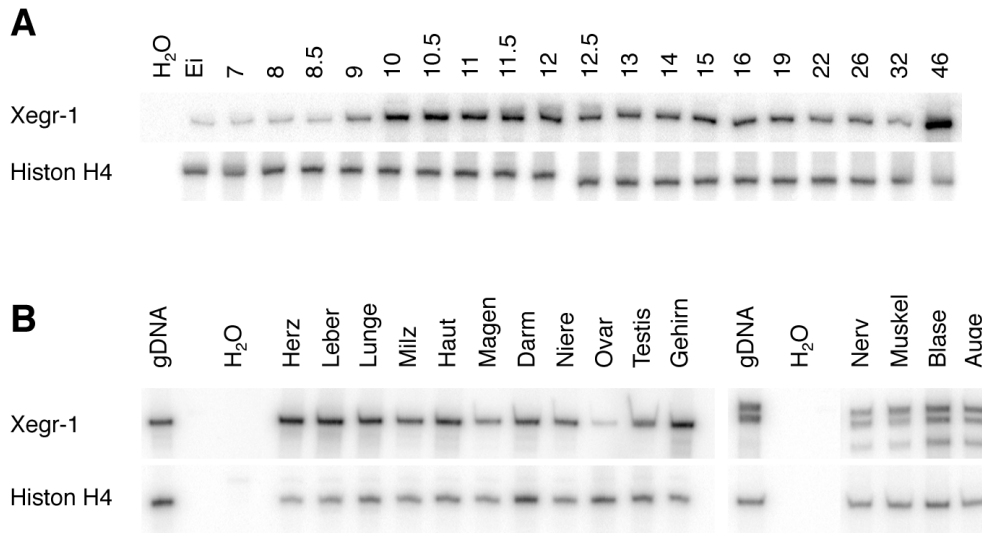


**Abb. 3-9 Variation der Zyklenzahl in einer RT-PCR Analyse für Xegr-1.** Die Anzahl der PCR-Zyklen  $n$  ist logarithmisch gegen die eingebaute Radioaktivität (relative Einheiten) aufgetragen und zeigt eine lineare Produktzunahme. In der Reverse-Transkriptase Reaktion wurden  $0.5 \mu\text{g}$  Gesamt-RNA eingesetzt. Die anschließende PCR erfolgte unter Standardbedingungen (3 min  $95^\circ\text{C}$ , 1 min  $58^\circ\text{C}$ , 1 min  $72^\circ\text{C}$ ;) für  $n$  Zyklen.

Für die Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Xegr-1 Expression wurde eine RT-PCR auf Gesamt-RNA Präparationen früher *Xenopus* Embryonalstadien durchgeführt (Abb. 3-10). Für Xegr-1 wurden in der PCR 28 Zyklen mit den Primern F2/R513 (499 bp Produkt) durchgeführt; für Histon H4 (H4-F/H4-R, 220 bp) wurden 20 Zyklen durchgeführt. Die verwendeten RNA-Präparationen waren frei von kontaminierender genomischer DNA (gDNA); Kontrollansätze enthielten  $\text{H}_2\text{O}$  statt RNA (Negativkontrolle) und gDNA (Positivkontrolle).

Xegr-1 Transkripte waren bereits maternal in der unbefruchteten Eizelle in sehr geringer Menge nachweisbar. Erst nach Beginn der zygotischen Transkription im Stadium 8 (Newport und Kirschner, 1982a, 1982b) konnte ein Anstieg der Expression detektiert werden; ab Stadium 9 steigt die Menge des Transkripts an und erreicht während der Gastrula-Stadien NF10.5 - NF11.5 das höchste Niveau. Im Verlauf der Neurulation nimmt die Expression leicht ab. Eine zweite Phase erhöhter Expression ist mit dem Erreichen des Kaulquappen-Stadiums (Stadium 46) zu erkennen. Für den adulten Frosch lassen sich Xegr-1 Transkripte in zahlreichen adulten Organen, wie z.B. Gehirn, Nerven, Herz, Muskel, Leber, Niere, Testis oder Lunge nachweisen. Abgesehen von der etwas schwächeren Expression im Ovar zeigten alle anderen Gewebe ein annähernd gleiches Niveau.

Die Analyse in der frühen Entwicklung ergab, daß Xegr-1 ein maternales Gen ist und durch ein biphasisches Expressionsmuster charakterisiert wird. Im adulten Tier konnte das Transkript ubiquitär verteilt in allen untersuchten Organen nachgewiesen werden. Da die in der RT-PCR detektierte Produktmenge innerhalb des linearen Amplifikationsbereiches der PCR direkt von der Zyklenzahl abhängig ist, war es möglich, durch eine niedrigere Zyklenzahl das maternale Signal von Xegr-1 zu „unterdrücken“ und den biphasischen Verlauf der späteren Expression stärker zu akzentuieren.



**Abb. 3-10 Analyse der Xegr-1 Expression durch RT-PCR.** Für die reverse Transkription wurden jeweils 0.5 µg stadien- oder gewebespezifischer Gesamt-RNA eingesetzt. (Xegr-1, Primer F2/R513, 28 Zyklen, 499 bp Produkt; Histon H4, Primer H4-F/-R, 22 Zyklen, 220 bp Produkt). **(A)** Xegr-1 Expression in *Xenopus* Embryonalstadien. Xegr-1 Transkripte sind bereits im Ei vorhanden und zeigen in der Embryonalentwicklung die stärkste Expression während der Gastrulation (NF 10 - NF 12.5). **(B)** Xegr-1 Expression in Geweben/Organen aus dem adulten Frosch. Xegr-1 Transkripte wurden in allen analysierten Geweben nachgewiesen. Für die sieben Proben auf der rechten Seite der Abbildung (gDNA, H<sub>2</sub>O, Nerv, Muskel, Blase, Auge und Oozyte) wurde in der PCR ein anderes Primerpaar verwendet. Die Amplifikate zeigten nach der Gelaufentrennung Doppelbanden. (Xegr-1, Primer F55/R332, 28 Zyklen, 299 bp Produkt, gDNA 24 Zyklen; Histon H4, Primer H4-F/-R, 24 Zyklen, 220 bp Produkt). gDNA, genomische DNA.

### 3.2.1.2 Analyse der räumlichen Xegr-1 Expression durch 'whole mount' *in situ*

#### Hybridisierung

Die RT-PCR Analyse hatte gezeigt, daß Xegr-1 Transkripte bereits in der frühen Embryogenese vorhanden waren. Um zusätzlich das räumliche Expressionsmuster des Xegr-1 Gens untersuchen zu können, wurden 'whole mount' *in situ* Hybridisierungen mit Embryonen unterschiedlicher Stadien durchgeführt. Für die 'antisense' RNA-Sonde wurde das Plasmid pBK-CMV/Xegr-1 mit Sal I (bzw. BamH I) linearisiert und *in vitro* transkribiert. Die resultierende RNA hatte eine Länge von 2.8 kb (bzw. 1.6 kb).

Die früheste Expression von *Xenopus* Egr-1 im Embryo ist im späten Blastula-Stadium (NF 9) als Färbung vereinzelter Gruppen von Zellen in der dorso-marginale Zone zu sehen. Diese verdichtet sich zu einer homogenen Fläche (NF 9.5). Das erste Auftreten der *in situ*-Färbung korreliert gut mit dem in der RT-PCR gezeigten Anstieg der Expression nach der MBT. Wenn sich in der frühen Gastrulation die dorsale Urmundlippe einstülpt (NF 10.25), sind die Transkripte ausschließlich in diesem Bereich, dem Organisator, lokalisiert. Mit fortschreitender Gastrulation dehnt sich das Xegr-1 Signal in Form eines Gradienten in der marginalen Zone (MZ) um den Blastoporus herum aus (NF 10.5), bis im Stadium 10.75 ein vollständiger Ring zu sehen

ist. Dabei bleibt die stärkste Expression auf der dorsalen Seite des sich einstülpenden Mesoderms erhalten. Gegen Ende der Gastrulation umgibt die Expressionsdomäne den Blastoporus, zeigt aber zusätzlich eine sehr schwache Färbung entlang der dorsalen Mittellinie, im Bereich des prospektiven Notochords (Chorda dorsalis). Zu Beginn der Neurulation (Stadium 13) nimmt die Xegr-1 Expression stark ab und bleibt auf eine kleine Region von Zellen um den sich zusammenziehenden Blastoporus begrenzt. Abgesehen davon sind während der Neurulation keine spezifischen Transkripte im Embryo nachweisbar. Ab dem Zeitpunkt des frühen Schwanzknospen-

Stadiums (Stadium 24) konnte eine Xegr-1 Expression in der Schwanzspitze lokalisiert werden, die in den folgenden Stadien aufrechterhalten wird. Anterior im Embryo sind ab Stadium 30 Transkripte im Bereich des Vorderhirns sichtbar. Zwischen zwei kleinen, bilateral symmetrisch angeordneten Arealen bildet sich im Verlauf der folgenden Stadien eine Verbindung, so daß die detektierte Struktur die Form eines Hufeisens annimmt.

Die 'whole mount' *in situ* Hybridisierungen und die RT-PCR Analyse zeigen für Xegr-1 in der frühen Gastrulation ein Organisator-spezifisches Expressionsmuster. Zudem legen die 'whole mount' *in situ* Hybridisierungen die Vermutung nahe, daß Xegr-1 zu den schwach exprimierten Genen gehört: Die Farbreaktion dauert 12-30 Stunden, unabhängig von der Länge der eingesetzten antisense-Probe und von der Art der Färbelösung. Die lange Färbungsdauer führt mit NBT/BCIP-Färbelösung zur Bildung unspezifischer Hintergrundfärbung, während die alternative Verwendung des BM-Purple Substrats über einen längeren Zeitraum die Integrität der Embryonen zerstört.

*Legende für die folgende Seite:*

**Abb. 3-11 Die räumliche Verteilung von Xegr-1 und Xegr-3 in der frühen *Xenopus* Embryogenese.** 'Whole mount' *in situ* Hybridisierungen an unpigmentierten Embryonen wurden mit Digoxigenin-markierten Xegr-1 (A-G) und Xegr-3 (H-K) 'antisense' RNA-Sonden durchgeführt.

**(A-G) Räumliche Verteilung von Xegr-1.** (A) Im Stadium 9.5 sind Transkripte in der dorsalen Marginalzone (DMZ) zu erkennen (animaler Pol oben, Blick auf DMZ). (B) In der frühen Gastrulation Expression im Organisator. Der Pfeil markiert die sich auf der dorsalen Seite einfaltende Urmundlippe. (animaler Pol, oben; dorsal, rechts). Das Signal breitet sich in einem Gradienten in der marginalen Zone (MZ) aus und bildet einen vollständigen Ring um den Blastoporus (C, animaler Pol, oben; dorsal, rechts und D, Blick auf vegetalen Pol). (E) Am Ende der Gastrulation wird Xegr-1 um den sich zusammenziehenden Blastoporus (dorsal, unten) exprimiert. Eine schwache Färbung ist entlang der dorsalen Mittellinie zu erkennen. (F) Im Bereich des Vorderhirns zeigen zwei symmetrische, mit einander verbundene Areale Xegr-1 Expression (Blick von oben auf den Kopf). (G) Expression in der Schwanzspitze.

**(H-K) Räumliche Verteilung von Xegr-3.** (H) Im Stadium NF23 sind zusätzlich zur Expression in den Somiten und im Rückenmark Transkripte im Bereich der Augenvesikel (Pfeil) zu erkennen. (I, J) In den Stadien NF26 und NF32 sind die Pronephrosanlage (Pfeil) bzw. drei stark angefärbte Strukturen im Pronephros (zwei Pfeile) gekennzeichnet. (K) Im Stadium 35 sind Xegr-3 Transkripte in Ganglien (ga), Hinterhirn (hh), Kiemenbogen (kb), Ohrbläschen (ob), Pronephros (embryonale Vorniere; pn) pronephrischer (png), Gang; Somiten (so) und Wirbelsäule (ws) nachzuweisen.

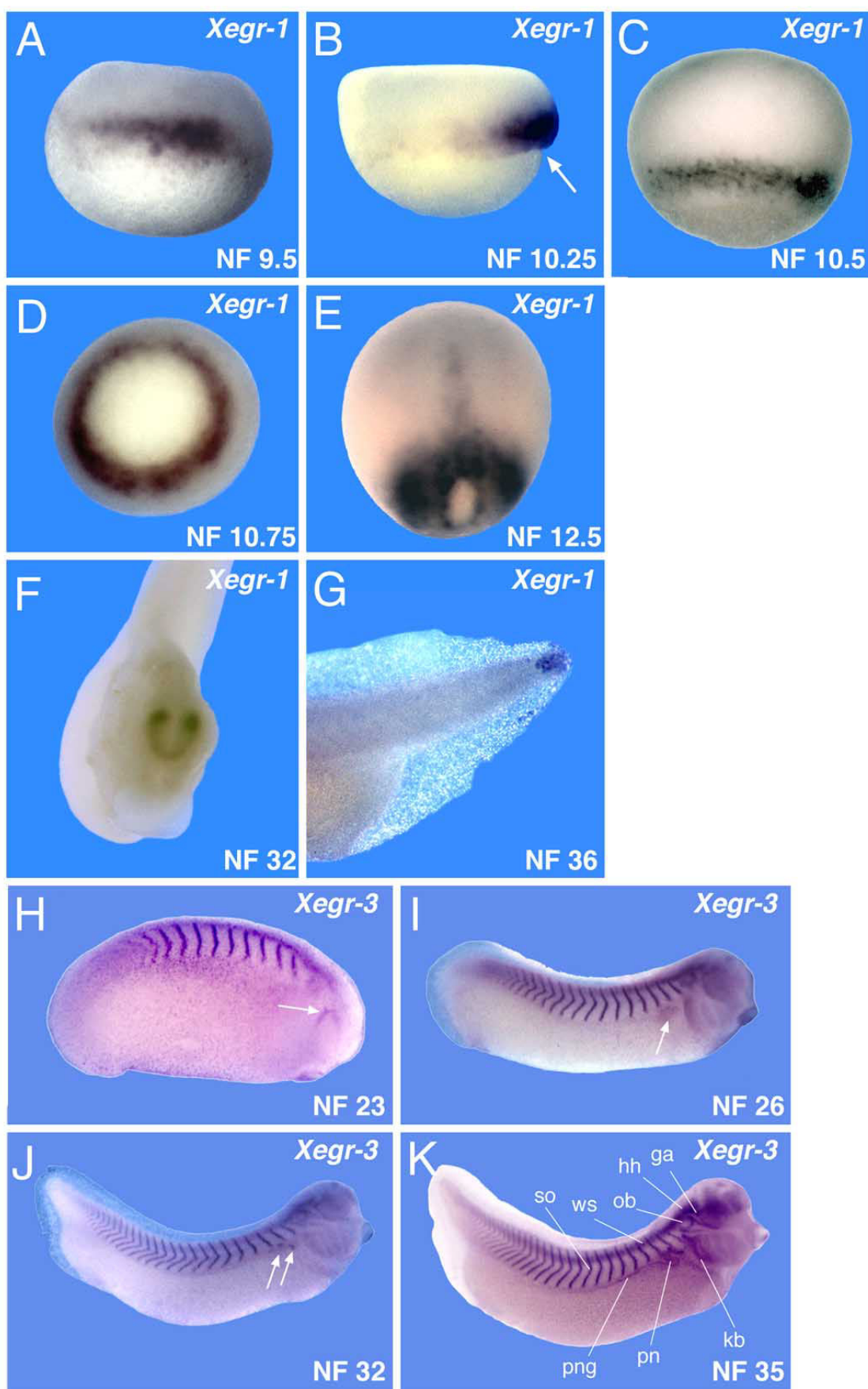
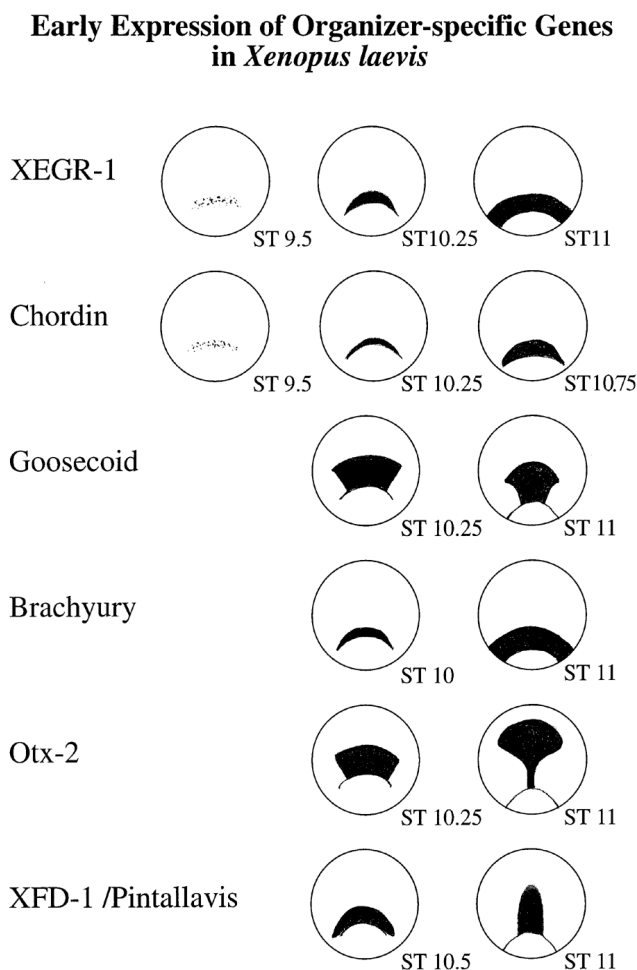


Abb. 3-11 Die räumliche Verteilung von *Xegr-1* und *Xegr-3* in der frühen *Xenopus* Embryogenese (Legende siehe vorhergehende Seite)

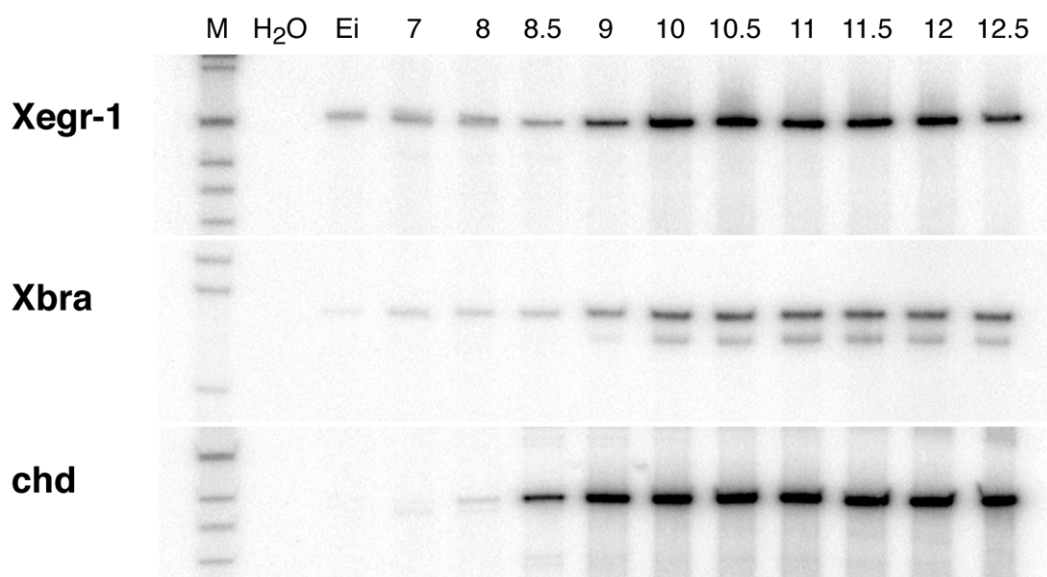
### 3.2.2 Vergleichende Expressionsanalyse an Dünnschnitten

Um eine weitere Charakterisierung vornehmen zu können, wurde die frühe Expression von Xegr-1 mit der anderer Organisator- bzw. Mesoderm-spezifischer Gene verglichen (Abb. 3-12).



**Abb. 3-12 Expression Organisator-spezifischer Gene in *Xenopus laevis*.** Die Darstellung zeigt einen Vergleich verschiedener Gene, die während der Gastrulation im Bereich des Spemann Organisers exprimiert werden. Die Gene Xegr-1 (diese Arbeit), Goosecoid (gsc, Cho et al., 1991, Brachyury (Xbra, Smith et al., 1991), Otx-2 (Xotx-2, Pannese et al., 1995) und XFD-1 (Dirksen und Jamrich, 1992) kodieren für Transkriptionsfaktoren; Chordin (chd, Sasai et al., 1994) kodiert für ein lösliches Protein. Das Expressions-muster von Xegr-1 in der frühen Gastrulation zeigt große Ähnlichkeit mit der Expression von Chordin und Brachyury.

In der schematischen Darstellung zeigen die Expressionsmuster von Xegr-1 und Chordin (chd) in der frühen Gastrulation sehr große Ähnlichkeit. Die ringförmige Expression von Xegr-1 im Stadium 11 ist mit der von Brachyury (Xbra) vergleichbar. Um zu überprüfen, ob der zeitliche Verlauf der beschriebenen Expressionen tatsächlich wie bei Xegr-1 ist, wurde eine vergleichende RT-PCR Analyse mit RNA embryonaler Stadien durchgeführt (Abb. 3-13).

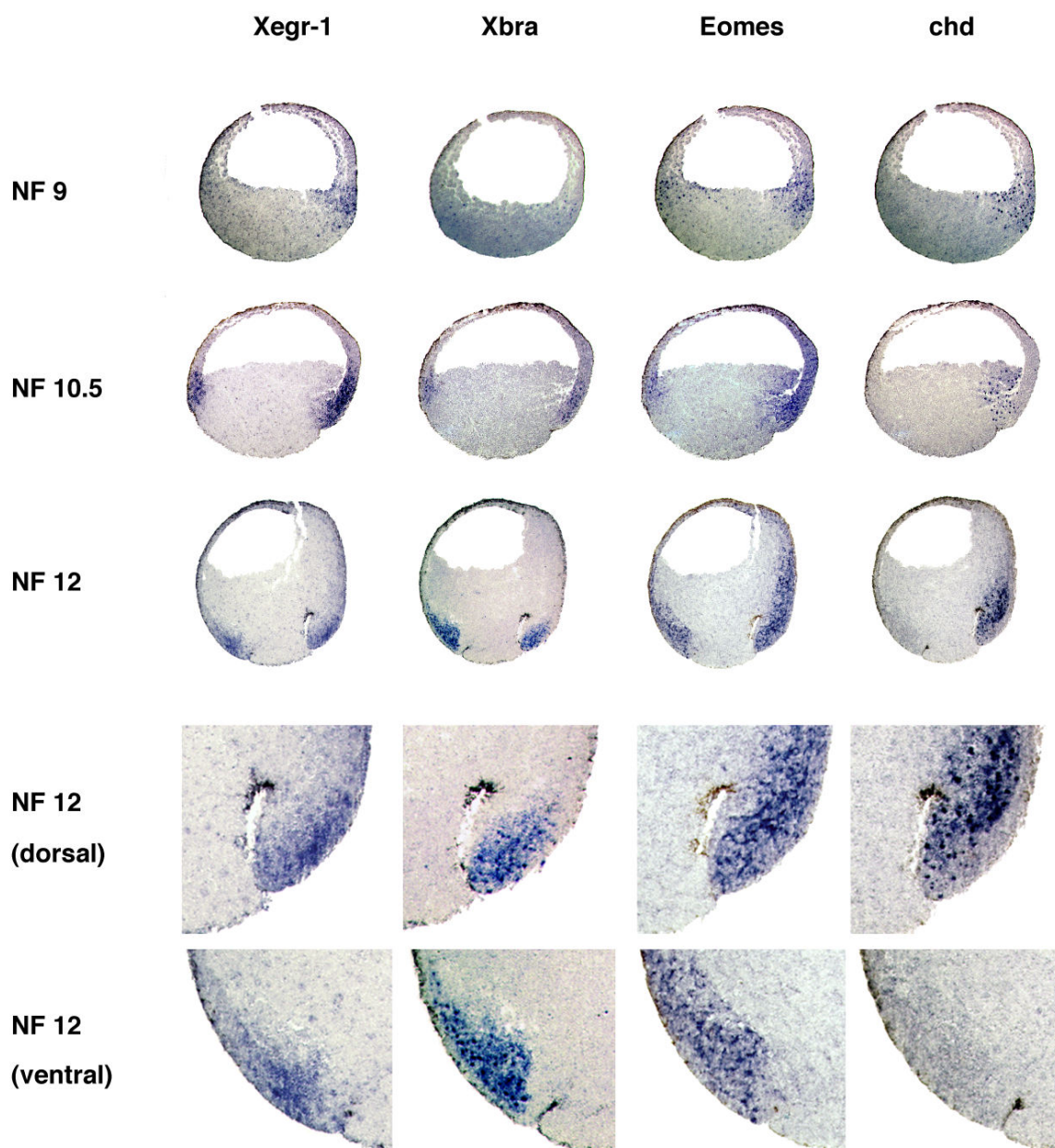


**Abb. 3-13 RT-PCR Analyse zur zeitlichen Korrelation der Organisator-spezifischen Gene Xegr-1, Brachyury (Xbra) und Chordin (chd) in *Xenopus*.** Für die reverse Transkription wurden jeweils 0.5 µg stadienspezifischer Gesamt-RNA eingesetzt. Die PCR-Amplifikation wurde mit jeweils 28 Zyklen durchgeführt. Primer, Anlagerungstemperaturen und Größe der PCR-Produkte für die untersuchten Gene: Xegr-1 (F2/R513) 60°C, 499 bp; Xbra (Xbra-F/-R) 56°C, 188 bp; chd (chd-F/-R) 60°C, 399 bp.

Es zeigte sich, daß mit Einsetzen der zygotischen Transkription nach der Mid-Blastula-Transition (Stadium 8) alle drei Gene „angeschaltet“ wurden. Dabei war unter den gewählten Reaktionsbedingungen (jeweils 28 PCR-Zyklen) Xegr-1 im Stadium 9 geringfügig stärker exprimiert als Xbra. Demgegenüber ließen sich Chordin-Transkripte bereits ab Stadium 8.5 deutlich nachweisen. Für einen Vergleich der spezifischen Amplifikation muß allerdings berücksichtigt werden, daß die Primerpaare nicht notwendigerweise die gleiche Effizienz in der PCR aufweisen. Für zwei andere als die in dieser Analyse verwendeten Primerpaare für Xegr-1 und Xbra konnte gezeigt werden, daß die PCR-Reaktion für Brachyury im Vergleich zu Xegr-1 ca. zwei Zyklen mehr erforderte, um eine entsprechende Produktmenge zu generieren (Krain, 1997).

Um die Lokalisation der Gene während der Gastrulation genauer zu bestimmen, wurde eine vergleichende Expressionsanalyse durchgeführt. Anhand von *in situ* Hybridisierungen an seriellen Dünnschnitten wurden die Transkriptionsfaktoren Xegr-1, Xbra und Eomesodermin sowie das sezernierte Molekül Chordin verglichen. Eomesodermin (eomes) ist ein kürzlich isoliertes Mitglied der T-Box Familie von Transkriptionsfaktoren, das eine Rolle in der Induktion und Differenzierung des Mesoderms spielt (Ryan et al., 1996). Für jedes Gen wurden aufeinanderfolgende Parallelschnitte (10 µm) später Blastula- sowie früher und später Gastrula-Stadien verwendet. In Abbildung 3-14 ist das Ergebnis für die entsprechenden Stadien (NF 9, 10.5 und 12) gezeigt.





**Abb. 3-14 Vergleichende Expressionanalyse von Xegr-1, Xbra, Eomesodermin und Chordin.** An seriellen Dünnschnitten des späten Blastula-Stadiums (NF 9) sowie des frühen (NF 10.5) und späten Gastrula-Stadiums (NF 12) wurden *in situ* Hybridisierungen mit Digoxigenin-markierten 'antisense' RNA-Sonden durchgeführt. In den beiden unteren Reihen sind Vergrößerungen der dorsalen bzw. ventralen Urmundlippe im Stadium 12 dargestellt. (Animaler Pol, oben; dorsal rechts).

Im späten Blastula-Stadium (NF 9) werden Xegr-1 und Chordin in der dorsalen marginalen Zone (DMZ) exprimiert. Demgegenüber ist die Expression von Eomesodermin sowohl dorsal als auch ventral lokalisiert. Zu Beginn der Gastrulation (NF 10.5) zeigte sich dorsal eine verstärkte Expression von Xegr-1, während auch im ventralen Mesoderm Transkripte zu sehen waren. Die



Transkripte von Xbra und eomes wiesen eine ähnliche Verteilung im dorsalen und ventralen Mesoderm auf, wobei die Expression von Xbra insgesamt schwächer war. Auch eomes zeigte eine dorsal stärkere Expression, die sich im Gegensatz zu Xegr-1 und Xbra bis weit in die animale Hälfte ausdehnte. Die Lokalisation von Chordin blieb auf weiter innen liegende Zellschichten der dorsalen Region beschränkt. Im weiteren Verlauf der Gastrulation (NF 12) blieben diese etablierten Expressionsmuster weitgehend erhalten. In der späten Gastrula waren die Transkripte aller vier untersuchten Gene in der DMZ zu sehen. Xegr-1, Xbra und eomes werden auch ventral exprimiert, allerdings waren die Signale in der ventralen marginalen Zone (VMZ) zum Teil schwächer als im Bereich der dorsalen Urmundlippe. Eine detaillierte Analyse des invaginierten Mesoderms ergab, daß Xegr-1 und Xbra im Zentrum des Organismators exprimiert sind. Während sich Xegr-1 dorsal und ventral in tieferen und oberflächlichen Zellschichten gleichmäßig verteilt nachweisen ließ, war Xbra in den äußeren Zellschichten etwas schwächer exprimiert als im Inneren des Organismators. In den äußeren Zellschichten der ventralen Region konnte im Gegensatz zu Xegr-1 keine Xbra Expression detektiert werden. Eomes ist gleichmäßig verteilt und weist dorsal eine größere Expressionsdomäne auf, die bis in die animale Hemisphäre reicht. Chordin wurde ausschließlich dorsal, aber nicht in der VMZ exprimiert. Es war primär in den tieferen Zellschichten des einwandernden Mesoderms nachzuweisen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß Xegr-1 und Xbra hinsichtlich der räumlichen Expression während der Gastrulation die größte Übereinstimmung zeigen.

### **3.2.3 Analyse der räumlichen Xegr-3 Expression durch 'whole mount' *in situ***

#### **Hybridisierung**

Für die 'whole mount' *in situ* Hybridisierungen mit Xegr-3 wurde das Plasmid pBstII- SK/Xegr-3 mit EcoR I (Nukleotidposition 2042) linearisiert und *in vitro* transkribiert. Die resultierende 'antisense' RNA-Sonde hatte eine Länge von 2.48 kb und beinhaltete fast die gesamte 3'-UTR des Xegr-3 Klon.

Xegr-3 Expression in der frühen Embryogenese konnte im Nervensystem (Hinterhirn, Ganglien, Rückenmark), den Somiten, den Sinnesorganen (Ohrbläschen, Augen), dem Exkretionssystem (Pronephros, pronephrischer Gang) und den Branchialbögen lokalisiert werden und ist in Abbildung 3-16 dargestellt. Im Stadium 23 ist eine Xegr-3 Expression in den Somiten und im Rückenmark gut zu erkennen, während die Transkripte um die Augenvesikel herum sowie im Bereich des zukünftigen Ohrbläschens nur ansatzweise nachzuweisen sind. Neben einer verstärkten Färbung am Rand des Ohrbläschens wird das Expressionsmuster in Stadium 26 durch schwache Expression im caudalen Branchialbogen und in der Pronephrosanlage unterhalb der vorderen Somiten charakterisiert. In der Epiphysenregion oberhalb der Augenvesikel ist eine

punktförmige Expression erkennbar, die in den folgenden Stadien erhalten bleibt. In Embryonen der Stadien 32 und 35 kann Xegr-3 zusätzlich in Bereichen des Hinterhirns und in drei stark gefärbten Punkten im Pronephros lokalisiert werden. Transkripte können auch bei der weiteren Entwicklung der embryonalen Vorniere beobachtet werden, wie die Expression im gewundenen tubulären System des Pronephros und in der auswachsenden Verlängerung des pronephrischen Gangs zeigt.

### 3.3 Untersuchungen zur Funktion

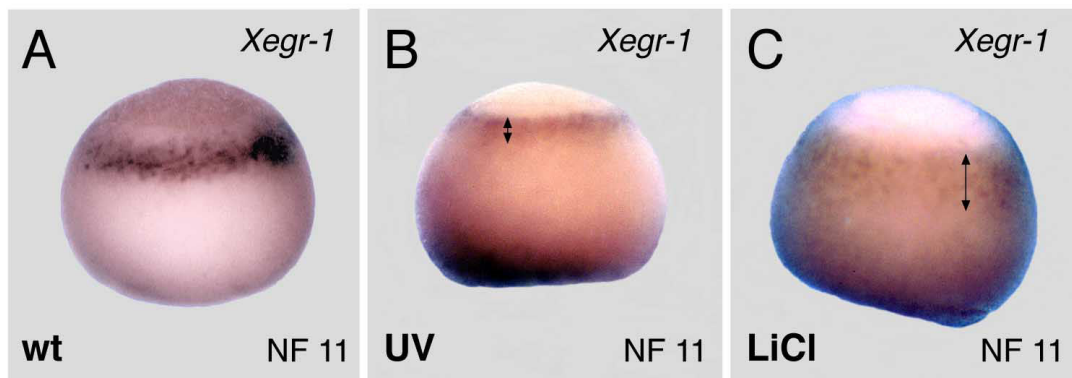
#### 3.3.1 Einfluß von UV- bzw. LiCl-Behandlung auf die Egr-1 Expression

Um zu untersuchen, ob die Expression von Xegr-1 in Zusammenhang mit der dorso-ventralen Gliederung des Gastrula-Mesoderms steht, wurde seine Expression in Embryonen analysiert, die zum einen durch UV-Bestrahlung ventralisiert (Scharf und Gerhart, 1983), zum anderen durch Behandlung mit LiCl dorsalisiert worden waren (Kao und Elinson, 1988).

UV-Bestrahlung des vegetalen Pols von frisch befruchteten Eiern verhindert die für die kortikale Rotation des Zytoplasmas notwendige Mikrotubuli-Anordnung. Wird die für die Spezifikation der embryonalen Achsen entscheidende Rotation gestört, resultiert dies in Änderungen des festgelegten Körperbauplans. Als Folge entwickeln sich ventro-posteriorisierte („ventralisierte“) Embryonen, bei denen die Entwicklung dorsaler Strukturen verhindert ist. Dorsal exprimierte Gene werden reprimiert; Goosecoid, chordin oder noggin zeigen in UV-behandelten Embryonen keine Expression (Cho et al., 1991; Sasai et al., 1994; Smith und Harland, 1992).

Lithium-Ionen blockieren den Phosphatidylinositol (PI)-Zyklus durch Inhibition der Inositol-Phosphatasen und ändern dadurch die Aktivität eines intrazellulären Signalwegs (Maslanski et al., 1992). Werden Embryonen im 32-64-Zellstadium in Lithiumchlorid-Lösung inkubiert, führt dies zu ektopischer Expression von im Organisator exprimierten Genen (z.B. goosecoid, Cho et al., 1991) und demzufolge zur Bildung dorso-anteriorisierter Phänotypen („Dorsalisierung“).

Xegr-1 wurde in ventralisierten und dorsalisierten Embryonen exprimiert. In den ventralisierten Embryonen (Stadium 10.5) war die Expression gegenüber unbehandelten Embryonen aber verzögert und reprimiert. Die Expression in der marginalen Zone um den Blastoporus bildete ventral noch keinen geschlossenen Ring und war in einem schmaleren Band, d.h. in einer geringeren Anzahl von Zellen nachweisbar (Abb. 3-15). Im Gegensatz dazu konnte bei LiCl-behandelten Embryonen eine ektopische Expression in der gesamten marginalen Zone detektiert werden. Die ringförmige Expressionsdomäne war stark in Richtung Äquator verbreitert und zeigte die Transkripte zur gleichen Zeit wie in den normalen Embryonen.



**Abb. 3-15 Xegr-1 Expression in ventralisierten und dorsalisierten Embryonen.** Embryonen des Stadiums 10.5 wurden in 'whole mount' *in situ* Hybridisierungen mit Digoxigenin-markierten Xegr-1 'antisense' RNA-Sonden hybridisiert. (A) Unbehandelter Embryo (wt). (B) Durch UV-Bestrahlung ventralisierter Embryo, der eine schmalere Xegr-1 Expressionsdomäne als in (A) aufweist. (C) In LiCl-behandelten, dorsalisierten Embryonen sind Transkripte im Vergleich mit (A) und (B) in einem größeren Bereich der marginalen Zone detektierbar. Die unterschiedliche Ausdehnung der Expressionsdomänen in den behandelten Embryonen ist durch Doppelpfeile gekennzeichnet.

### 3.3.2 Einfluß von Xegr-1 auf die Histologie stimulierter Animaler Kappen

Wachstumsfaktoren der FGF- und TGF $\beta$ -Familie können in dem (isolierten) ektodermalen Gewebe animaler Polkappen die Expression Mesoderm-spezifischer Gene induzieren (z.B. Smith et al., 1987). Anhand animaler Polkappen-Explantate ('Animal Caps') sollte analysiert werden, ob Xegr-1 einen Einfluß auf die induzierte Mesodermentwicklung besitzt.

Die Zellen des animalen Pols sind in einem bestimmten Zeitfenster, von der Mitte der Blastula bis zur Gastrulation, kompetent für Mesoderm-induzierende Signale. Durch Koinjektion von synthetischer mRNA der zu analysierenden Faktoren ins 2- bis 4-Zell-Stadium (vor Explantation der Polkappen) bzw. Inkubation in der entsprechenden Proteinlösung (nach Explantation) ließ sich prüfen, ob die Induktion mesodermaler Gewebe durch diese Signalmoleküle von Xegr-1 beeinflusst wird. Induzierte animale Kappen bilden in Abhängigkeit von Art und Konzentration des induzierenden Faktors verschiedene Arten mesodermalen Gewebes aus (Green et al., 1992). Nach Fixierung der Kappen wurden durch die Abt. Prof. Grunz (Gesamthochschule Essen) gewebespezifische histologische Färbungen durchgeführt, Schnittpräparate hergestellt und ausgewertet. Alle drei eingesetzten Mesoderm-induzierenden Faktoren zeigten in den histologischen Präparaten die erwarteten Effekte (Activin, Moriya und Asashima, 1992; bFGF, Kimelman und Kirschner, 1987; BMP-4, Dale et al., 1992; BMP-4/Activin, Jones et al., 1992). Dabei zeigten die Activin induzierten animalen Kappen eine deutliche, für dorsales Mesoderm typische Elongation.

Unbehandelte animale Kappen entwickelten sich zu ektodermalem Gewebe („ciliated epidermis“; A; Tab. 3-1). Diese atypische Epidermis bildet den Grundzustand, zu dem die Zellen des

animalen Pols in Abwesenheit Mesoderm-induzierender Signale differenzieren. Die Explantate von Embryonen, die mit synthetischer Xegr-1 mRNA (2 ng/Embryo) injiziert worden waren, verhielten sich wie die unbehandelten Kontrollen und entwickelten sich zu atypischer Epidermis (B). Das bedeutet, daß Xegr-1 in der eingesetzten Konzentration nicht in der Lage ist, in den Zellen isolierter animaler Kappen die Bildung mesodermaler Strukturen zu induzieren.

Injektion		Inkubation		Präp.	Histologie
Xegr-1	BMP-4	bFGF	Activin		
ng	ng	ng/ml	ng/ml		
-	-	-	-	A	atypische Epidermis ("default state")
2	-	-	-	B	atypische Epidermis
-	-	100	-	C	Mesenchym, Coelomepithel, Blutzellen, wenig Muskel, wenige Blasen (typischer FGF-Effekt)
2	-	100	-	D	wie in C, Blutzellen, Coelomepithel, wenig Muskel, wenige Blasen, etwas weniger Mesenchym als in C
2	-	10	-	E	wie in D, mit weniger Coelomepithel, mehr atyp. Epidermis
-	0.4	-	-	F	3/5: atypische Epidermis, 2/5: Blasen, Coelomepithel, wenige Blutzellen
0.5	0.4	-	-	G	atypische Epidermis
1	0.4	-	-	H	atypische Epidermis
2	0.4	-	-	I	atypische Epidermis, kein Coelomepithel
-	-	-	25	J	viele Somiten, gestreifte Muskulatur, etwas „neural“, Chorda
2	-	-	25	K	wie in J, Somiten, Chorda, etwas „neural“
-	0.4	-	25	L	atypische Epidermis mit Blutzellen, 4/5 homogen, 1/5 Coelomepithel, Muskel
2	0.4	-	25	M	atypische Epidermis mit Blutzellen, wenig Muskel, wie K
-	0.4	-	12.5	N	atypische Epidermis mit Blutzellen
2	0.4	-	12.5	O	atypische Epidermis geht z.T über in Blasenwand, Blasen incl. Blutzellen, kein Coelomepithel

**Tab. 3-1 Histologie animaler Kappen, die mit Mesoderm induzierenden Faktoren (bFGF, Activin und BMP-4) und Xegr-1 behandelt worden waren.** Animale Polkappen wurden im frühen Gastrula-Stadium isoliert und bis zur späten Gastrula inkubiert. Xegr-1 und BMP-4 wurden als mRNA in beide Blastomeren des 2-Zell-Stadiums injiziert. Die Inkubation mit bFGF und Activin erfolgte im Anschluß an die Isolierung der animalen Kappen. Präp.: Präparat (je 5 Stück).

Die Inkubation in bFGF induzierte mesodermale Gewebe ventralen Charakters (C), vor allem Blut und Bindegewebe/Coelom (sekundärer Hohlraum). Wurden animale Kappen Xegr-1 injizierter Embryonen mit bFGF inkubiert, so konnte im Vergleich mit der Mesoderm-Induktion durch bFGF allein keine veränderte Differenzierung des Gewebes beobachtet werden (D). Auch bei Verwendung einer zehnfach geringeren bFGF-Konzentration entwickelte sich ein für bFGF-Induktion typisches Mesoderm ventralen Charakters (E). Ein Einfluß auf die FGF induzierte Mesoderm-Induktion durch Xegr-1 wurde nicht beobachtet. Die Injektion von BMP-4 mRNA (0.4 ng/Embryo resultierte in einer nur schwach ausgeprägten Ventralisierung des Gewebes. 2/5 der Präparate differenzieren zu blasenhaltigem Coelomepithel und nur wenigen Blutzellen, während 3/5 der Explantate atypische Epidermis bildeten (F). Isolierte animale Kappen, denen BMP-4 und Xegr-1 koinjiziert wurden, entwickelten sich zu atypischer Epidermis (G, H), die im Fall der Präparation I Blutzellen enthielt. Da aber die injizierte Konzentration an BMP-4 bereits allein nicht ausreichte, um eine einheitliche Ventralisierung in allen untersuchten Explantaten zu

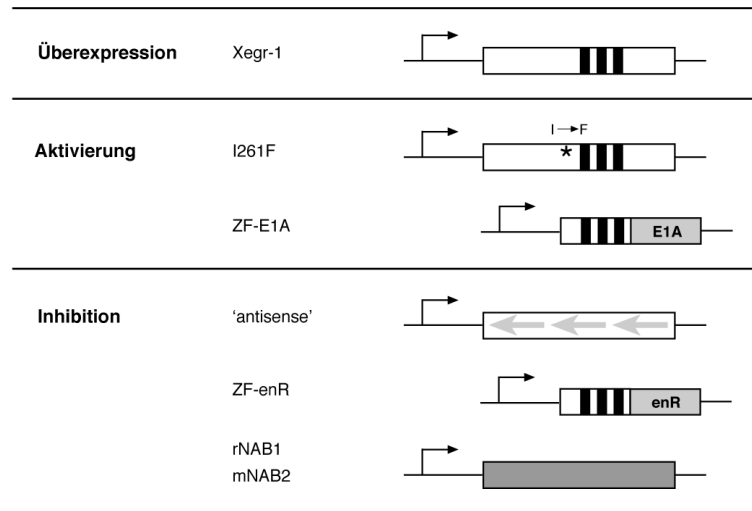
induzieren (F), kann daraus nicht geschlossen werden, daß Xegr-1 in der Lage ist, der BMP-4 abhängigen Ventralisierung animaler Kappen entgegenzuwirken. Wurden die isolierten Polkappen in 25 ng/ml Activin inkubiert, konnten in den Präparaten Somiten und Muskeln (intermediäres Mesoderm), sowie Chorda und einige „neurale“ Strukturen nachgewiesen werden (J). Wurden mit Xegr-1 RNA injizierte Embryonen in Activin inkubiert (K), zeigten die Explantate im Vergleich mit den nur Activin-behandelten animalen Kappen (J) keine Änderung in der Histologie. Dem dorsalisierenden Effekt des Activins konnte durch Koinjektion von BMP-4 entgegengewirkt werden (L, N). Dabei zeigte sich, daß die BMP-4 Konzentration, die zuvor für eine einheitliche Ventralisierung der Explantate nicht ausreichend war (F), genügte, um die Activin-induzierte Differenzierung zu dorsalen Merkmalen zu verhindern und Blutzellen (ventrales Mesoderm) zu induzieren. Eine Koinjektion von Xegr-1 führte zu keiner signifikanten Änderung der Differenzierung animaler Polkappen-Zellen (M, O).

Die histologische Untersuchung stimulierter animaler Kappen ergab keinen Anhaltspunkt dafür, daß Xegr-1 in den isolierten Explantaten in der Lage war, einer Induktion ventralen Mesoderms (bFGF oder BMP-4) oder dorsalen Mesoderms (Activin) entgegenzuwirken; eine Mesoderm-induzierende Aktivität von Xegr-1 konnte nicht beobachtet werden.

### **3.3.3 Versuch einer funktionellen Charakterisierung von Xegr-1 durch RNA-Injektionen in Embryonen**

Das Zinkfinger-Protein Xegr-1 gehört zu einer hochkonservierten Subfamilie von Transkriptionsfaktoren. Das frühe Expressionsmuster mit dem von der DMZ ausgehenden ringförmigen Gradienten in der MZ um den Blastoporus erlaubte eine Einordnung in die Gruppe Organisatorspezifischer Gene. Um zu überprüfen, ob diese charakteristische Lokalisation eine funktionelle Bedeutung in der frühen Embryonalentwicklung hatte, wurden Mikroinjektionsexperimente durchgeführt. Dabei wurde *in vitro* transkribierte mRNA in einzelne Blastomeren des 2-Zell- bis 64-Zell-Stadiums injiziert, die dann von der zytoplasmatischen Translationsmaschinerie in das entsprechende Protein übersetzt wurden. In den injizierten Zellen und deren Tochterzellen konnte das Protein dann seine Funktion ausüben und – möglicherweise – mit den frühen Entwicklungsprozessen interferieren.

Drei unterschiedliche Ansätze von RNA-Injektionsexperimenten wurden vorgenommen: Überexpression, Aktivierung und Inhibition (Abb. 3-16).



**Abb. 3-16 Strategien zur Analyse der Xegr-1 Funktion durch RNA-Injektionen in *Xenopus* Embryonen.** Für eine ektopische Expression wurde sythetische mRNA injiziert, die die gesamte kodierende Region des Xegr-1 Gens enthielt. Schwarze Balken kennzeichnen Zinkfinger-Motive. Zur Aktivierung wurde eine mutierte Xegr-1 Version verwendet, die eine durch Punktmutation herbeigeführte Aminosäuresubstitution (I<sup>261</sup>→F) aufwies und die Bindung von Korepressoren der NAB-Familie (Russo et al., 1993) verhindern sollte. Ein weiterer Ansatz bestand in der Injektion von RNA, die für ein Fusionsprotein aus der DNA-Bindungsdomäne von Xegr-1 und der Transaktivierungsdomäne des Adenovirus E1A kodiert (ZF-E1A). Analog wurde versucht, die Funktion von Xegr-1 zu inhibieren, indem RNA eines Konstrukts injiziert wurde, bei dem die DNA-bindende Zinkfingerdomäne mit der Repressionsdomäne des engrailed Proteins fusioniert war (ZF-enR). Die Injektion von 'antisense' Xegr-1 RNA sollte durch Wechselwirkung mit den endogenen Transkripten die Bildung des Xegr-1 Proteins unterdrücken. Eine andere Möglichkeit die Funktion des Xegr-1 Proteins zu inhibieren, bestand in der Injektion von RNA, die für Proteine der NAB-Familie kodiert (rNAB1, mNAB2). Durch ektopische Expression dieser Korepressoren sollte die transaktivierende Aktivität von Xegr-1 eingeschränkt werden.

### 3.3.3.1 Überexpression

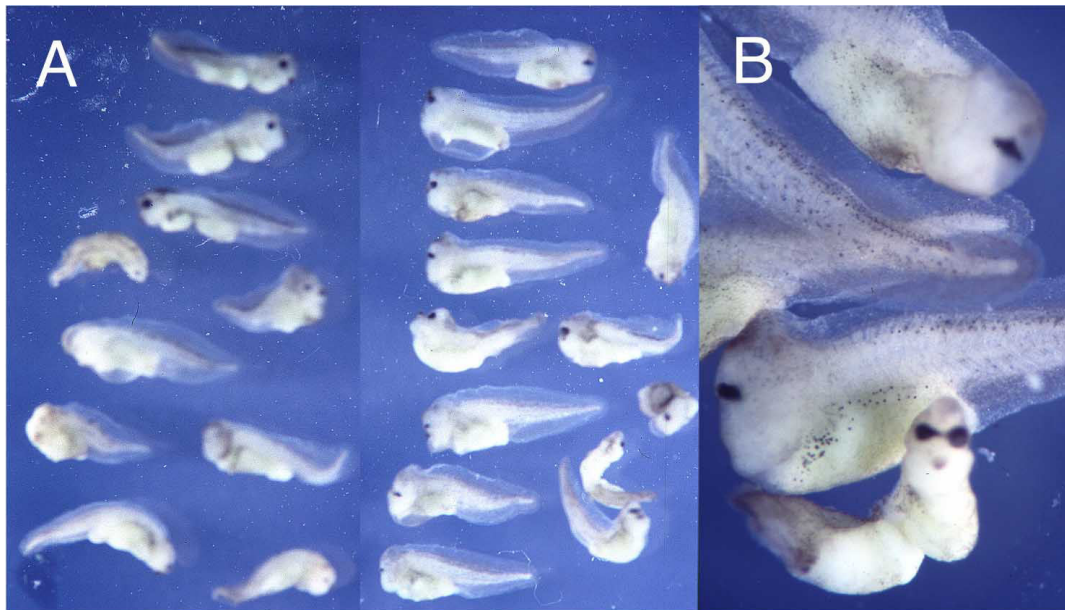
Durch Überexpression der für das Xegr-1 Protein kodierenden mRNA in verschiedenen Regionen des sich entwickelnden Embryos sollte gezeigt werden, ob das Protein *per se* einen Effekt auf die Entwicklung hat. Als Templates für die *in vitro* RNA-Synthese dienten die Plasmide pCS2+MT/EGR1-ORF und pCS2+NLS/EGR1-ORF. Die Injektionen erfolgten in unterschiedlichen Konzentrationen (0.2-5 ng/Embryo) in definierte Blastomeren (1/2, 2/2, 2/4, 4/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64) und Lokalisationen (animal, dorsal, ventral, MZ). Es konnten keine signifikanten Abweichungen vom Phänotyp nicht injizierter Embryonen beobachtet werden.

### 3.3.3.2 Aktivierung

Proteine der NAB-Familie von transkriptionellen Repressoren können an die Repressionsdomäne der EGR-Transkriptionsfaktoren binden und dadurch deren Aktivität vermindern (Russo et al., 1995). Die Einführung einer Punktmutation in der EGR-Repressionsdomäne führte zu einem Austausch der für die NAB-Bindung essentiellen Aminosäure Isoleucin → Phenylalanin (Ratte: I293F) und resultierte in einem 15-fachen Anstieg der transkriptionellen Aktivität von Xegr-1 (Russo et al., 1993). Eine analoge Substitution wurde mittels gerichteter Mutagenese in das

*Xenopus* Egr-1 eingeführt (I261F, siehe 2.1.21). Diese Mutante stellte aufgrund der Inhibition der Repression durch ein NAB-Protein eine „aktivierte“ Version des Xegr-1 Proteins (‘gain of function’) dar und wurde in Form von synthetischer mRNA injiziert.

Für die mRNA-Synthese wurde das Plasmid pCS2+NLS/I261F eingesetzt. Die Injektion erfolgte in unterschiedlichen Konzentrationen (0.5-4 ng/Embryo) in definierte Blastomeren (2/2, 2/4, 4/4).



**Abb. 3-17 Effekte der Xegr-1 Punktmutante I<sup>261</sup>F in *Xenopus* Embryonen.** Embryonen, denen RNA, die für die Xegr-1 Punktmutante I<sup>261</sup>F kodiert, injiziert worden war, zeigten Augen- und Achsendefekte. (A) Die Embryonen weisen verschiedene Veränderungen der Körperachse auf (verkürzte/gekrümmte Achsen, ventrale Einschnürungen). Die Augen sind z.T. reduziert, fusioniert oder fehlen ganz. (B) Embryonen mit unterschiedlich stark fusionierten Augen.

Die Injektion von 2 ng/Embryo in den animalen Pol führte zu morphologischen Veränderungen gegenüber dem nicht injizierten Wildtyp (Tab. 3-2). Die Embryonen wiesen zu 39% Störungen bei der Augenentwicklung auf. 40% der resultierenden Phänotypen zeigte Achsendefekte wie z.B. verkürzte oder gekrümmte Körperachsen. Bei dem größeren Teil der betroffenen Embryonen (29%) wurden Veränderungen der Augen und der Körperachse beobachtet, obwohl die Effekte auch unabhängig von einander auftraten (Augendefekte 10%; Achsendefekte 11%). Inwieweit die Entstehung der resultierenden morphologischen Veränderungen durch RNA-Injektion für eine „aktivierte“ Form von Xegr-1 mit der Organisator-spezifischen Expression von Xegr-1 korreliert werden kann, ist noch nicht geklärt.

Konstrukt		pCS2+NLS/I261F
Anzahl der Experimente		4
Anzahl der Embryonen		152
RNA (ng/Embryo)		2
Injektion		2/2
<b>Morphologie</b>	<b>Augen</b>	
normal	normal	43 (28.3%)
Achsendefekte	normal	17 (11.2%)
normal	Augendefekte	15 ( 9.8%)
Achsendefekte	Augendefekte	44 (29.0%)
Gastrulationsdefekte		33 (21.7%)
<b>Achsendefekte</b>		<b>61 (40.2%)</b>
<b>Augendefekte</b>		<b>59 (38.8%)</b>

**Tab. 3-2 Effekte der Xegr-1 Punktmutante I<sup>261F</sup>.** Embryonen wurden animal in beide Zellen des Zwei-Zell-Stadiums injiziert und bis zum Schwanzknospfenstadium inkubiert. Achsendefekte umfassen verkürzte und/oder gekrümmte Achsen sowie ventrale Einschnürungen. Zum Spektrum der Augendefekte gehören reduzierte, fusionierte und fehlende Augen. Phänotypen wurden als Gastrulationsdefekte eingeordnet, wenn eine unvollständige Schließung des Neuralrohrs zu beobachten war oder die Entwicklung nicht über die Gastrulation hinaus erfolgte. Eine Auswertung injizierter Gelege erfolgte, wenn sich die Kontrollpopulation nicht-injizierter Embryonen normal entwickelte.

Zur funktionellen Untersuchung wurde eine mRNA für ein weiteres, aktivierendes Proteinkonstrukt überexprimiert, bei dem die DNA-bindende XEgr-1 Zinkfinger-Domäne (ZF) an die starke Transaktivierungsdomäne des Adenovirus E1A-Proteins fusioniert worden war (Lillie und Green, 1989). Für den Fall, daß Xegr-1 einen transkriptionellen Repressor darstellt, könnte die Verwendung eines Xegr1-ZF/E1A Konstruktes der Funktion von Xegr-1 entgegenwirken. Die Umwandlung eines transkriptionellen Repressors in einen Aktivator durch die Fusion der spezifischen DNA-Bindungsdomäne eines Transkriptionsfaktors mit einer Aktivierungsdomäne ist u.a. bereits für *Xenopus* Gli-Proteine durchgeführt worden (Marine et al., 1997).

Als 'Templates' für die *in vitro* RNA-Synthese wurde das Plasmid pCS2+MTNLS/EGR1ZF-E1a verwendet. Die Injektion der RNA erfolgte in unterschiedlichen Konzentrationen (0.5-2 ng/Embryo) in definierte Blastomeren (2/2) und Lokalisationen (animal, dorsal, ventral, MZ). Die Resultate der Injektionsexperimente lieferten keine Hinweise, die Aufschluß über eine Funktion von Xegr-1 in der frühen Entwicklung hätten geben können.

### 3.3.3.3 Inhibition

Der dritte Ansatz zielte auf die Ausschaltung des endogenen Proteins durch Überexpression einer 'antisense' RNA, die komplementär zur Xegr-1 mRNA ist. Dadurch kann eine Expression der 'sense' RNA infolge teilweisen Abbaus der endogenen RNA und eingeschränkter Translation der verbliebenen RNA stark vermindert werden (Lombard und Slack, 1997). Eine im Überschuß vorliegende 'antisense' RNA sollte die endogene mRNA in Form eines nicht translatierbaren RNA-Duplex binden und so die Bildung des Xegr-1 Proteins inhibieren bzw. einschränken.

Als Templates für die *in vitro* RNA-Synthese diente das Plasmid pCS2+/AS-EGR1. Die Injektion erfolgte in unterschiedlichen Konzentrationen (0.05-3.8 ng/Embryo) in definierte Blastomeren



(1/2, 2/2, 2/4, 4/4, 2/8, 1/16) und Lokalisationen (animal, MZ). Injektion von Xegr-1 'antisense' RNA führte nicht zur Ausbildung aberranter Phänotypen.

Desweiteren wurde ein Konstrukt für ein Fusionsprotein injiziert, das aus der Xegr-1 Zinkfinger-Domäne und der Repressor-Domäne des *Drosophila* Proteins engrailed (enR) bestand. Diese engrailed Domäne besitzt transkriptionsreprimierende Aktivität und beeinträchtigt die Wechselwirkung von Transkriptionsaktivatoren mit der basalen Transkriptionsmaschinerie (Han und Manley, 1993). Die Fusion mit heterologen DNA-Bindungsdomänen resultiert in chimären Proteinen, die die Aktivität cis-regulatorischer Elemente reprimieren (Jaynes und O'Farrell, 1991). Für den Fall, daß Xegr-1 in *Xenopus* eine aktivierende Funktion besitzt, sollte durch Überexpression dieses Zinkfinger/enR-Repressorkonstrukts die Xegr-1 Funktion inhibiert werden. Ein derartiger „dominant-negativer“ Effekt könnte Hinweise auf die Funktion des Xegr-1 Proteins liefern. Mit Hilfe dieser Strategie konnte gezeigt werden, daß ein Xbra/enR-Konstrukt in der Lage ist, die transkriptionelle Aktivierung durch das endogene Brachyury zu beeinträchtigen und die Funktion von Xbra in Embryonen zu inhibieren (Conlon et al., 1996). Ein weiteres Beispiel für die Verwendung dominant-negativer enR-Konstrukte stellt die Analyse des Zinkfinger-Proteins X-MyT1 (Bellefroid et al., 1996) dar.

Für die mRNA-Synthese wurde das Plasmid pCS2+MTNLS/EGR1ZF-enR eingesetzt. Die Injektion der RNA erfolgte in unterschiedlichen Konzentrationen (0.125-5 ng/Embryo) in definierte Blastomeren (1/2, 2/2, 2/4, 4/4, 1/8) und Lokalisationen (animal, dorsal, MZ). Es konnten keine signifikanten Abweichungen vom Phänotyp nicht injizierter Embryonen beobachtet werden.

Ein dritter Ansatz zur Untersuchung der Xegr-1 Funktion durch Inhibierung bestand darin, RNA zu injizieren, die für Korepressoren der NAB-Familie kodierte. Es sollte untersucht werden, ob die Aktivität der vorhandenen Xegr-1 Proteinmenge in der frühen Embryonalentwicklung durch eine Überexpression eines NAB Korepressors unterdrückt werden kann. Mittels degenerierter Primer konnte durch RT-PCR ein 600 bp langes Fragment des NAB1 homologen Gens aus *Xenopus* kloniert werden (siehe 3.3.3.4). Da es jedoch nicht gelang, aus den vorhandenen Genbibliotheken die vollständige *Xenopus* NAB1 cDNA zu isolieren, wurden für die RNA-Injektionen in *Xenopus* Embryonen die heterologen Gene von Maus (NAB1) und Ratte (NAB2) verwandt. Ein derartiger Ansatz ist gerechtfertigt, da zum einen aufgrund der Sequenz des klonierten Fragments die Existenz eines homologen NAB-1 Proteins in *Xenopus* nachgewiesen wurde (Kapitel 3.3.3.4) und zum anderen Beispiele bekannt sind, die zeigen, daß Struktur und Funktion von Proteinen in der Entwicklung verschiedener Spezies erhalten sein können. Dies ist am Beispiel des Homöobox-Proteins Xnot zu sehen, das notwendig für die Notochord-Differenzierung in *Xenopus* und Zebrafisch ist (Gont et al., 1996; Talbot et al., 1995). Darüberhinaus sind Elemente von Signaltransduktionskaskaden, wie z.B. der MAP Kinase-Kaskade, die in Menschen und Mäusen an Signaltransduktion und Genregulation beteiligt sind

(Avruch et al., 1994), ebenfalls in *Xenopus* vorhanden (LaBonne et al., 1995; Umbhauer et al., 1995; Gotoh et al., 1995). Aufgrund dieser Tatsache kann in Fällen, in denen das entsprechende Protein nicht oder unvollständig bekannt ist, das heterologe, d.h. artfremde Protein verwendet werden, das im Wirtsorganismus möglicherweise seine konservierte Funktion ausüben und die Funktion des endogenen Proteins übernehmen kann. Dies konnte für die Verwendung von Faktoren der MAP Kinase-Kaskade, das humane Elk- und SRF-Protein (und mutierten Versionen), sowie für die murine MAPK-Phosphatase (MKP-1) in den Analysen zur Genregulation von Xegr-1 in animalen Kappen gezeigt werden (Krain, 1997).

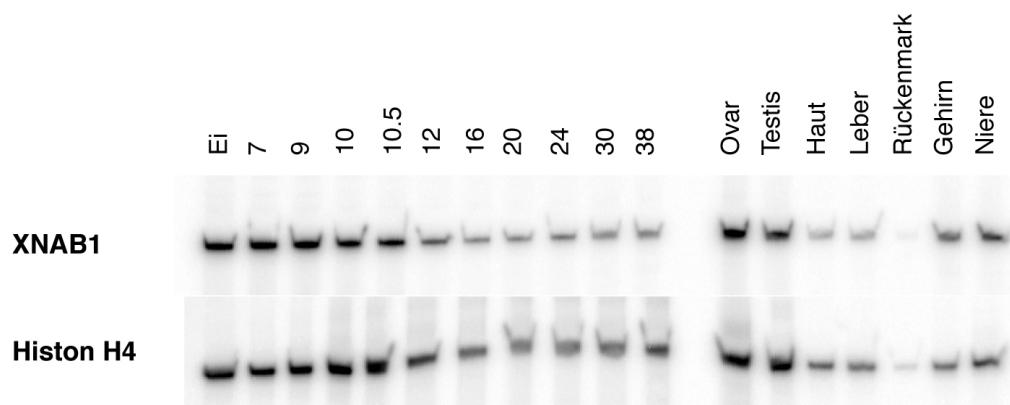
Als Templates für die *in vitro* RNA-Synthese wurden die Plasmide mit der kodierenden Region der heterologen NAB-Proteine, pCS2+NLS/rrNAB1 und pCS2+NLS/mmNAB2, verwendet. Die Injektion der mRNAs erfolgte in unterschiedlichen Konzentrationen (NAB1 0.04-5.2 ng/Embryo; NAB2 0.2-5.4 ng/Embryo) animal in definierte Blastomeren (1/2, 2/2, 4/4). Embryonen, die mit heterologem NAB1 bzw. NAB2 injiziert worden waren, zeigten im Vergleich mit den Kontrollembryonen keine phänotypischen Veränderungen und gaben keine Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Entwicklung in *Xenopus* durch Inhibition von Xegr-1.

### 3.3.3.4 Beschreibung eines NAB1 homologen Fragments aus *Xenopus*

Um zu untersuchen, ob die Funktion von Xegr-1 in der Entwicklung durch den NAB1 Korepressor beeinflusst werden kann, sollte eine cDNA des NAB1 homologen Gens aus *Xenopus* isoliert werden. Mittels degenerierter Primer konnte in einer RT-PCR auf RNA des Stadiums 18 ein 600 bp langes Fragment isoliert werden, das eine höhere Ähnlichkeit zu NAB1 (Ratte; Russo et al., 1995) als zu NAB2 (Maus; Svaren et al., 1996) aufweist (Abb. 3-18). Mit Hilfe Xnab1-spezifischer und weiterer degenerierter Primer (J. Svaren) wurden die vorhandenen cDNA-Bibliotheken durch PCR-Analysen getestet, wobei keine positiven Klone gefunden wurden. Auch aus genomischer DNA konnten keine zusätzlichen Sequenzinformationen gewonnen werden, so daß für keine der beiden beschriebenen funktionellen Domänen NCD1 (Egr-1 Wechselwirkung) und NCD2 (Repression) die vollständige Sequenz bekannt war (Svaren et al., 1996).

Die Analyse der zeitlichen Expression mittels RT-PCR aus stadienspezifischer RNA zeigte, daß Xnab1-Transkripte bereits maternal vorhanden sind und bis zum spätest untersuchten Stadium (NF 32) präsent sind (Abb. 3-19). Im Gegensatz zu Xegr-1 ist die frühe Xnab1 Expression im Embryo wahrscheinlich ubiquitär, da trotz des Resultats der RT-PCR weder in 'whole mount' *in situ* Hybridisierungen noch in *in situ* Hybridisierungen an Dünnschnitten eine räumliche Expressionsdomäne lokalisiert werden konnte. Auf eine mögliche ubiquitäre Expression deutet auch die RT-PCR Analyse auf Gewebe-RNA hin, da Xnab1-Transkripte in allen untersuchten Proben (Ovar, Testis, Leber, Rückenmark, Gehirn, Niere) detektiert werden konnten. Dieser Befund entspricht der Beobachtung von Russo et al. (1995), die in NorthernBlot-Analysen ebenfalls NAB1-Expression in sämtlichen Geweben feststellen konnten (Herz, Testis, Niere, Leber, Gehirn, Thymus, Milz). Die Analysen haben gezeigt, daß zum Zeitpunkt der Xegr-1

Expression Xnab1 Transkripte vorhanden sind. Da aufgrund der angenommenen ubiquitären Expression von Xnab1 dieses mit Xegr-1 kolokalisiert ist, besteht die Möglichkeit, daß Xnab1 die Aktivität von Xegr-1 beeinflussen kann.



**Abb. 3-19 Analyse der Xnab1 Expression durch RT-PCR.** Für die reverse Transkription wurden jeweils 0.25 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Xnab1 Transkripte konnten in allen untersuchten RNA-Präparationen verschiedener Entwicklungsstadien und Gewebe nachgewiesen werden. (Xnab1, Primer F50/-R442; 56°C, 45 sec je Zyklusschritt, 26x; Histone H4, Primer H4-F/-R, 22 Zyklen).

### 3.4 Isolierung und Charakterisierung des Xegr-1 Promotors

#### 3.4.1 Isolierung eines genomischen Xegr-1 Klons

Neben der funktionellen Charakterisierung sollte die Regulation des Xegr-1 Gens untersucht werden. Mit dem Ziel, essentielle Promotorelemente zu finden, wurde ein Fragment genomischer *Xenopus* DNA kloniert, das 5'-genflankierende Sequenz enthielt. Die Strategie für die Isolierung eines solchen Genabschnitts bestand darin, Phagen-Bibliotheken genomischer DNA mittels PCR auf das Vorhandensein Xegr-1 spezifischer Regionen zu analysieren und entsprechende Klone durch PCR-Screening zu vereinzeln. Um primär 5'-liegende Sequenzen zu identifizieren, wurden Primer aus dem 5'-Bereich der cDNA gewählt (F55/R332; F218/R542); als Ausschlußkriterium diente ein Primerpaar am Übergang Zinkfinger/3'-UTR (F391/R513).

Ausgehend von einer genomischen Lambda FIX II Bibliothek (I. Dawid) konnte nach neun Titrations- und Amplifikationszyklen im anschließenden Plaque-Lift Screen ein einzelner positiver Phagenklon isoliert werden. Die DNA des rein amplifizierten Phagen wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten und einem Southern Blot mit Digoxigeninmarkierter Sonde (PCR-Produkt F218/R542) unterworfen. Von drei detektierten Banden wurde die mit der stärksten Signalintensität (Hind III Fragment) subkloniert und vollständig sequenziert. Dieser genomische Xegr-1 Klon hat eine Länge von 4116 bp.

MAFCQRLPRDSALRYIISTQRPGLNLFKKILIFRESILNARPPRCPPRWARGRPGRRS	60	rn NAB1
.....		x1 NAB1
-. . . H-A-SPT- . . . . . E-P- . . . . . --DNT--T		mm NAB2
NCD1		
RRRSPAEP LSR IAPQPRAALSPSTVMATALPRTLGE LQLYRILQKANLLSYFDAFIQGG	120	
.....		
..... --FKASAPAM. . . . . --V--R-----YET-----		
NCD1		
DDVQQLCEAGEEEEFLEIMALVGMASKPLHVRR LQKALRDWVTNPGLFNQPLTSLPVSSIP	180	
.....		
-----T-----E-A-----S--VPAV-----		
IYKLP EGSPTWLGIS CNSYERSSSAREPHLKVPKCAATTCVQSLGQKSE . VGSLALQSV	239	
-----S--SI--LNSS-----N-N-----I-----P--DG--NSP--NN		
LF-IS-TAG-RK-SMS-GHGSPGEKAGS . . . . ARSFSPKSPLE--EKL-PLP-G . . . PGA		
SESRLWQGHHTTESE . . . . . HSLSPADLGS . . . . . PASKESSEALDA	277	
--G-H--S----- . . . . . -----RDTT-T---		
GDP-I-P-QS-P--DVGAGGEEEGAGSPPF--PAG-GVSEGPVGVVAAGGAGGCPDR-EP		
NCD2		
AAALSVAECVERMAPTLPKSDLNEVKELLKNNK LAKMIGHIFEMSDEDPHKEE EIRKYS	337	
S-----S-----F-S-----I--R-M--T---S-----G--E-- . . . . .		
EMVRM-V-S---IFRSF-RG-TG-IAS---L-----RSV-----D-H-AQ-----		
NCD2		
AIYGRFDSKRKDGKHLTLHELTVNEAAAQLCVKDNALLTRRDEL FALARQVSREVTYKYT	397	
.....		
V---L---RE--Q-S-----I-----F-MR--T--L--V---S-S--A--S--LSS		
YRTR LKCGERDELSPKRIKMEDGFPDFQESVPTLFQOARAKSEELAGLSSQA EKGMAKQ	457	
.....		
LKGS--HSE-LGGPPL-KL-Q-V- . . . . . -QSHNEI--PPPGP-SY- . . . . .		
MELLCAQAGYER . LQQERRLMAGLYRQSSGEQSPDGGLPSDGS DQGERPLNLRIPSVQN	516	
.....		
..... PP-RPS-EEDSASLS- . . . E-LDGHLQAV-SCPRLTPPPADL--A-PAHGLWS		
RQP . HHFVVDGEL . . SRLYSNEVKSHSSES LGI . . . LKDY . . . . . PHSAFTLE	558	
.....		
-HILQOTLM-EG-WLA--V-HDRVGRL-PCVPAKPP-AEFEEGLLDRC PAPG--P-LVEG		
KKV . IKTEPEDSR .	570	
.....		
RRSSV-V-A-A--Q		

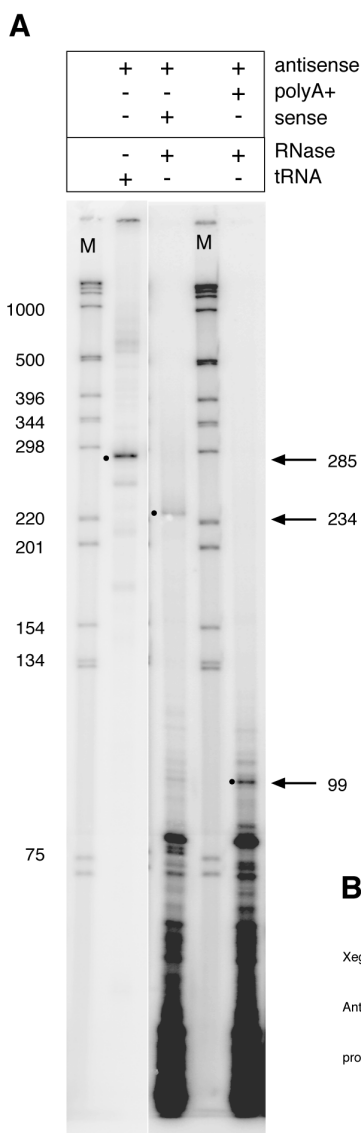
**Abb. 3-18 Sequenzvergleich von NAB-Proteinen.** Dargestellt ist ein Vergleich von NAB1 (Ratte), NAB2 (Maus) und der abgeleiteten Aminosäuresequenz eines 600 bp *Xenopus* NAB1-Fragments. Zwei konservierte Domänen (NCD1, NCD2; Svaren et al., 1996; schwarze Linien) sind gekennzeichnet. Striche kennzeichnen identische Aminosäuren, Punkte stehen für eingefügte Zwischenräume. *Xenopus*, xlNAB1, diese Arbeit; Ratte, rrNAB1, Russo et al., 1995; Maus, mmNAB2, Svaren et al., 1996).

### 3.4.2 Bestimmung des Transkriptionsstarts (RNase Protektion)

Um den genomischen Klon auf Promotorelemente hin untersuchen zu können, war es notwendig, den Startpunkt für die Transkription zu determinieren. Die Position des 5'-Endes der RNA wurde durch RNase Protektion bestimmt (Abb. 3-20), indem als Hybridisierungsprobe ein markiertes

Fragment verwendet wurde, das die Sequenz des Transkriptionsstarts enthielt. Nach Hybridisierung gegen polyA<sup>+</sup> RNA und RNase-Verdau wurden die Proben auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Durch RNase Protektion wird nur doppelsträngige RNA geschützt, so daß anhand der Größe des resultierenden spezifischen Signals die Position des Transkriptionsstarts ermittelt werden kann.

Zur Darstellung der Hybridisierungssonde wurde ein genomisches Fragment, das die Sequenz zwischen dem proximalen SRE ('serum response element') und der 5'-Region der cDNA enthält (Position 2735-3191), subkloniert. Nach Linearisierung des Plasmids wurde die 'antisense' RNA-Sonde durch *in vitro* Transkription in Anwesenheit von <sup>32</sup>P-rUTP synthetisiert. Nach Hybridisierung und RNase-Verdau konnte in der polyA<sup>+</sup> RNA eine 99 bp lange Bande detektiert werden. Ausgehend vom 3'-Ende des Konstrukts (Primer R+83) wurde der Transkriptionsstart (Position +1) der Xegr-1 RNA für die Nukleotidposition 3092 des genomischen Klon bestimmt. Der Beginn der transkribierten RNA liegt damit 16 Nukleotide vor dem 5'-Ende der klonierten cDNA; die Gesamtlänge des Xegr-1 Transkripts beträgt demnach 2823 bp.



**Abb. 3-20 Bestimmung des Transkriptionsstarts durch RNase Protektion.**

(A) 0.3 µg polyA<sup>+</sup> RNA wurden für 12 h bei 45°C gegen eine <sup>32</sup>P-rUTP markierte 'antisense' RNA-Sonde hybridisiert. Anschließend wurden nicht hybridisierte Einzelstränge durch RNase-Verdau entfernt. Als Kontrolle dienten a) die Hybridisierung gegen 'sense' RNA (Positivkontrolle) und b) die 'antisense' RNA Probe und tRNA ohne RNase-Verdau (Sondenintegrität). (B) Schema zur Bestimmung des Transkriptionsstarts durch Analyse der Länge des geschützten Fragments. Ausgehend von dem mit Sal I linearisierten Plasmid pGEM-T/F272-R+83, das das 5' Ende der Xegr-1 cDNA sowie den 5' flankierenden Sequenzbereich enthielt, wurde eine radioaktiv-markierte 'antisense' Sonde generiert (285 bp). Diese enthielt neben 234 bp Xegr-1 Sequenz und einen Anteil von 51 bp Vektorsequenz, der nicht geschützt werden konnte. Die Hybridisierung der 'antisense' Sonde mit polyA<sup>+</sup> RNA protektierte ein 99 bp Fragment, während mit einer 'sense' Kontroll-RNA die gesamte Xegr-1 Sequenz (234 bp) erhalten blieb. Bei Inkubation der 'antisense' Sonde mit tRNA ohne anschließenden RNase-Verdau konnte das die vollständige Sondenlänge von 285 bp (inklusive des Vektorsequenz) detektiert werden.

### 3.4.3 Sequenzvergleich von genomischer DNA und Xegr-1 cDNA

Das klonierte genomische Fragment enthält 3091 Nukleotide 5'-flankierender Sequenz (Abb. 3-21). Der ermittelte Transkriptionsstart (+1) liegt 16 Basen vor dem Beginn der cDNA. In der 3'-Region reicht das Fragment bis zur Position 469 der cDNA (Hind III Schnittstelle), wobei der Leserahmen der mRNA durch ein 539 bp langes Intron unterbrochen wird.

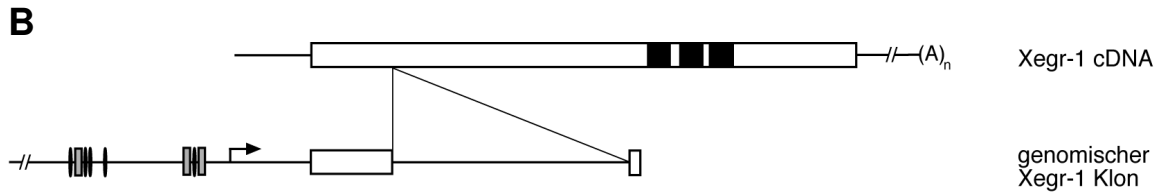
#### A

```

-3 091  AAGCTTAACTAAAGTAGGC TAGAAATGTT GTA TATTA TGCCT TGGGT TT CTGTACCA GCC
-3 031  CAAGGCAAC CACAGCCC TT TAG CAGGAAAGAT CT CTG TC TCCAAAGA TGCCC CAGTAGCT
-2 971  CACCATC TT CTT TT CTGAT GAT T TACT GTACT GAATA TA TAA TT TAAAT GTC ACCAC TGT
-2 911  TTAGTAAAT AGT ACAGA TT AT TGGTAC ATGGCAG CATAGCAA CAGT GCAAT TAGCATCA
-2 851  AAATGTTAT AAGCAGCC CTGTAGCATCAG CCT TT GTGACAGG GGAAT CT TAT TT TCT GCT
-2 791  TGATGGT TT ATGAC CCC CT AAA CT TAG CT TCT CAACAGC TGC TC AAA GCACA CT GAGCAT
-2 731  GTGAGAG TC ACAGACAC TC CTAACAAA T TCAAGATGGGAAA CT TCT GTGGC AGAAGGCC
-2 671  TGGATCA TT ACT AC TAT TGCAC CT TTAGGCTG GT TCA GT AAG TT CAG TATAT AAAAT ATG
-2 611  ACAT TTC TAGCCAAATT CA TTT TTAGGAT TTAGC TCT CA TTC GAAAGGGAAA GAGGACTG
-2 551  TCAAAT TT CAT GAAAC TT TGT GTAGG CT TCA GG TGA TA TGC AA CAGAA CCC AAAAGGGA
-2 491  AACAA TGTAATT GT CAT GTAGC AAAAG TG TAA TC TGT CC TCA CAATT TC CAT GT CTACAT
-2 431  GATGATAC CAGTC TGT CCAT TCA CTGGC TGT CT GTG TT TTAAG TGA TC TAA CA CAGAAA
-2 371  TAAT TTTG TAAA CA TGC TG GCAAT ATG CGAGAG GACT GG TGT GCAGC TAATGCT ATATTT
-2 311  GGTT CAGAA GTA AA TGC TA TTC TG TTG CT CCT TT CACAC TTA CAATAAA TGC TG TGT TAA
-2 251  ATGT TAT TCAGG TAGGC CC TCT GT TCAGC TGC CAGCC AA TGC CT GCC AA TAC GC CAT GGG
-2 191  AAGCAAT TC ACC TG GTT CAAAAA AAC GG TCA GT TCC AAGCT GC CTC TG TAAAAGC CT T
-2 131  GCCAGTACT CCT GTAAA TA TACAGGCC CT CTT TT GTT GC CCC TA TATAA TGT AGTATGAT
-2 071  TTCT CTT TG TGG CA TCAGC TCA CT GGAAAACA CAAT TA TTT TT TTT TG TTT TAATTAT T
-2 011  TT TATTC TG CAGCATG GC AAAAT AAC GAGTAAAAAT GT ATA TT CTT GAAAG TAAACA TG T
-1 951  TGAAAGT GACCT GAATT CAGAAA CCC AT TAT CCAGAAGACT CA GAA TT ACGAGAAGGCC
-1 891  GTCT CCC ATAGAC CCA TT TTA TC CAAATAAT CCACA TT TTTAAAAA TGATT TCCTT TT T
-1 831  CTCT GTAAT AAT AAAAC AA TCG CT TGT AC TTGAT CCAAAAATAAGATA TAACT AA TCC TTA
-1 771  TTGGAAG CC AAA CCAGC CT AT TGGGT TT AT TAAATG TT TACAT GAT TT TGT AGCAGACT
-1 711  TAAGGTA TAAAGAT ACT AA TCA CAGAAAGATC CATT A TC TGGAAAAC TT GAT CAGGT TT T
-1 651  CCTGATTAG GCG CAATA CAATT CT ACT GGGTT TATTTAG TGA TT TTCAT GAT GA TTT TCT
-1 591  AGTAGAC TT AAGGT ATGAGAAG CAAA TT ATG GAAAGAT TT GT TTT CCAGAAAATC CCAG
-1 531  ATCC CAAGAATT CT GGA TAACAGGCC CAT ACCAG TCC TT AGT GA TGGGC GAA TT TTTGT C
-1 471  CCAT TTC GC CTC GC CGAAAAAT TCAAA TT TTC TG TGA AA TTT GC AAAAC GGGAAAAAAT T
-1 411  TGTGTTCTG ACACT CTC GT CAA TT TTAGC GCC GCGT TAAAG TT AATGGGCG TC CAAATA
-1 351  ATGT TGACGCGC GC CAG TT TTAGC GCAAT CTA CT TTT TC CAA CG TGA GT CAAAATT TC T
-1 291  TGACGAC GGC GAAT TTT CG CTG CAGTG TA TTT GC TGGCGGCGAAGCT CT GAAAT TGGCAG
-1 231  CGAA TTT GT GCC TAGCAA TGT AT TTG TC GAT CA CTA CT TGC CA CTT AT TTCAG TTG TC C
-1 171  AAAAAACC TG TCC TG TTAGCTACT GCAGA TTC TG TGA GC TGC TCACA TG CAC CACACAAC
-1 111  TTGT GATAC TGA GACAG CCGAAGGGAA TAGCAACT CT TTA TCAGGGGTT TCACT TGC
-1 051  TGCTAGT GAA GT GCAAGCA TCA GT GTC TCATT GCAAAAAT CAT GGAAGAA CAT GAAAGTGT
-9 91  CACATTTAGATGAT GTAAGAAC AAATTAGATA AT AAT AAATTAGATAAT AAT AAATCCC

```

-931 AGGGAAGTG TACTT TGTAA TGT TG TAG CT GTG CAAAT GCAAC CC CAAT TTT TAGAT TAC  
 -871 AAAT TGCAT TTTAT TGTAC ATT TATCAAA TGACAAGC CTAGT TTAGCAT TCACAGCC CAA  
 -811 TGCC TACAT GGC CAAAT CCCTA CGTTT TT TAGGGAGG TG CAGAT TTGCT TTT TGCT TGT  
 -751 ACTGAAAAT GTA GTAAAAT ATGAC TTTAAAGC CCAAA CGGCA GT TGT GACTG TG CAGCT G  
 -691 TGACTGGCAGTG CCATA GGAGG CT GCA GGGTGAGACA CAGCA TAAGAG CCGAT ATG TGA  
 -631 GATAGAT CTAGATC TATAG TAGCT TGTGATA TAAAT TC TTT TATCT ATGCAAT GTAGCA  
 -571 ATTGGGAGCGCA CCTGTGT GTGTGAGAGG TTGGCAGT CCATGCACTAGT GCAGC GCTCTC  
 -511 TCTGCAGCC TCCCTGCTCC TGTCT GGGCT CCA GCACC TCATCAGCAC TTTTCCTCTA  
 -451 TGTGAAACAGAAAGGGAGGGAGCTGAT CCGGAAAG CCC TTTAAAAGGAGCAGGAA GGAA  
 -391 CCCC GCCGGAA CAGCGAC TTACA TGGGC ATAGC CT TACAT GGCCTAAGCT GCCGGGT TT  
 -331 CCGGAAGGT GGC GGGGAGGCGGCTG TGGCCGGGATGC CCGGT GCT TGGGATACACCGC  
 -271 CAGGGTGAC CGGTAGAA TC CATGGCTGCT TATACACT CC CCGGTGGCA CCCAGCGAGCG  
 -211 GCACCGTTC CAGTCTGGGCTT CCCTGGT TCCGAAGG GTTTGCA CCGGGTTC CATCTCCA  
 -151 GTCTTCCCCTT CCGAGTC GACGT CACGGATCCT CCA GC TAC CC TCCAAAT TGGGC TTC  
 -91 CTGCAGTCCATATA TGCCAT GTA CGTCA CAAAAGGGAGGAGATT GAAGGCTACGAACG  
  
 +1 ◆  
 -31 CT TTTAAATAGGAGGCGAGCAG TG GCA GC CGC GAGAGATT CCAGC GGGCA GGACT GGGGGA  
 .....  
 +30 GCCGTGCGGGGAAGCGAT TGCAGAAC CGGCGACAAC CC CAGCAGCAGC CAGCAAAGCTC  
 +90 TAATCGCAACAA CAACAAC AACAAAACAC TGGTTATTAT CAGCA CAACATACACAGT GCC  
 +150 CCAAAGC CCACTGT ACCGAGGGAAGAGAGCTT GCCTGTC TCCCTCA CCAATTCT CCC TAG  
  
 M A V A K T E M L V S P L Q  
 +210 GGAT TCCCGAGAAGCTGAT GGCAGTT GCCAAAAC GGAGATGCTC GTGTCACCTC TG CAGA  
 I S D P F S S F P H S P T M D N Y P K L  
 +270 TCTCTGATC CGTTCAGC TC TTTCCCCAT TCCCTAC TATGGAT AAC TACCCCAAAC TGG  
 E E M M L L N A G G P Q F L G A S V P D  
 +330 AGGAGATGATGCTCAATG CCGGGGACCT CAGTTCC TGGGC GCCTCAGTCC CTGATG  
 G S G F N S T V E G A E Q F D H L T A  
 +390 GCAGCGGCT TCAAT TCCACGGT GGAGGGAGCT GAGCAAT TCGAT CACCTAACAGCAGGTA  
 +450 AGCAGT TGCTACC GTC TAATA TCAGGC TGTCC CACCTGCTAG TAAAGGC TTGCTGGG  
 +510 AGCTGTAGT TCTAC CACAAATGAA TGGCTGCAAACCA GATTTAGACGTAATTGATAGCAG  
 +570 TGGGATGTAGCC TTTCTA TGTGGGAAATG TCA TTTGCTGTGAGGT TGA TAAGT GACAGACA  
 +630 TTTGCATGATCAATAGAACATAAT CAA TGGACTT TGCAT TTTGCCTT TGCAAGATCAACT  
 +690 CTCCCTT TGA CTAGGTT CATTTCT TTTAAGACAT CGGGGTC CAACC TGGGCCCTC CAG  
 +750 TAGT TGTGAAATGACAGGT GCA TGCTGGAGC TG TAGCTGGAGGCA TAGCTGATATACT  
 +810 GCTGCTA TAGTAGT TTA TCATTTCATT GGTAAAATCA CCCCAGAA GTGCTGTGATGTT  
 +870 GACAAGTGTAGTCT TTAGCAT TGCTATAAA CAGATGCATGTCAGC TTTCTGAATAATT  
  
 D  
 +930 CAATGTGCAGCGGTCTGT TGT TTTACACACT GTAACCTGCT TTTGTTCCT TG CAGATG  
 A F S E M S L S S E K A  
 +990 CCTTCTC TGAAA TG TCACTGAGCAGTGAGAAA GCTT



**Abb. 3-21 Sequenz eines genomischen Xegr-1 Klon, der die 5' flankierende Region, Exon 1 und ein Intron umfaßt.** (A) Das isolierte Fragment hat eine Länge von 4116 bp und enthält 3091 bp 5' flankierende Sequenz. Der Promotor weist konservierte SRF Bindungsstellen (CArG-Boxen; doppelt unterstrichen), ETS-Bindungsstellen (einfach unterstrichen) sowie eine TATA-Box (gepunktet) auf. Der Transkriptionsstart (+1) und das 5' Ende der Xegr-1 cDNA (◆; Kapitel 3.1.3) sind markiert. Der genomische Klon enthält das Exon 1 und den Beginn des zweiten Exons. Die kodierenden Sequenzen sind durch Fettdruck gekennzeichnet. Das Intron hat eine Länge von 539 bp. (B) Struktur der Xegr-1 cDNA und des genomischen Klon. Die isolierte cDNA enthält die vollständige kodierende Sequenz und einen Poly(A)-Schwanz (A<sub>n</sub>). Schwarze Blöcke zeigen die Position der C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger-Motive. Der genomische Klon weist in der 5' zum Transkriptionsstart (Pfeil) gelegenen Promotorregion Bindungsstellen für SRF (CArG-Boxen, [ ] und Ets-Proteine ( | ) auf. Die Anordnung dieser Elemente wird in Kapitel 3.4.4 beschrieben. Das Exon 1 und der Beginn des Exons 2 umschließen das Intron, dessen Position in Bezug zur cDNA gekennzeichnet ist.

*Xenopus laevis* besitzt einen pseudotetraploiden Chromosomensatz (Kobel und Du Pasquier, 1986), d.h. es existieren jeweils vier Allele eines Gens. Zur Untersuchung, inwieweit sich die Sequenzen von cDNA und genomischem Fragment entsprechen, wurde ein Nukleotidvergleich durchgeführt. Hierbei zeigte sich, daß beide Sequenzen identisch sind, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die cDNA genau das Transkript des genomischen Fragments darstellt und nicht eines im pseudotetraploiden Chromosomensatz vorkommenden Homologen. Die genomische Struktur von Xegr-1 ist in Abbildung 3-21B dargestellt. Der Vergleich von cDNA und genomischer DNA zeigte darüberhinaus, daß der genomische Klon von Position +447 bis +930 ein Intron enthielt. Die Intron-Exon Übergänge entsprechen den von Padgett (1986) ermittelten Konsensussequenzen für höhere Eukaryoten (Abb. 3-22).

	Exon 1	[-----Intron-----]	Exon 2
<b>Konsensus</b>	<b>NMA G</b>	<b>[gtaagt... py<sub>10</sub>ncag]</b>	<b>NN</b>
<b>Xegr-1</b>	<b><u>GCA</u> <u>G</u></b>	<b>[gtaagc... py<sub>5</sub>gpy<sub>7</sub>gcgg]</b>	<b><u>AT</u></b>
	<b>Ala A</b>		<b>sp</b>
<b>hs egr-1</b>	<b><u>GCA</u> <u>G</u></b>	<b>[gtaagc... py<sub>10</sub> gccag]</b>	<b><u>AG</u></b>
	<b>Ala G</b>		<b>lu</b>

**Abb. 3-22 Intron-Exon-Übergänge des Xegr-1 Gens.** Die Xegr-1 Sequenzen für die Übergänge von Exon und Intron sind der von Padgett (1986) formulierten Konsensussequenz sehr ähnlich. Auch der Vergleich mit der genomischen Sequenz des humanen Egr-1 (Sakamoto et al., 1991), das wie Xegr-1 nur ein Intron besitzt, zeigt, daß die Übergänge gut konserviert sind.



Die 5'-flankierende Sequenz von Xegr-1 enthält mehrere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Darunter konnten drei 'Serum Response Elemente' (SRE) identifiziert werden. SREs sind Promotorelemente, an denen die Transkriptionsfaktoren SRF (serum response factor) und TCF (ternary complex factor) kooperieren (Treisman, 1995). Drei CC(A/T)<sub>6</sub>GG Elemente (CArG Boxen), die die Bindungsstellen für SRF darstellen, sind im Promotor vorhanden: zwei proximale an Position -84 (SRE I) und -106 (SRE II) sowie ein distales SRE an Position -413 (SRE III). Die beiden proximalen Elemente sind durch eine Ets-Bindungsstelle (EBS) getrennt, während das distale SRE von zwei EBS flankiert wird (Abb. 3-23).

Zur Suche nach weiteren potentiellen regulatorischen Elementen wurde eine Datenbankanalyse anhand des Programms MatInspector V2.2 (Quandt et al., 1995) vorgenommen. Dabei konnten zahlreiche potentielle Bindungsstellen (zum Beispiel für AP-1, CREB oder GATA-Faktoren) im Xegr-1 Promotor identifiziert werden. Eine Egr-1 Bindungsstelle mit dem Konsensus CGCCCCGC, wie sie im humanen Promotor vorhanden ist (Sakamoto, 1991), ist im 3.1 kb langen Xegr-1 Promotorfragment nicht enthalten. Ein putatives TATA-Motiv (AAATA) befindet sich 27 Nukleotide vor der Transkriptionsstartstelle.

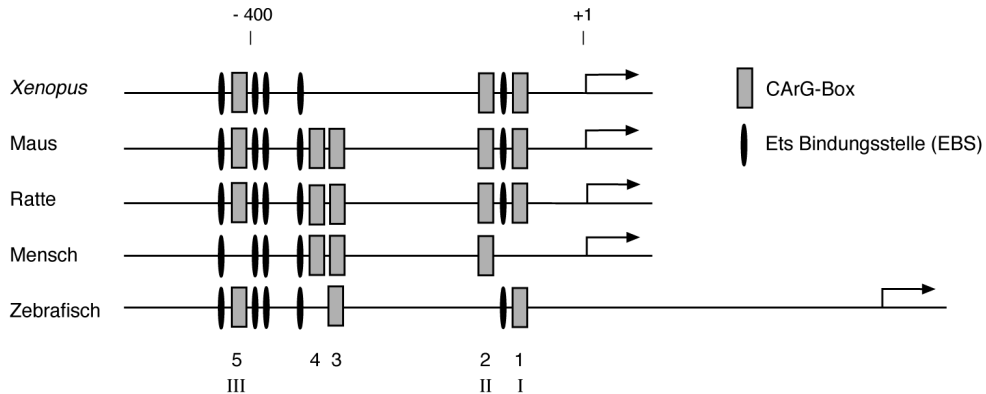
#### 3.4.4 Vergleich 5'-flankierender Sequenzen

Ein Vergleich mit den bekannten Promotorsequenzen der homologen Egr-1 Proteine von Maus (Tsai-Morris et al., 1988), Ratte (Changelian et al., 1989), Mensch (Sakamoto et al., 1991) und Zebrafisch (Drummond et al., 1994) zeigte, daß zwei regulatorische Elemente, CArG-Box und EBS, konserviert sind. Ausgehend vom Konsensus CC(A/T)<sub>6</sub>GG kommen in den verschiedenen Spezies unterschiedlich viele CArG-Boxen vor, wobei ihre relative Anordnung zueinander erhalten ist. Die Zebrafischsequenz weicht nur insofern von der der anderen Promotoren ab, als daß das konservierte Muster etwa 400 Nukleotide weiter vom Transkriptionsstart entfernt lokalisiert ist. Auffallend ist, daß keines der SREs in allen fünf Genen konserviert ist: Die Anordnung bei Maus und Ratte ist identisch und zeigt CArG-Boxen und EBS in allen fünf möglichen SREs. Im *Xenopus* Promotor fehlen die beiden mittleren (distalen) CArG-Boxen, während beim Zebrafisch die 2. und 4. Box (ausgehend vom Transkriptionsstart) nicht vorhanden sind. In der humanen Sequenz sind die beiden äußeren CArG-Boxen sowie die proximale EBS verlorengegangen (Abb. 3-23).

**A**



**B**



**Abb. 3-23 Der Xegr-1 Promotor enthält konservierte Bindungsstellen für SRF (CArG-Boxen) und ETS (EBS). (A) zeigt den Vergleich der 5'flankierenden Sequenzen des *egr-1* Gens von *Xenopus*, Maus, Ratte, Mensch und Zebrafisch. Konservierte CArG-Boxen sind grau unterlegt, EBS durch Rahmen gekennzeichnet. Im Zebrafisch *egr-1* Promotor liegen die markierten regulatorischen Elemente 427 bp ([1]) weiter vom Transkriptionsstart entfernt als die anderen Sequenzen. *Xenopus*, diese Arbeit; Maus, Tsai-Morris et al., 1988; Ratte, Changelian et al., 1989; Mensch, Sakamoto et al., 1991; Zebrafisch, Drummond et al., 1994. (B) Schematische Darstellung der Anordnung der regulatorischen Elemente des Serum Response Elements (SRE), CArG-Box und EBS. Keines dieser Sequenzelemente ist in allen Promotorsequenzen der verschiedenen *egr-1* Gene konserviert. Die Numerierung der murinen SREs (1-5) sowie der *Xenopus* SREs (I-III) ist angegeben. Der Transkriptionstart ist mit +1 gekennzeichnet.**

**3.4.5 Bildung eines ternären Komplexes aus SRF und Elk-1 am Xegr-1 Promotor**

Für die murinen SREs konnte von McMahon und Monroe (1995) gezeigt werden, daß vor allem die distalen SREs, SRE5 und SRE4 eine wichtige Bedeutung für die Induktion des *Egr-1* Gens haben. Von diesen beiden Elementen ist in der *Xenopus* Sequenz nur das distale SRE5 des murinen Gens konserviert worden (s. Abb. 3-23). Die Frage, ob dieses SRE auch im *Xegr-1* Promotor funktionell eine Rolle spielt, wurde in einem Gelretardations-Experiment überprüft

(Abb. 3-24). Anhand eines solchen Elektromobilitätsshift-Assays (EMSA) läßt sich klären, ob ein spezifisches Oligonukleotid *in vitro* durch bestimmte Proteine gebunden wird. Die Spezifität der DNA-Protein-Wechselwirkung wird anhand von Promotorelementen, die mutierte Erkennungssequenzen enthalten, kontrolliert.

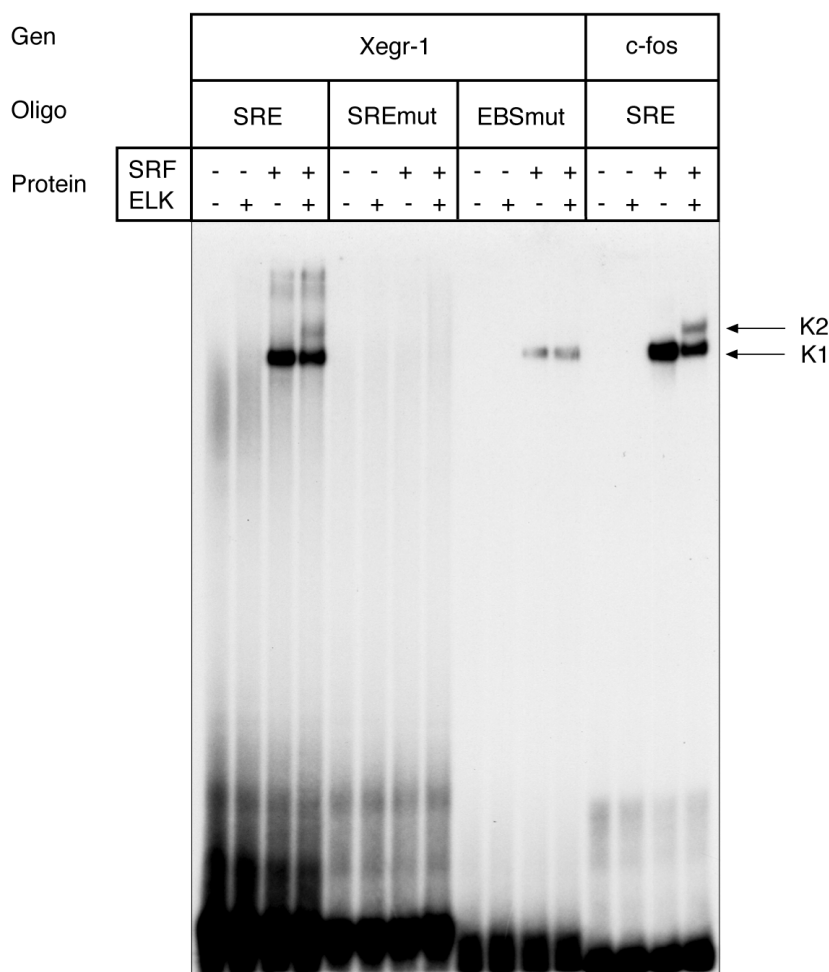
Zur Analyse, ob das *Xenopus* SRE III in der Lage ist, mit hSRF und hElk-1 einen spezifischen Komplex auszubilden, wurden verschiedene Oligonukleotide verwendet: Xegr1SRE (Wildtyp SRE III), Xegr1SRE/mSRE (enthält mutierte CArG-Box) und Xegr1SRE/mEBS (enthält mutierte Ets-Erkennungssequenz). Als Positivkontrolle diente das fos-SRE (SRE des humanes c-fos Gens), da die am fos-SRE gebildeten Komplexe in der Literatur gut beschrieben sind (Hipskind et al., 1991; Janknecht und Nordheim, 1992).

Bei Inkubation des Wildtyp-Oligonukleotids Xegr1SRE mit SRF bildet sich ein Komplex, der im Gel genauso schnell wandert wie fos-SRE und SRF (Komplex K1; Abb. 3-24). Während Xegr1SRE und Elk-1 zusammen keine DNA-Protein-Wechselwirkung zeigten, führte die Inkubation von SRF, Elk-1 und Xegr1SRE zur Bildung von Komplexen unterschiedlicher Größe (K1, K2). Xegr1/mSRE zeigte weder bei Inkubation mit den einzelnen Proteinextrakten noch bei gleichzeitiger Inkubation aller drei Komponenten einen spezifischen Komplex. EMSA mit Xegr1/mEBS ergab in Gegenwart von SRF wie auch bei Anwesenheit von SRF und Elk-1 einen Komplex (K1). Die Inkubation von Xegr1/mEBS mit Elk-1 zeigte keine Wechselwirkung. In der Kontrolle am c-fos SRE führte die Inkubation mit Elk-1 zu keinem Komplex und mit SRF zu einem Komplex (K1). Die Gegenwart beider Proteine führte zur Formation von zwei Komplexen (K1, K2).

K1 beschreibt einen binären Komplex, bestehend aus dem Oligonukleotid und einem SRF-Dimer. Treten DNA, SRF und Elk-1 in Wechselwirkung, bildet sich ein ternärer Komplex K2, der aus dem Oligonukleotid, einem SRF-Dimer und einem Molekül Elk-1 aufgebaut ist. Bei hohen Konzentrationen an Elk-1 kann es am Xegr-1 SRE zur Ausbildung ternärer Komplexe höherer Ordnung kommen (Daten nicht gezeigt), die neben DNA und SRF-Dimer (wahrscheinlich) zwei Elk-Moleküle enthalten (Janknecht und Nordheim, 1992).

Der gebildete Komplex K2 enthält sowohl SRF als auch Elk-1; in Abwesenheit von Elk-1 ist SRF nur zur Bildung binärer Komplexe in der Lage. Da ternäre Komplexe nicht durch Elk-1 und Oligonukleotid entstehen, ist deren Formation abhängig von SRF. Darüberhinaus verhindert auch die Mutation der SRF-Bindungsstelle bzw. der EBS-Bindungsstelle die Bildung ternärer Komplexe.

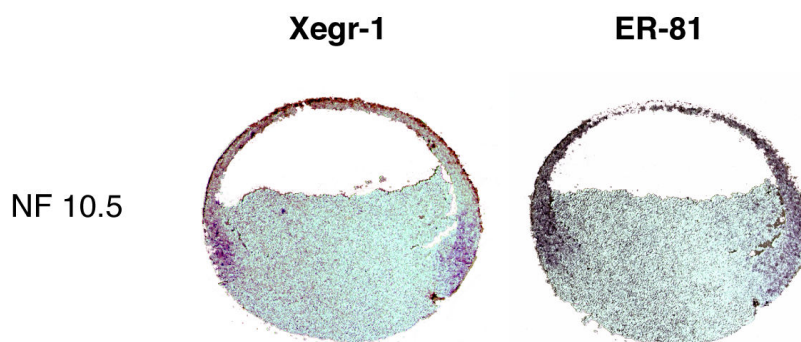
Die Verwendung der mutierten Oligonukleotide konnte auch die Spezifität der DNA-Protein-Wechselwirkungen zeigen. Wurde die Bindungsstelle für SRF zerstört (Xegr1/mSRE), konnte kein binärer (und kein ternärer) Komplex gebildet werden. Mutationen der Bindungsstellen für Ets-Proteine (Xegr1/mEBS) verhinderten die Bildung des ternären Komplexes K2, aber nicht die binärer Komplexe, da die Bindung von SRF nicht beeinflusst wurde.



**Abb. 3-24 SRF und Elk-1 binden spezifisch an den Xegr-1 Promotor.** In einem Elektromobilitätsshift-Assay (EMSA) wurde die Bindung von humanen SRF und humanem Elk-1 an radioaktiv markierte Oligonukleotide, die die Sequenz des Xegr-1 SRE III enthielten, untersucht. Als Kontrolle diente das SRE des humanen c-fos Gens. Die Spezifität der DNA-Proteinwechselwirkungen wurde durch mutierte Bindungssequenzen des Xegr-1 SREs (SREmut bzw. EBSmut) überprüft. Die Inkubation der Proteinextrakte mit den Oligonukleotiden resultierte in verschiedenen Komplexen (K1, K2). SRF kann an das Xegr-1 SRE binden (K1), während mit Elk-1 allein keinen Komplex ausgebildet wird. Werden beide Protein zusammen mit dem Xegr-1 SRE Oligonukleotid inkubiert bildet sich ein Ternärkomplex (K2). SRE, serum response element; SRF, serum response factor; EBS, Ets-Bindungssequenz.

Das distale SRE des Xegr-1 Promotors ist in der Lage, mit den heterologen Proteinen hSRF und hElk-1 einen ternären Komplex zu bilden. Hieraus ergab sich die Frage, ob auch in *Xenopus* die für einen Ternärkomplex notwendigen Faktoren existieren, und ob sie in einem entsprechenden räumlich-zeitlichen Bereich wie Xegr-1 vorhanden sind. XSRF ist das Homologe des humanen SRF Proteins. Da ein zum humanen elk-1 homologes Gen in *Xenopus* z. Z. nicht bekannt ist, wurde die Lokalisation des kürzlich aus *Xenopus* isolierten ets-verwandten Proteins Xer81 (Chen, Manuskript in Vorbereitung; Monte et al., 1995) untersucht. Xer81 ist in der Lage, an Ets-Erkennungssequenzen im Promotor des Drosophila E74 Gens zu binden (Mitteilung von B. Krain; Janknecht und Nordheim, 1992).

Zur Analyse einer möglichen Kolo-kalisation wurden *in situ* Hybridisierungen mit Xegr-1, Xer81 und Xsrf (Mohun et al., 1991) an aufeinanderfolgenden Dünnschnitten von Gastrula-Stadien durchgeführt. Das Ergebnis der vergleichenden Expressionsanalyse für Xegr-1 und Xer81 ist in Abbildung 3-25 dargestellt und zeigt, daß beide Gene im Bereich der DMZ koexprimiert sind. Xegr-1 weist die bereits beschriebene Expression in der VMZ und DMZ auf, während Xer81 Transkripte zusätzlich in den animalen Zellen des Blastocoeldachs lokalisiert sind. Eine lokalisierte Expression von Xsrf konnte demgegenüber weder in ‘whole mount’ *in situ* Hybridisierungen noch in *in situ* Hybridisierungen an Dünnschnitten detektiert werden. Daß Xsrf Transkripte in der frühen Embryogenese einschließlich der Gastrulation vorhanden sind, ist jedoch von anhand von Northern Blot Analysen (Mohun et al., 1991) und RT-PCR (Krain, 1997) gezeigt worden. Es besteht daher die Möglichkeit, das Xsrf in der frühen Entwicklungsstadien ubiquitär, aber nur sehr schwach exprimiert wird.



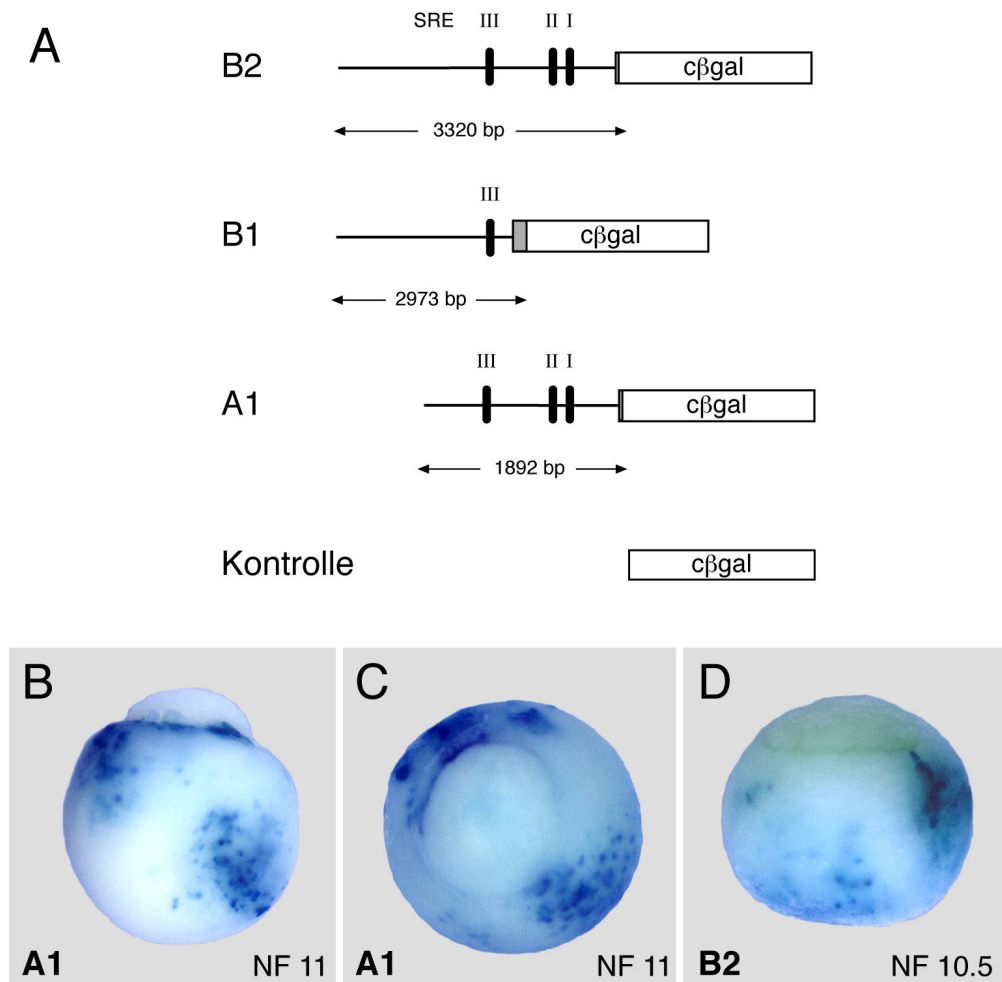
**Abb. 3-25 Expression von Xegr-1 und *Xenopus* ER81 im Embryonalstadium 10.5.** *In situ* Hybridisierungen an Dünnschnitten wurden mit Digoxigenin-markierten ‘antisense’ RNA-Sonden durchgeführt. Xer81 Transkripte werden in *Xenopus* während der Gastrulation in der animalen Hemisphäre exprimiert und überlappen mit der Expressionsdomäne von Xegr-1. ER81 ist ein Mitglied der ETS-Familie von Transkriptionsfaktoren. Es ist nicht bekannt, ob ER81 an der Aktivierung von Xegr-1 während der Gastrulation beteiligt ist. ER81, Xer81.

Demnach sind die Faktoren, die in der frühen Entwicklung für die Ausbildung eines Ternärkomplexes theoretisch notwendig sind – *Xenopus* XSRF und ein Protein der ETS-Familie – überlappend exprimiert. Ob Xsrf und Xer81 die Transkriptionsfaktoren darstellen, die an der Aktivierung des Xegr-1 Gens beteiligt sind, ist nicht bekannt.

### 3.4.6 Analyse von Xegr-1 Promotorfragmenten durch Injektion in Embryonen

Im Xegr-1 Promotor konnten *in vitro* regulatorische Elemente identifiziert werden. Die Bindung von SRF und Elk-1 an diese SREs ist notwendig und hinreichend für eine Induktion des Xegr-1 Gens (Krain, 1997). Es stellte sich die Frage, ob spezielle Promotorbereiche ausreichend sind, um *in vivo* die Expression des Xegr-1 Gens in der dorsalen Urmundlippe zu kontrollieren. Um die

räumliche Aktivität des Promotors zu analysieren, wurden drei Fragmente (A1, B1, B2) an ihrem 3'-Ende mit einem  $\beta$ -Galaktosidase-Reporter fusioniert und diese Konstrukte als DNA in Embryonen injiziert (0.04-4 ng/Embryo; 2/2, 2/4, 4/4 Zellen; Abb. 3-26A). Zum entsprechenden Zeitpunkt wurde die Enzymaktivität durch Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase in den Embryonen analysiert (Abb. 3-26B-D).



**Abb. 3-26 Analyse von Xegr-1 Promotorfragmenten.** (A) Das Schema zeigt den **Aufbau der Konstrukte** B2, B1 und A1, die aus unterschiedlich langen Bereichen Xegr-1 Promotorsequenz vor einem  $\beta$ -Galaktosidase (c $\beta$ gal) Fusionsprotein bestehen. B2 enthält die gesamte isolierte Xegr-1 Promotorsequenz. B1 umfaßt die 5' Sequenz des Promotors einschließlich des distalen SREIII. Das Fragment in A1 stellt den im 5' Bereich um 1,2 kb verkürzten Promotor dar und enthält wie B2 alle drei SREs. Als Kontrolle dient zytoplasmatisches  $\beta$ -Gal (Vektor pCS2+c $\beta$ gal) ohne Xegr-1 Promotosequenz. Die Fusionsproteine enthalten zwei (B2, A1) bzw. 82 (B1) zusätzliche Aminosäuren. Die Promotorkonstrukte wurden in Form von DNA in Embryonen injiziert. Zum Zeitpunkt der Gastrulation wurde die räumliche Verteilung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität untersucht. **(B-D) Analyse mikroinjizierter Promotorkonstrukte durch Nachweis von  $\beta$ -Galaktosidase in Xenopus Embryonen.** Die Verteilung der  $\beta$ -Galaktosidase wird zum Zeitpunkt der Gastrulation durch X-Gal Färbung detektiert. **(B, C)** Die Injektion des Promotorkonstrukts A1 (100 ng/Embryo, in beide Zellen des Zwei-Zellstadiums) resultiert in einer ektopischen Expression des  $\beta$ -Gal Proteins, die nicht mit der räumlichen Expression von Xegr-1 korreliert (A, vegetaler Pol, oben; B, Blick auf vegetalen Pol). **(D)** zeigt die ektopische Verteilung von  $\beta$ -Gal in einem Embryo, das mit dem Promotorkonstrukt B2 injiziert worden war (100 ng/Embryo, in beide Zellen des Zwei-Zellstadiums). Auch in diesem Beispiel ist das injizierte Xegr-1 Promotorfragment nicht ausreichend, um in Gastrula-Embryonen eine  $\beta$ -Gal Expression in der Region zu generieren, die der Expressionsdomäne des endogenen Xegr-1 Gens entspricht (vegetaler Pol, oben).

Das Konstrukt A1 beinhaltet den im 5'-Bereich um 1.2 kb verkürzten Xegr-1 Promotor, der alle drei SREs enthielt. In B1 war der Promotor 5' deletiert, so daß nur noch das SRE III vorhanden war. Das B2 Konstrukt umfaßte das gesamte isolierte Promotorfragment (inklusive aller SREs). Die Injektion des Vektors (pCS2+c $\beta$ gal) ohne Promotorfragment diente als Positivkontrolle für die anschließende  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung. Als nachteilig könnte sich in diesem speziellen Fall die Tatsache ausgewirken, daß der Vektor pCS2+ ein Fragment des starken sCMV-IE94 Enhancer/ Promotors ('simian cytomegalovirus major immediately early transcription unit' IE94) enthält, das drei potentielle CARG-Boxen und fünf Erkennungssequenzen für Ets-Proteine aufweist (Chang et al., 1993). Die dadurch theoretisch mögliche Sequestrierung von SRF und Ets-Proteinen wurde verhindert, indem das zu injizierende Fragment durch Restriktionsverdau und Aufreinigung von den entsprechenden Vektorsequenzen (linearisiert) dargestellt wurde. Ein Vergleich der Injektion zirkulärer bzw. linearisierter DNA zeigte keinen Unterschied.

Die Promotorfragmente wurden in Form zirkulärer bzw. linearisierter (Plasmid-)DNA injiziert. Ein Vorteil linearisierter DNA besteht darin, daß sie zum einen effizienter repliziert wird (Marini et al., 1988) und zudem in das Genom integriert und anschließend in jede Tochterzelle weitergegeben werden kann (Etkin et al., 1984). Dadurch weist sie eine stärkere bzw. länger anhaltende Amplifikation auf als zirkuläre DNA, die durch die Zellteilung auf die Tochterzellen verteilt und dadurch gleichzeitig „verdünnt“ wird. Die Injektion der Konstrukte A1, B1, B2 sowie des  $\beta$ -Galaktosidase-Reporters erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 0.04-4 ng/Embryo mit folgenden Lokalisationen: beide Blastomere im Zwei-Zell-Stadium (marginale Zone und animaler Pol); zwei dorsale Blastomere (marginale Zone) im Vier-Zell-Stadium; vier Blastomere im Vier-Zell-Stadium (marginale Zone) und vier Blastomere im Acht-Zell-Stadium (marginale Zone). Wenn die Embryonen das Gastrula-Stadium erreicht hatten, wurde auf  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität getestet. Das Ergebnis war stets eine zufällige Färbung – unabhängig vom Promotor-konstrukt. Eine Promotor-abhängige Aktivierung des Reporter-Gens, die die Verteilung des endogenen Gens widerspiegeln würde, konnte nicht nachgewiesen werden. Das bedeutet, daß selbst das 3.1 kb lange Promotorfragment nicht ausreichend ist, um mittels DNA-Injektion ein Muster zu erzeugen, das der räumlichen Expression von Xegr-1 entspricht oder ähnelt.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Gene, die für die Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren Xegr-1 und Xegr-3 kodieren, aus dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* isoliert und weitergehend charakterisiert. Einleitend werden Struktur und Expression sowie die Einordnung in die EGR-Familie anhand des Vergleichs mit denen verwandter Proteine beschrieben. Im Folgenden wird für Xegr-1 ausgehend von einer vergleichenden Expressionsanalyse der Zusammenhang mit dem ähnlich exprimierten Gen Xbra diskutiert. Die Isolierung eines Xegr-1 Promotorfragments führt zur Betrachtung eines Signaltransduktionsweges, der im Kontext der frühen Mesoderm-Induktion für die Regulation des Xegr-1 Gens von Bedeutung ist. Abschließend wird die Problematik der funktionellen Analysen von Xegr-1 diskutiert.

### 4.1 Homologe Gene der EGR-Familie in *Xenopus laevis*

Zinkfinger-Proteine lassen sich aufgrund ihrer Strukturmerkmale in zwei Klassen unterteilen: Klasse I umfaßt Proteine, deren Gene in großen Clustern organisiert sind, wie z.B. die FAX- und KRAB-Subfamilien. Sie sind evolutionär spät entstanden und kommen nur in Vertebraten vor. Demgegenüber sind die Zinkfinger-Proteine der Klasse II evolutionär hoch konserviert und an der Regulation von Entwicklungsabläufen in Vertebraten beteiligt. Sie sind häufig an Prozessen der Zelldifferenzierung und der Morphogenese beteiligt und zeigen in der Regel ein differentielles Expressionsmuster in der Embryogenese. Anhand der Anordnung der Zinkfinger-Domänen und von gemeinsamen Sequenzelementen außerhalb der Zinkfinger können die Klasse II-Proteine einzelnen Subfamilien zugeordnet werden, z.B. der SP1-, EGR/KROX-, GLI- und WT1-Familie (siehe Einleitung; Übersicht in Pieler und Bellefroid, 1994).

Die aus *Xenopus* isolierte Xegr-1 cDNA und das Xegr-3 Fragment lassen sich aufgrund ihrer Struktur (Zinkfinger-Triplett), der Aminosäure-Sequenz (Abschnitt 3.1.4 und 3.1.8) und einer spezifischen RNA-Lokalisation (Abschnitt 3.2.1.2 und 3.2.2.2) während der frühen Entwicklung eindeutig der EGR-Familie der Klasse II Zinkfinger-Proteine zuordnen. Der Vergleich der Egr-1 Aminosäure-Sequenzen von *Xenopus*, Mensch und Zebrafisch zeigt fast identische Zinkfinger- und Kernlokalisationsdomänen (98% bzw. 96%). Der N-terminale transaktivierende Bereich ist dagegen nur zu 48% konserviert, während der C-Terminus eine Identität von 46% aufweist. Die vorausgesagte Proteinsequenz für Xegr-3 weist einen vergleichbar hohen Grad der Konservierung



auf: *Xenopus* und humanes Egr-3 besitzen nahezu identische Kernlokalisations- und DNA-Bindungsdomänen (96% bzw. 99%). Die Ähnlichkeit der N-terminalen Domäne, die für den Bereich ab Beginn des zweiten Exons ermittelt wurde, beträgt 59%, während die C-terminale Region zu 64% konserviert ist. Auch außerhalb der stark konservierten Zinkfingerdomäne bestehen signifikante Sequenzähnlichkeiten und erlauben eine klare Zuordnung zu den Egr-1 bzw. Egr-3 Subtypen (Abb. 3-1). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der Proteine ist es wahrscheinlich, daß die isolierten Gene die Homologen der bekannten Egr-Proteine darstellen. Für Xegr-1 wird diese Annahme zusätzlich durch die Tatsache gestützt, daß neben den Proteinsequenzen auch die Genstruktur erhalten ist, was sich an der konservierten Position des Introns zeigt. Ein weiterer Anhaltspunkt, der Xegr-1 zweifelsfrei als das Egr-1 Homologe charakterisiert, sind die im Xegr-1 Promotor enthaltenen regulatorischen Elemente. Die 5'-flankierende Region von Xegr-1 weist zahlreiche potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren auf, unter denen vor allem die SREs (CArG-Box und benachbarte Ets-Bindungsstellen) konserviert sind.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Beteiligung bzw. den Einfluß von *Xenopus* EGRs in der frühen Embryogenese zu studieren. Dabei lassen sich Vergleiche mit den homologen Proteinen, die über Sequenz/Struktur/DNA-Bindung hinausgehen, nur bedingt ziehen. So ergab beispielsweise die Untersuchung der Xegr-1 Expression im adulten Frosch mittels RT-PCR, daß Transkripte in allen untersuchten Geweben vorhanden waren (Abschnitt 3.2.1.1). Diese Daten lassen sich nur bedingt mit den anfänglichen Expressionsanalysen in anderen Vertebraten vergleichen, da diese mittels der Northern-Blot Methode durchgeführt wurden, die eine geringere Sensitivität als die hier angewandte RT-PCR Technik aufweist. Demnach wird Egr-1 in Maus (Gehirn, Herz, Lunge, Thymus; Lemaire et al., 1988; Sukhatme et al., 1988), Ratte (Lunge, Gehirn; Milbrandt, 1987) und Zebrafisch (Gehirn, Muskel; Drummond et al., 1994) gewebe-spezifisch exprimiert. Während für die Egr-1 Proteine der höheren Vertebraten so gut wie keine embryonalen Daten existieren, ist die Induktion von Egr-1 in unterschiedlichen Zelltypen durch zahlreiche unterschiedliche Stimuli (Mitogene, Wachstumsfaktoren, Bestrahlung, neuronale Erregung) sehr gut dokumentiert (Überblick und Literaturverweise in Gashler und Sukhatme, 1995).

Ein Vergleich der zur Zeit bekannten Mitglieder der EGR-Familie in *Xenopus* (Xegr-1, -2, -3) zeigt das folgende Bild: die Zinkfinger-Domänen aller drei Proteine sind nahezu identisch (90%), wobei die meisten Aminosäuresubstitutionen konservativer Natur sind. Über eine mittlere Ähnlichkeit der benachbarten basischen Domäne (49%) fällt die Übereinstimmung an den Sequenztermini drastisch ab (5-13%). Die hohe Konservierung der DNA-bindenden und kern-lokalisierenden Sequenz weist auf eine Funktion dieser Proteine als nukleäre Transkriptions-faktoren hin. Da für homologe Proteine in Vertebraten gezeigt wurde, daß die Zinkfinger-Domänen verschiedener EGR-Subtypen an die gleiche Konsensussequenz binden können, folgt daraus, daß die Abweichungen in den C- und N-terminalen Domänen für die differentielle Expression und Funktion der einzelnen Proteine verantwortlich sein dürften.

## 4.2 Xegr-1 Expression im Spemann-Organisator

„Ein Stück aus der oberen Urmundlippe eines in Gastrulation begriffenen Amphibienkeims übt eine organisierende Wirkung auf seine Umgebung aus, derart, daß es, an eine indifferenzierte Stelle eines anderen Keimes verpflanzt, dort die Bildung einer sekundären Embryonalanlage verursacht. Man kann ein solches Stück daher als Organisator bezeichnen.“ (Spemann und Mangold, 1924). Diese Beobachtung war der erste Anhaltspunkt für die Existenz eines organisierenden Zentrums, das die Grundzüge des Körperbauplans in Vertebraten etabliert. Der Spemann-Organisator ist Ausgangspunkt induktiver Wechselwirkung und morphogenetischer Zellbewegungen, die in der Gastrulation die Festlegung der Körperachsen und spezifische Induktion der Gewebe einleiten. Mindestens die Hälfte der Zellen der Gastrula benötigen für ihre normale Entwicklung Signale aus dem Organisator, obwohl dieser selbst nur 5% der Zellen ausmacht. Dabei ist der Organisator nicht die einzige Informationsquelle im Gastrula-Stadium, denn durch Aktivierung oder Derepression umgebender Zellen werden in diesen und durch diese weitere Prozesse wie spezifische Differenzierung oder Morphogenese initiiert.

Der Organisator ist in der dorso-marginale Zone (DMZ) des Gastrula-Embryos lokalisiert. Seine induzierenden Eigenschaften und auch die Kompetenz des umliegenden Gewebes zur Antwort ändern sich im Verlauf der Gastrulation, und bereits Mangold mutmaßte, daß der Amphibien-Organisator nicht aus einer einheitlichen Zellpopulation besteht (zitiert in Gilbert, 1994). Die untere (anteriore) Hälfte des Organisators induziert nur Kopfstrukturen, während der obere (posteriore) Teil nur Rumpf-Schwanz-Strukturen induziert (Zoltewicz und Gerhart, 1997; Abb. 4-1a). Die Struktur des Spemann-Organisators läßt sich heute daher in (mindestens) zwei funktionelle Domänen unterteilen: einen Kopf- und einen Rumpf-Organisator. Letzterer wird auch als Rumpf/Schwanz-Organisator beschrieben, wobei der Schwanz-Organisator als dritte Organisator-Domäne angesehen werden kann. Diese späten räumlichen Bestimmungen konnten entsprechenden Strukturen früher Entwicklungsstadien zugeordnet werden, so daß sich folgendes Bild ergibt: Die dorsalen vegetalen Zellen der Blastula bilden ein erstes induktives Zentrum, das sog. Nieuwkoop-Zentrum (Nieuwkoop, 1969a,b; 1977), das seine induktive Aktivität bis zum späten Blastula-Stadium behält, selbst aber kein Bestandteil des Organisators wird. Maternale Genprodukte dieser dorsal-vegetalen Zellen des Nieuwkoop-Zentrums, die selbst zu endodermalem Gewebe differenzieren, induzieren die überliegende marginale Zone (MZ) zur Bildung des „**späten Blastula-Organisators**“. Der späte Blastula-Organisator ist in den tiefer liegenden Zellen (‘deep cells’) der unteren Hälfte der DMZ des Stadiums NF 9 lokalisiert. Diese Domäne entspricht dem Kopf-Organisator. Der späte Blastula-Organisator induziert bis zur frühen Gastrula (Stadium 10.5) in der direkt darüberliegenden, animalen DMZ den **Gastrula-Organisator**, der Rumpf-organisierende Aktivität besitzt. Dieser Gastrula-Organisator entspricht der vegetalen ‘Alignment Zone’ von Lane und Keller (1997). Als mögliche dritte funktionelle Domäne kann zum Zeitpunkt der späten Gastrula (Stadium 13) ein Schwanz-Organisator definiert werden, der in der dorsalen Urmundlippe lokalisiert ist und zur Schwanzausbildung bis ins

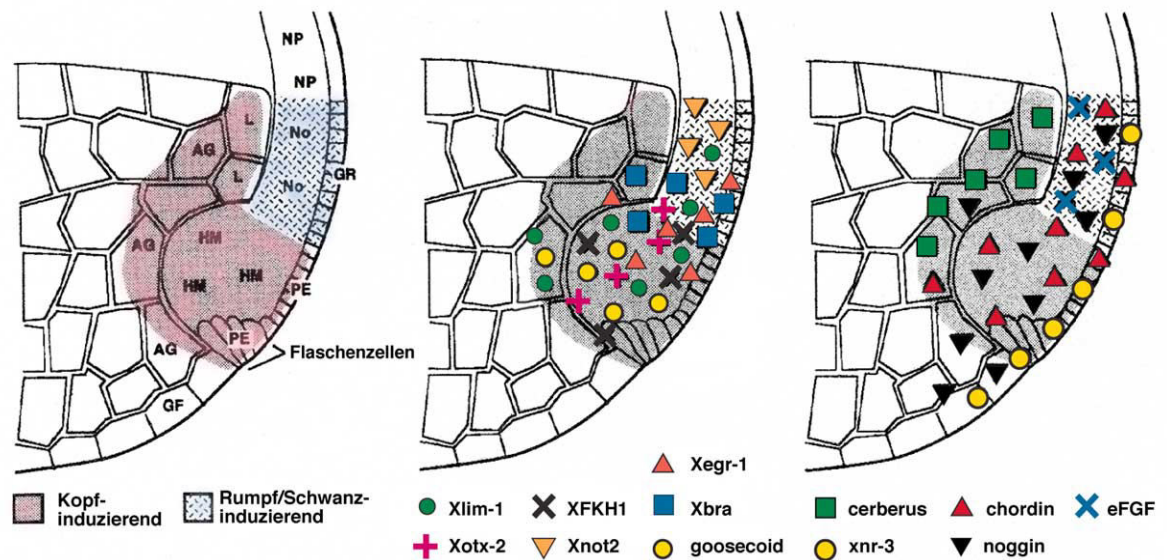
Schwanzknospenstadium erhalten bleibt. Gont et al. (1993) beschreiben die Ausbildung der Schwanzknospe als kontinuierliche Fortsetzung des Gastrulationsprozesses.

Zusammengenommen bilden Kopf- und Rumpf-Organisator das Äquivalent des klassischen Spemann-Organisators zu Beginn der Gastrulation. Das bedeutet, daß an der anterior-posterioren Spezifikation der Achsen in *Xenopus* multiple, distinkte Organisatoren beteiligt sind, die in einer zeitlichen und räumlichen Abfolge wirken (Lane und Keller, 1997).

Der Begriff Spemann-Organisator war lange Zeit „nur“ empirisch definiert. Das Problem, wie der Organisator organisiert ist, ist in den letzten Jahren verstärkt mit der Fragestellung verknüpft worden, ob die regionale Expression von Genen mit der Unterteilung des Organisators in Subdomänen korreliert werden kann. Zur Zeit sind etwa ein Dutzend Gene bekannt, die spezifisch im Organisator exprimiert werden (Abb. 3-12; Übersicht und Literaturhinweise in Lemaire und Kodjabachian, 1996; Harland und Gerhart, 1997). Sie kodieren entweder putative Transkriptionsfaktoren (z.B. Goosecoid, Pintallavis/XFKH1, Xotx2, Xlim1, Xbra, Xnot2, Eomesodermin; Abb. 4-1B) oder sezernierte Proteine (z.B. Chordin, Cerberus, eFGF; Abb. 4-1C).

Mit der Klonierung des Egr-1 Homologen in *Xenopus* konnte ein weiteres Gen für einen Transkriptionsfaktor isoliert werden, das in der dorso-marginalen Zone des Gastrula-Stadiums exprimiert wird. Xegr-1 ist das erste Zinkfinger-Protein des C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Typs das im Organisator identifiziert wurde. Wie die meisten der Organisator-spezifischen Gene wird auch Xegr-1 nicht gleichmäßig im gesamten Organisator exprimiert, sondern ist in einer Subregion lokalisiert (Abb. 3-14).

Ein Vergleich der frühen Expressionsdomänen von Xegr-1, Xbra, Eomesodermin und Chordin zeigt, daß zwischen Xegr-1 und Xbra eine sehr große Ähnlichkeit in Bezug auf die Lokalisation innerhalb des Organisators besteht. Die früheste Expression von Xegr-1 kann sowohl in den tieferen, als auch in den oberflächlicheren Zellen der dorsalen marginalen Zone der späten Blastula (Stadium 9) detektiert werden. Sie ist in den *in situ* Hybridisierungen früher nachweisbar als die Expression von Xbra, dem *Xenopus* Homologen des murinen Transkriptionsregulators Brachyury (Smith et al., 1991), und zeigt sich noch vor Ausbildung der Urmundlippe, die sich zu Beginn der Gastrulation bildet. Der Organisator des Stadiums 10.5 zeigt eine überlappende Verteilung von Xegr-1 und Xbra (Abb. 3-14) in der animalen (posterioren) Region des Organisators. Dabei ist die Expression beider Gene dorsal und in den oberflächlichen Zellschichten stärker als in der ventralen marginalen Zone bzw. den tieferen Zellschichten. Xegr-1 reicht weiter an die dorsale Urmundlippe heran als Xbra. Xegr-1 und Xbra werden in einer Domäne exprimiert, die etwa die Hälfte der Zellen des Organisators umfaßt (Vodicka und Gerhart, 1995) und deren Position der des Gastrula-Organisators entspricht, d.h. im Rumpf-Organisator (Lemaire und Kodjabachian, 1996). Nach Harland und Gerhart (1997) könnte die Xbra Expressionsdomäne aber auch die Grenze zwischen den beiden Subregionen, Kopf- und Rumpf-Organisator, darstellen. In der späten Gastrulation (Stadium 12) sind Xegr-1 und Xbra in



**Abb. 4-1 Genexpression im Spemann-Organisator.** Dargestellt ist ein Sagittalschnitt durch die dorsale Marginalzone eines frühen Gastrula-Stadiums. Die kopf-induzierende Region (Kopf-Organisator) ist rot unterlegt, der Bereich, der sich zu Rumpf/Schwanz-Strukturen entwickelt ist blau eingefärbt. (A) beschreibt die Differenzierungs-“Schicksale“ der entsprechenden Organisator-Regionen. AG, Vorderdarm; GF, Darmboden; GR, Darmdach; HM, Kopf-Mesoderm; No, Notochord; NP, Neuralplatte; PE, Schlundentoderm; L, Leber. (B) Expressionsdomänen von Genen, die Transkriptionsfaktoren kodieren. Xegr-1 (diese Arbeit), Xbra (Smith et al., 1991), gooseicoid (Cho et al., 1991), XFKH1 (Dirksen und Jamrich, 1992), Xotx-2 (Blitz und Cho, 1996), Xnot2 (von Dassow et al., 1993), Xlim1 (Taira et al., 1992). (C) Lokalisierte Expression von Genen, die sezernierte Proteine kodieren. Chordin (Sasai et al., 1994), eFGF (Isaacs et al., 1995), noggin (Smith und Harland, 1992), cerberus (Bouwmeester et al., 1996), xnr-3 (Smith et al., 1993).

den tieferen und oberflächlichen Zellen des invaginierten dorsalen Mesoderms, wie auch des nicht-invaginierten Gewebes um den sich schließenden Blastoporus detektierbar. Dabei wird Xegr-1 im Gegensatz zu Brachyury auch in den äußeren Zellschichten der ventralen marginalen Zone exprimiert. Die Expressionsdomäne von Xegr-1 geht zu diesem Zeitpunkt über den Bereich des Organisators hinaus, wie *in situ* Hybridisierungen an der Expression in den mesodermalen Zellen des zukünftigen Notochords entlang der dorsalen Mittellinie gezeigt werden konnte. Das Notochord stellt die wichtigste Quelle von Signalen dar, die das paraxiale Mesoderm als zukünftigen somitischen Muskel spezifizieren. Ebenso wie Xbra zeigt auch Xegr-1 eine fortgesetzte Expression in der späteren Schwanzknospe, die als Resultat des fortlaufenden Prozesses eines Schwanz-Organisators betrachtet werden kann (Gont et al., 1993).

Der Spemann-Organisator in *Xenopus* kann embryologisch in zwei funktionell unterschiedliche Bereiche, den Kopf-Organisator (späte Blastula) und den Rumpf/Schwanz-Organisator (Gastrula), unterteilt werden. Diese Gliederung in definierte Subdomänen findet ihre Entsprechung auf molekularer Ebene in der lokalisierten Expression Organisator-spezifischer Gene. Xegr-1 kolokalisiert mit Xbra und zeigt in der frühen Gastrulation eine Expressionsdomäne, die zum größten Teil mit der Position des Rumpf-Organisators korreliert.

### 4.3 Xegr-1 und die Mesoderm-Induktion durch den Transkriptionsfaktor Xbra

*Xenopus* Brachyury gehört zur Familie der T-Box Gene und ist an der Mesoderm-Induktion beteiligt (Papaioannou und Silver, 1998; Smith, 1997). Die Funktion von Brachyury in der Vertebraten-Embryogenese umfaßt die Aktivierung von Genen, die für die normale Gastrulation benötigt werden, die Bildung des posterioren Mesoderms und die terminale Differenzierung des Notochords (Cuncliffé und Smith, 1992, 1994).

Die auffallend ähnliche Expression von Xegr-1 und Xbra im Verlauf der Gastrulation führte zu der Fragestellung, ob neben der räumlichen Beziehung auch eine funktionelle Wechselwirkung zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren besteht. Eine derartige Wechselwirkung ließe sich aber nur für den Entwicklungszeitraum der Gastrulation bzw. der Mesoderm-Induktion definieren, da beide Gene nicht ausschließlich im Organisator exprimiert werden, sondern in der späteren Entwicklung unterschiedliche Expressionsdomänen aufweisen.

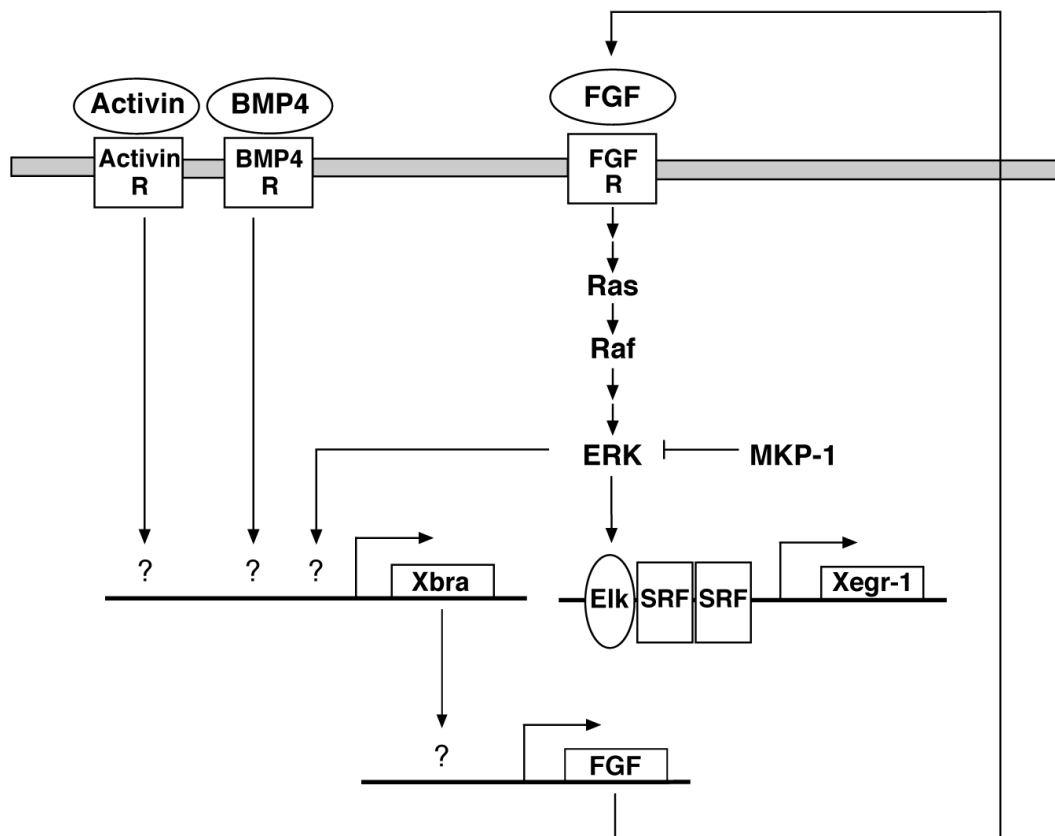
Die *in situ* Hybridisierungen zeigten Unterschiede beim Nachweis der Transkripte und lassen den Schluß zu, daß Xegr-1 aufgrund der extrem langen Dauer der Farbreaktion (12-24 h) im Vergleich mit Xbra (2-3 h) ein sehr schwach exprimiertes Gen darstellt. In der Gastrulation unterscheidet sich Xegr-1 dorsal durch seine bis an die Urmundlippe heranreichende Expression (Abb. 3-14, Stadium 10.5) und durch Signale in den äußeren Zellschichten der ventralen Lippe (Stadium 12). In der dorsalen Mittellinie, dem zukünftigen Notochord, ist die Expression von Xegr-1 deutlich schwächer als die von Xbra. Das biphasische Expressionsmuster von Xegr-1 zeigt nach der Gastrulation eine Abnahme, zum Schwanzknospenstadium hin eine Zunahme. Letztere korreliert mit der Expression zweier punktförmiger Areale im Bereich des Vorderhirns (Stadium 32), die in der Folge durch ein „Band“ Xegr-1 exprimierender Zellen verbunden werden. Im Gegensatz dazu wird die Xbra Expression nach der Gastrulation stärker reduziert und ist während der Neurulation im Notochord und posterioren Zellen exprimiert (Conlon et al., 1996); im Stadium 18 sind keine Xbra-Transkripte detektierbar (Krain, 1997; Smith et al., 1991). Der Vergleich von Experimenten, die zur Charakterisierung der Funktion beider Transkriptionsfaktoren durchgeführt wurden, zeigte deutliche Differenzen zwischen Xegr-1 und Xbra. Bei Überexpression von Xbra in *Xenopus*-Embryonen erfolgte keine Mesoderm-Invagination am Blastoporus, und es kam zu ektopischer Bildung posterioren Mesoderms (Cuncliffé und Smith, 1992, 1994; Rao et al., 1994), wobei in Abhängigkeit von der Xbra Konzentration unterschiedliche Arten an Mesoderm induziert wurden (Cuncliffé und Smith, 1992; O'Reilly et al., 1995). Ektopische Expression von Xegr-1 lieferte keine Anzeichen für eine Mesoderm-Induktion. Um die Inhibition der endogenen Xbra Funktion in *Xenopus* Embryonen zu untersuchen, wurde ein dominant-negativ wirkendes Repressorkonstrukt (Xbra-enR) verwendet, bei dem die transkriptionelle Aktivierungsdomäne gegen die Repressordomäne des *Drosophila* engrailed-Proteins ausgetauscht worden war. Injizierte Embryonen zeigten am Ende der Gastrulation Schwierigkeiten, den Blastoporus zu schließen, während in Kaulquappen-Stadien posteriore Strukturen fehlten. Durch Koinjektion von (Wildtyp) Xbra-RNA konnte eine partielle

„Wiederherstellung“ (‘rescue’) der posterioren Defekte erzielt werden (Conlon et al., 1996). Ein entsprechender ‘loss-of-function’-Ansatz wurde für *Xegr-1* durchgeführt, dabei konnte jedoch keine Beeinflussung des Phänotyps durch ein *Xegr1-ZFD/engrailed* Repressorkonstrukt beobachtet werden; selbst hohe Konzentrationen wirkten nicht toxisch.

Neben den Unterschieden, die in den Experimenten zur Funktion der Proteine beobachtet wurden, zeigten die Induktionsversuche zur Analyse der Regulation zum Teil vergleichbare Resultate für *Xegr-1* und *Xbra*. Die Untersuchungen zur Induktion und Regulation von *Xegr-1* während der Mesoderm-Induktion wurden innerhalb einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Nordheim (Med. Hochschule Hannover; Universität Tübingen) von Bernhard Krain im Rahmen seiner Dissertation durchgeführt (Krain, 1997). Die Analysen erfolgten im Animalkappensystem.

Die Transkription beider Gene, *Xegr-1* und *Xbra*, konnte durch Mesoderm-induzierende Peptidwachstumsfaktoren (eFGF, Activin, BMP-4) induziert werden. Durch Verwendung dominant-negativer Rezeptoren wurde gezeigt, daß die Induktion von *Xegr-1* (und *Xbra*) von einem intakten FGF-Signalweg abhängig ist. Da bekannt war, daß die Mesoderm-Induktion durch FGF über Elemente der MAP Kinase Signalkaskade verläuft (LaBonne et al., 1995; Gotoh et al., 1995; Umbhauer et al., 1995) wurden Inhibitoren oder modifizierte Versionen der beteiligten Signalmoleküle eingesetzt, um die Bedeutung des MAPK-Signaltransduktionsweges für die *Xegr-1* Induktion zu analysieren. Die Inhibition der MAPK-Kaskade durch die MAPK-Phosphatase-1 (MKP-1) hatte den gleichen inhibierenden Effekt auf die Expression von *Xegr-1* (und *Xbra*) wie der dominant-negative FGF-Rezeptor (dnFR). Auch die Induktion durch konstitutiv aktives Ras, sowie die Inhibition durch dominant-negatives Raf zeigten keine Unterschiede zwischen *Xegr-1* und *Xbra*. D. h. die Induktion von *Xegr-1* (und *Xbra*) in isolierten animalen Kappen erfolgt also durch die FGF-induzierte Aktivierung des MAP Kinase-Signalweges. Nach der Betrachtung der zytoplasmatischen Transmitter dieser Kaskade wurden nun die Faktoren untersucht, die im Zellkern direkt an der Regulation der Zielgene beteiligt sind. Zum einen war für Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie eine Beteiligung am FGF-vermittelten MAPK-Signalweg gezeigt worden (Literatur in Wasyluk und Nordheim, 1997), und zum anderen war bekannt, daß in Zellkultur-Experimenten SRF- und Ets-Proteine an der Regulation der Egr-Expression beteiligt sind (McMahon und Monroe, 1995). SRF- und Ets-Proteine können an SREs (‘serum response elements’) des Zielgen-Promotors einen ternären Komplex ausbilden und dadurch die Transkription initiieren. Mittels dominant-negativem Elk-1 (dnElk-1), einer transkriptionell inaktiven Mutante eines Ets-Proteins, konnte die FGF-induzierte *Xegr-1* Expression in animalen Kappen spezifisch inhibiert werden. Die Verwendung einer konstitutiv aktiven Version von SRF (SRF-VP16) aktiviert ebenfalls nur *Xegr-1* (in Abwesenheit Mesoderm-induzierender Faktoren). *Xbra* wird weder durch dnElk-1 inhibiert, noch durch SRF-VP16 aktiviert. Dies legt den Schluß nahe, daß die transkriptionelle Regulation von *Xegr-1* und *Xbra* unterhalb der MAP Kinase ERK auf unterschiedliche Weise erfolgt.

Aufgrund der sehr ähnlichen Expression der beiden Gene während der frühen Entwicklung stellte sich die Frage, ob zwischen Xegr-1 und Xbra eine gegenseitige Wechselwirkung existiert. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden Injektionsexperimente durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß Xbra in der Lage ist, in animalen Kappen Xegr-1 zu induzieren, während Xegr-1 keine Xbra Induktion bewirkte. Da Xbra die Expression von FGF induzieren kann (Schulte-Merker und Smith, 1995) und Xegr-1 über einen FGF-induzierten MAPK-Signalweg reguliert wird, kann die Xegr-1 Induktion durch Xbra durch zwei unterschiedliche Mechanismen bewirkt werden: entweder direkt durch Wechselwirkung des Transkriptionsfaktors Xbra am Xegr-1 Promotor oder indirekt über eine FGF-vermittelte Signaltransduktion. Die Blockierung des FGF Signalwegs mittels dnFR oder MKP-1 inhibierte die Xegr1- Aktivierung durch Xbra. Das resultierende Modell (Abb. 4-2; Panitz et al., 1998) beschreibt die Xegr-1 Aktivierung durch Xbra als einen indirekten Effekt, der über Xbra-induziertes FGF und den FGF-vermittelten MAP Kinase Signaltransduktionsweg verläuft.



**Abb. 4-2 Modell für eine indirekte Xegr-1 Induktion durch Xbra**, die über den FGF-vermittelten MAP Kinase Signalweg verläuft. Aktivierung von Xegr-1 kann durch dorsale und ventrale Wachstumsfaktoren erfolgen. Die Induktion ist abhängig von einem funktionierenden FGF-Signalweg, der Ras/Raf/ERK sowie die Transkriptionsfaktoren SRF und Elk enthält. Xbra kann Xegr-1 induzieren, indem es FGF aktiviert, das sowohl Xbra (autoregulatorischer Kreislauf) als auch Xegr-1 induziert. Xegr-1 stellt damit ein indirektes Zielgen für Xbra dar.

Die Tatsache, daß Xegr-1 keine Induktion von Xbra bewirken konnte, steht im Einklang mit den kürzlich publizierten 5'-flankierenden Sequenzen von Xbra (Artinger et al., 1997) und Xbra2 (Latinkic et al., 1997), die beide keine der bisher bekannten Egr-1 Erkennungssequenzen aufweisen. Darüberhinaus sind in diesen Promotoren keine CArG-Boxen enthalten, was eine Erläuterung für die fehlende Reaktion bezüglich des aktivierenden SRF-VP16 Konstrukts sein kann.

Während Xbra an der Mesoderm-Induktion beteiligt ist (Cuncliff und Smith, 1992; O'Reilly et al., 1995), scheint dies für Xegr-1 nach den bisherigen Erkenntnissen nicht zuzutreffen. Die histologische Untersuchung von Xegr-1 (RNA) injizierten animalen Kappen ergab keine Anhaltspunkte für die Induktion mesodermaler Gewebe (Tab. 3-1). Die Kappen hatten sich analog zu den nicht injizierten Kontrollexplantaten zu atypischer Epidermis entwickelt. Die Explantate zeigten keine Elongation. Demgegenüber ist Xbra in der Lage, in isolierten Kappen ventro-laterales Mesoderm zu induzieren, wie histologisch an Xbra-injizierten animalen Kappen nachgewiesen werden konnte (O'Reilly et al., 1995). Weder ektopische Expression noch die Inhibition von Xegr-1 zeigten einen Effekt auf die Mesoderm-Induktion in animalen Kappen: In Xegr-1 injizierten Explantaten ließ sich kein Einfluß auf die Mesoderm-Induktion durch koinjizierte Wachstumsfaktoren der FGF- und TGF- $\beta$  Familie feststellen (Tab. 3-1). Weiterhin führte die Injektion von dnElk in animalen Kappen zwar zur Inhibition der Xegr-1 Expression, zeigte aber keine generelle Störung der Mesodermbildung. Laut Mitteilung von B. Krain entwickelten auch dnElk-injizierte Embryonen einen normalen Phänotyp. Die Expression von Xegr-1 konnte nicht mit der Elongation animaler Kappen oder der Expression anderer mesodermaler Gene in Zusammenhang gebracht werden (Krain, 1997).

#### 4.4 Der Xegr-1 Promotor kann SRF und Elk-1 binden

Da SRF und Elk-1 an der spezifischen Regulation der Xegr-1 Aktivität beteiligt sind, wurde untersucht, ob diese Transkriptionsfaktoren eine direkte Wechselwirkung am Xegr-1 Promotor ausbilden können. Die Klonierung eines 3.1 kb langen Promotorfragments ergab, daß der 5'-flankierende Bereich eine Vielzahl von potentiellen regulatorischen Elementen aufweist. Der Vergleich der Promotorregionen verschiedener Egr-1 Proteine zeigt, daß die relative Anordnung der regulatorischen Elemente erhalten ist (Abb. 3-23). Bemerkenswert ist ferner, daß es fünf mögliche Positionen der SREs gibt, von denen aber keine in allen Vertebraten konserviert ist. Durch einen Vergleich konnten im *Xenopus* Egr-1 Promotor drei konservierte SREs, d.h. SRF-bindende CArG-Boxen und Ets-Bindungsstellen, identifiziert werden. Durch Gelretardationsassays (EMSA) wurde getestet, ob SRF und Elk-1 Proteine in der Lage sind, mit spezifischen Xegr-1 Promotorsequenzen Komplexe zu bilden (Abb. 3-24). Als Oligonukleotide dienten dabei die Xegr-1 Promotorbereiche, die dem distalen SRE des Maus Egr-1 Promotors entsprachen.



Obwohl sich die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen hinsichtlich der Bedeutung der einzelnen SREs für Egr-1 Aktivierung unterscheiden, ist das jeweils distale SRE als wichtig für die Egr-1 Induktion beschrieben worden (McMahon und Monroe, 1995; Watson et al., 1997). SRF kann sowohl allein als auch in Gegenwart von Elk-1 einen Komplex am *Xenopus* SRE formen, während Elk-1 in Abwesenheit von SRF nicht in der Lage ist, das SRE zu binden (Abb. 3-24). Robinson et al. (1997) hatten kürzlich durch 'Differential Display' und 'whole genome'-PCR gezeigt, daß Egr-1 ein direktes Zielgen des murinen Transkriptionsfaktors ETS1 ist. Die Ergebnisse zeigen, daß die SRE/Ets-Elemente im Xegr-1 Promotor als Bindungsstellen für einen Multiproteinkomplex dienen können, der dem für das c-fos SRE beschriebenen Ternärkomplex ähnlich ist. Die *in vitro* Daten identifizieren das distale Xegr-1 SRE nicht nur als potentiell Element für die transkriptionelle Regulation, sondern zeigen gleichfalls die Möglichkeit auf, daß die Wirkung der injizierten Faktoren über eine direkte Bindung an den Xegr-1 Promotor erfolgt.

Aufgrund der Tatsache, daß die heterologen Proteine hSRF und hElk-1 in der Lage sind, am distalen SRE des Xegr-1 Promotors einen ternären Komplex zu bilden, stellt sich die Frage nach der Existenz der homologen Proteine in *Xenopus*. Sind die Faktoren, die am Xegr-1 Promotor einen Komplex bilden können, im Gastrula-Embryo vorhanden und mit Xegr-1 kolokalisiert? Anhand von *in situ* Hybridisierungen mit XSRF (Mohun et al., 1991) und ER81 (Chen et al., Manuskript in Vorbereitung) an seriellen Dünnschnitten von Gastrula-Stadien konnte gezeigt werden, daß die Expression beider Proteine zeitlich und räumlich mit der von Xegr-1 überlappt. XSRF ist das Homologe des humanen SRF, während ER81 ein Ets-verwandtes Protein darstellt. Ebenso wie für ER81 ist für die in *Xenopus* identifizierten Proteine Ets-1 und Ets-2 keine Organisator-spezifische Expression beschrieben worden. Eine Expression von c-ets-1 ist in frühen Stadien vorhanden, fällt während der Gastrulation rasch ab und ist von der Neurulation an bis in die späte Embryogenese wieder nachweisbar (Stiegler et al., 1993). Demgegenüber zeigen Meyer et al. (1997), daß die zygotische Expression von ets-1 und ets-2 nach der MBT ubiquitär beginnt und während der Gastrulation auf einen Ring um den Blastoporus beschränkt wird. In den Neurula- und Schwanzknospenstadien wurden Transkripte u.a. in Neuralleistenzellen, Ganglien und dem Pronephros beobachtet.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß XSRF und einige *Xenopus* ets-Proteine während der Gastrulation in Bereichen exprimiert werden, die mit Xegr-1 überlappen. Sie könnten die terminalen Faktoren der MAP-Signalkaskade darstellen, die an der Regulation von Xegr-1 in der frühen Embryogenese beteiligt sind.

Durch Injektion von SRE enthaltenden Promotorkonstrukten in Embryonen wurde die räumliche Aktivität des Xegr-1 Promotors untersucht. Es galt, die Frage zu klären, ob die spezifischen regulatorischen Elemente innerhalb des Promotorkontextes ausreichend sind, um *in vivo* die Expression des Xegr-1 Gens im Organisator zu regulieren. Als Nachweis der Promotoraktivität

diente die Enzymaktivität ( $\beta$ -Galaktosidase) des gebildeten Reporter-Fusionsproteins. Die Embryonen wurden im Gastrula-Stadium analysiert und zeigten unabhängig vom Promotor-konstrukt eine zufallsverteilte Färbung, deren Verteilung vielmehr von der Injektionsstelle abhängig war, als daß sie die endogene Verteilung von Xegr-1 im Organisator wiedergespiegelt hätte. Im Gegensatz zu Kaufmann et al. (1996), die zeigen konnten, daß injizierte Promotorfragmente des XFD-1' Gens ausreichen, die räumliche Expression des Gens zu simulieren, konnte eine räumliche Aktivierung des Reporter-Gens, die mit der Verteilung des endogenen Xegr-1 Gens korreliert, nicht nachgewiesen werden. Die Tatsache, daß selbst das gesamte Promotorfragment (3.1 kb) nicht ausreichend ist, um ein Muster zu erzeugen, das der räumlichen Expression von Xegr-1 entspricht oder ähnelt, gibt einen Hinweis darauf, daß weitere regulatorische Elemente (zusätzliche Bindungsstellen bzw. weitere Proteine) für die spezifische Aktivierung während der Gastrulation benötigt werden.

#### **4.5 Zur funktionellen Charakterisierung von Xegr-1 in der frühen Embryonalentwicklung**

Für Untersuchungen zur Funktion von Genen bzw. der kodierten Proteine während der frühen Embryogenese ist das *Xenopus*-System gut geeignet, da aufgrund der Größe der befruchteten Oozyten und der ersten Teilungsstadien (ca. 1-1.5 mm) (RNA-)Mikroinjektionen durchgeführt werden können. Dabei ist es z.T. möglich, Effekte, die infolge einer Expression der synthetischen mRNA für den zu charakterisierenden Faktor auftreten, direkt mit einer Funktion zu korrelieren. Dennoch ergeben sich für Expressionsstudien zwei generelle Probleme: Zum einen wissen wir nicht, ob das translatierte Protein in einer biologisch verfügbaren Form vorliegt und ob die injizierte synthetische mRNA in eine biologisch aktive Form des Proteins übersetzt wird. Andererseits läßt sich nur schlecht eine Aussage treffen, inwieweit das Expressionsniveau (gemessen als Signalstärke der Färbung) mit der biologischen Effektivität korreliert (Slack, 1994). Für den Fall, daß zum einen für die kodierende Sequenz eines klonierten Gens mittels Überexpression der RNA keine Funktion definiert werden kann und zum anderen das gleichzeitige Vorhandensein eines endogenen Genprodukts mangels eines spezifischen Antikörpers nicht nachgewiesen werden kann, ergibt sich wie im Fall von Xegr-1 die Schwierigkeit, die Bedeutung der Expression in einem spezifischen Bereich des sich entwickelnden Embryos zu interpretieren. Die Annahme, daß eine Lokalisation im für die Entwicklung essentiellen Gastrula-Organisator mit einer entsprechend relevanten Funktion einhergeht, konnte für *Xenopus* Egr-1 nach den bisherigen Ergebnissen nicht bestätigt werden.

Bei den Versuchen, in denen Fusionsproteine bestehend aus DNA-bindender Domäne von Xegr-1 und der Aktivator- bzw. Repressordomäne heterologer Proteine (E1A und engrailed) verwendet wurden, könnte aufgrund sterischer Effekte eine spezifische DNA-Bindung der Zink-

finger-Domäne verhindert worden sein. Die Ansätze mit DNA-Bindungsdomänen anderer Zinkfingerproteine haben allerdings bereits zu Effekten geführt, die im Hinblick auf die Funktion des untersuchten Gens interpretiert werden konnten (z.B. MyT1, Bellefroid et al., 1996; *Xenopus* tailless, Hollemann et al., 1998; Xbra, Conlon et al., 1996).

Eine weitere Möglichkeit, die Funktion von Xegr-1 zu hinterfragen, bestand in der Identifizierung von NAB-Proteinen, die in der Lage sind, durch Wechselwirkung mit der Repressionsdomäne EGR-Proteine in ihrer Aktivität zu reprimieren. Die im murinen Egr-1 identifizierte, für die NAB-Bindung notwendige Aminosäure Isoleucin (Russo et al., 1993) ist auch in Xegr-1 konserviert. In Transfektionsexperimenten konnten Russo et al. (1995) zeigen, daß eine Egr-1 Substitutionsmutante (I<sup>293</sup>→F) zu einer 15-fachen Steigerung der transkriptionellen Aktivität führt. Durch die ektopische Expression der Xegr-1 Mutante (I261F; 2 ng/Embryo, 2/2 Blastomere) konnte wahrscheinlich eine Aktivierung erzielt werden, die mit einer Häufigkeit von 39% in einer morphologischen Veränderung des Phänotyps resultierte (Abb. 3-17). Die Frage, ob die Defekte im Kopfbereich eine direkte Folge der Überexpression von „aktiviertem“ Xegr-1 darstellen, und ob dies die Funktion von Xegr-1 im Organisator widerspiegelt, läßt sich nach den vorliegenden Daten nicht schlüssig beantworten. Daß eine Inhibierung der NAB-abhängigen Repression von Xegr-1 noch nicht ausreicht, um im Embryo in einem hohen Prozentsatz spezifische Effekte zu generieren, könnte darauf hinweisen, daß weitere Prozesse für die Aktivierung, z.B. posttranslationale Modifikationen, erforderlich sind. Es ist bekannt, daß Phosphorylierung von Egr-1 einerseits zu einem Anstieg der DNA-Bindungsaktivität führt (Huang und Adamson, 1994) und andererseits nicht notwendig für die Aktivität als Repressor ist, da bakteriell exprimiertes Egr-1 *in vitro* die Transkription reprimiert (Zeleznik und Sukhatme, unveröffentlicht; zitiert in Gashler und Sukhatme, 1995). In diesem Zusammenhang wird von Russo et al. (1993) die Möglichkeit diskutiert, daß eine Phosphorylierung die EGR-Repressionsdomäne durch Verhinderung einer Wechselwirkung mit einem Kofaktor inaktiviert und dadurch die Aktivität von Egr-1 erhöht.

Geht man davon aus, daß Egr-1 erst durch Inhibition der Repression aktiviert werden muß, um als Aktivator wirken zu können, bedeutet dies, daß Egr-1 durch die Bindung von NAB-Proteinen in einem inaktiven Grundzustand vorliegt. Eine solche Annahme würde erklären, warum die Überexpression von NAB-1 und NAB-2 keinen zusätzlichen, reprimierenden Effekt erzeugt. Daß die Verwendung heterologer NAB-Proteine zu keinem Einfluß auf die Embryonalentwicklung geführt hat, kann aber auch daran gelegen haben, daß weitere Faktoren oder Modifikationen nicht vorhanden waren. Das Kernlokalisierungssignal (NLS), das über das Plasmidkonstrukt in die synthetische mRNA eingeführt wird, dürfte, sofern es keine essentiellen Domänen des zu bildenden Proteins maskierte, keinen Einfluß gehabt haben, da zumindest für NAB1 gezeigt worden ist, daß es die Egr-1 Funktion nicht durch dessen Retention im Zytoplasma beeinflusst (Russo et al., 1995). NAB1 besitzt ein eigenes NLS und ist nicht in der Lage, die Bindung von Egr-1 an DNA zu verhindern (Swirnoff et al., 1998).

Die Verwendung heterologer Proteine stellt kein prinzipielles Problem dar, da für andere Proteine, z.B. Faktoren der MAP Kinase-Kaskade, gezeigt werden konnte, daß die heterologen Proteine in der Lage sind, im Wirtsorganismus die Funktion des endogenen Proteins zu übernehmen (siehe Kapitel 3.3.3.3).

Die Verwendung von 'antisense' RNA stellt eine weitere Möglichkeit zur spezifischen Unterdrückung der Genexpression dar. In Bezug auf Egr-1 war gezeigt worden, daß 'antisense' Oligonukleotide in myeloischen Zellen die Egr-1 Expression verhindern und dadurch die Makrophagen-Differenzierung blockieren können (Nguyen et al., 1993). Daß Injektion von 'antisense' RNA auch in *Xenopus* erfolgreich eingesetzt werden kann, war durch die Untersuchung der antagonistischen Wechselwirkung zwischen Gsc und Bmp-4 demonstriert worden (Steinbeisser et al., 1995). Und nicht zuletzt die Studien von Lombardo und Slack (1997) zur Inhibition der eFGF Expression in *Xenopus* haben gezeigt, daß zwar eine Reduzierung der endogenen RNA durch 'antisense' RNA nachgewiesen werden kann, diese aber nicht notwendigerweise in der Bildung phänotypischer Effekte am ganzen Embryo resultieren muß. Demnach wiesen mit '<sup>m</sup>7GTP-Cap' [7mG(5')<sub>ppp</sub>(5')G] versehene 'antisense' Transkripte von CS2+ Plasmiden eine gute Stabilität in Embryonen bis zum Ende der Neurulation (Stadium 17) auf, d.h., daß die 'antisense' RNA zum Zeitpunkt der Gastrulation zur Inhibition der Genexpression vorhanden ist. Durch 'antisense' RNA konnte die Stabilität einer 'sense' RNA um 65% und die Proteinexpression um 80% reduziert werden. Allerdings war hierzu ein hoher Überschuß an 'antisense' RNA notwendig (1000-1250x). Eine vollständige Reduktion infolge einer Sättigung konnte nicht erreicht werden. Auch die Injektion von 'antisense' RNA in Embryonen führte zu einer Reduzierung sowohl der endogenen RNA um 60%, als auch des Proteins, was zeigt, daß 'antisense' RNA durchaus ein Mittel ist, um die biologische Aktivität der 'sense' RNA zu inhibieren. Durch Injektion von 'antisense' Xbra RNA konnten Cuncliffe und Smith (1992) allerdings keinen Effekt während der Embryogenese erreichen.

Das Ziel, durch Ausschaltung eines Mitglieds einer Multigenfamilie dessen *in vivo* Funktion in der frühen Embryonalentwicklung zu untersuchen, konnte für Xegr-1 ebenso wenig erreicht werden, wie z.B. für eFGF (Lombardo und Slack, 1997). Dies könnte bedeuten, daß andere (unbekannte) *Xenopus* Egr-Mitglieder zur gleichen Zeit und am gleichen Ort wie Xegr-1 exprimiert werden und dessen Funktion übernehmen können. Die zur Zeit bekannten *Xenopus* EGR-Proteine (Xegr-1, -2 und -3) weisen allerdings zeitlich und räumlich sehr verschiedene Expressionsmuster auf. Eine funktionelle Redundanz durch andere Mitglieder der EGR-Familie könnte daher ein Grund sein, daß auch die anderen Injektionsexperimente zur Inhibition der Xegr-1 Funktion keine morphologischen Effekte zeigten. Vielleicht müssen mehrere Mitglieder einer Multigenfamilie ausgeschaltet werden, um einen (größeren) biologischen Effekt zu erreichen.

Die Resultate aus den Versuchen zur Inhibierung der Egr-1 Funktion in *Xenopus* stehen im Einklang mit Ergebnissen aus Analysen Egr-1 defizienter Mäuse. Lee und Mitarbeiter (1995) inaktivierten in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) beide Egr-1 Kopien und konnten zeigen, daß der Verlust von Egr-1 in ES-Zellen keinen Einfluß auf Zellwachstum und Zelldifferenzierung hat. Homozygot-mutierte Mäuse, denen Egr-1 fehlte, zeigten normale Wachstumsraten und wiesen keine offensichtliche Störung der zellulären Differenzierung auf. Die Autoren vermuten als Ursache eine funktionelle Kompensierung durch redundante Mechanismen, obwohl sie keinen entsprechenden Anstieg der Expression anderer Mitglieder der EGR-Familie beobachten konnten. Darüberhinaus zeigten die Egr-1<sup>-/-</sup> Mäuse keine offensichtlichen Entwicklungs- oder Verhaltensdefekte (Lee et al., 1995). Lediglich die homozygoten Egr-1<sup>-/-</sup> Weibchen waren unfruchtbar, was auf eine gestörte Regulation eines Hypophysenhormons ('Luteinizing Hormon', LH) zurückgeführt werden konnte (Lee et al., 1996a). Eine neuere Studie von Topilko et al. (1998) weist demgegenüber beträchtliche Unterschiede auf: Homozygot-mutierte Egr-1<sup>-/-</sup> Männchen und Weibchen wiesen eine reduzierte Körpergröße auf und waren steril. Als Ergebnis werden dem Egr-1 Protein in Bezug auf hormonproduzierende Zelllinien der vorderen Hypophyse zwei unterschiedliche Funktionen, transkriptionelle Aktivierung und Kontrolle der Zellproliferation, zugeschrieben. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, daß Egr-1 im Gegensatz zu den Befunden von Nguyen et al. (1993) nicht notwendig für die Makrophagen-Differenzierung ist (Lee et al., 1996b).

Diese Zusammenhänge zeigen, daß viele Effekte die mit der Funktion von Egr-1 assoziiert wurden, unabhängig von Egr-1 sind.

Homologe Gene können in der Entwicklung verschiedener Vertebraten einerseits in analogen Strukturen exprimiert werden und in analogen Funktionsabläufen integriert sein, wie beispielsweise bei Xnot/floating head in *Xenopus* und Zebrafisch (Gont et al., 1996; Talbot et al., 1995) oder von Goosecoid in *Xenopus*, Maus und Huhn während der Gastrulation (Cho et al., 1991; Blum, et al., 1992; Izpisua-Belmonte et al., 1993) demonstriert wurde. Auf der anderen Seite kann die Tatsache, daß Gene, deren Homologe im *Xenopus*-Organisator exprimiert werden, bei Inaktivierung in der Maus keinen frühen Phänotyp entwickeln (gsc, Rivera-Perez et al., 1995; Egr-1, Lee et al., 1996a; Topilko et al., 1998) als Anhaltspunkt dafür dienen, daß sie – insbesondere in einer Multigen-Familie – durch andere Faktoren funktionell substituiert werden können. Aufgrund fehlender embryonaler Defekte bei der Inaktivierung des murinen Egr-1 Gens besteht die Möglichkeit, daß Xegr-1 trotz seiner frühen, Organisator-spezifischen Expression nicht notwendigerweise eine essentielle Funktion in der Embryonalentwicklung von *Xenopus* besitzt.

Dennoch erlaubt die Isolierung des *Xenopus* Egr-1 Gens und des Xegr-1 Promotors die Betrachtung einiger Aspekte im Rahmen der Embryonalentwicklung: Zum einen zeigt Xegr-1 als

das erste im Organisator identifizierte Zinkfinger-Protein zu Beginn der Gastrulation ein Expressionsmuster in einem spezifischen Bereich des Organisators. Im Zusammenhang mit anderen Genen, die im Organisator in verschiedenen Regionen exprimiert werden, stellt es daher einen weiteren Anhaltspunkt für eine komplexe Unterteilung des Organisators in einzelne Domänen dar. Zweitens kann *Xegr-1* als Beispiel für die Genregulation in der Embryonalentwicklung eines Vertebraten dienen: Einige Gene, die früh im Organisator exprimiert werden, zeigen in der späteren Entwicklung eine sekundäre Expression. Dies kann zum einen bedeuten, daß die Genprodukte eine duale Funktion haben, oder andererseits ein Hinweis sein, daß für die Regulation von Entwicklungsprozessen in aufeinanderfolgenden Stadien durch den gleichen Faktor *ein* Satz von Liganden, Rezeptoren, intrazellulären Effektoren und transkriptionellen Regulatoren verwendet wird. Dabei induzieren Signale die regionale Expression von Transkriptionsfaktoren, die ihrerseits neue, räumlich begrenzte Signalwege induzieren bzw. kontrollieren. Als grundlegende Einheit eines derartigen regulatorischen Netzwerks können Elemente des Typs [Signal→ Transkriptionsfaktor→ Signal] angesehen werden (Arnone und Davidson, 1997; Davidson, 1993). Für die Regulation von *Xegr-1* in der frühen Embryogenese lassen sich somit folgende „Module“ erkennen: [Wachstumshormon→ *Xbra*→ FGF], [FGF→ *Xegr-1*→ ... (unbekanntes Signal)] (siehe Abb. 4-2). Die auf der Isolierung von *Xegr-1* basierenden Daten (diese Arbeit und Krain, 1997) haben gezeigt, daß an der *Egr-1* Aktivierung in der frühen *Xenopus* Embryonalentwicklung prinzipiell die gleichen Signalkaskaden und transkriptionellen Regulatoren beteiligt sind wie in Säugetierzellen. Durch die Klonierung des *Xegr-1* Promotors war es möglich, nachzuweisen, daß der MAP Kinase-Signalweg über die cis-regulatorischen Elemente direkt auf das *Xegr-1* Gen wirken kann. Abschließend läßt sich feststellen, daß mit *Xegr-1* neben FGF ein weiteres, indirektes Zielgen für *Xbra* identifiziert worden ist.

#### 4.6 *Xegr-3* in der Entwicklung von *Xenopus laevis*

Der ebenfalls im Verlauf dieser Arbeit identifizierte Zinkfinger-Transkriptionsfaktor *Xegr-3* stellt das *Egr-3* Homologe der *Egr*-Genfamilie in *Xenopus* dar (siehe Kapitel 3.1.8, 3.1.9, 4.1). Studien zur funktionellen Charakterisierung haben gezeigt, daß eine Transaktivierung durch *Egr-3* infolge der fast identischen DNA-bindenden Zinkfinger-Domäne durch die gleiche Zielsequenz wie für *Egr-1* erfolgen kann (Patwardhan et al., 1991). Ebenso wie *Egr-1* gehört *Egr-3* zu den frühen Genen, die nach Stimulierung ohne *de novo* Proteinbiosynthese andere Zielgene induzieren können ('immediate-early response genes'). Eine *Egr-3* Expression ist bisher nur für Gewebe der adulten Ratte beschrieben worden und zeigt, daß die einzelnen *EGR*-Subtypen trotz vergleichbarer Bindungseigenschaften in den adulten Organen unterschiedlich exprimiert werden

(Patwardhan et al., 1991; Milbrandt, 1987; Lemaire et al., 1988). In Northern Blot-Analysen konnten beispielsweise in der Niere nur Egr-3, aber keine Egr-1 Transkripte nachgewiesen werden. Demgegenüber konnte allerdings eine Egr-1 Expression in kultivierten Nierenzellen, sowie in isoliert perfundierter Niere nachgewiesen werden (Joannidis et al., 1997). Zur Fragestellung, ob Egr-3 während der Entwicklung eine Rolle spielt, liegen keine Ergebnisse vor.

Die Identifizierung des Egr-3 Homologen in *Xenopus* ermöglichte es, die Expression in der frühen Embryonalentwicklung zu untersuchen. Dabei zeigte sich, daß die drei *Xenopus* EGR-Proteine in der Entwicklung differentiell exprimiert werden (Kapitel 3.2.1, 3.2.3; Bradley et al., 1992). Bei der Expressionsanalyse in ganzen Embryonen wurden Transkripte für Xegr-3 im Vergleich mit Xegr-1 und -2 erst später, ab den Neurula-Stadien detektiert.

Vergleicht man die muskelspezifische Expression von Xegr-3 mit XMyoD, ein für die Muskeldifferenzierung notwendiges bHLH Protein (Hopwood et al., 1992; Weintraub, 1993), fällt auf, daß die Transkripte entlang der anterior-posterioren Achse von Schwanzknospen-Stadien ebenfalls nicht gleichmäßig exprimiert werden. Während Xegr-3 cranial in den anterioren Somiten stärker exprimiert wird als caudal, ist die XMyoD Expression im caudalen Schwanzbereich, wo noch Muskeldifferenzierung stattfindet, höher als in den anterioren Somiten. Im Gegensatz zu Xegr-3 ist die XMyoD Expression bereits in Gastrula-Stadien vorhanden.

Für eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, Signalmolekülen und -Rezeptoren, sowie anderen Faktoren ist eine Expression im Pronephros (Pronephros-Anlage, Tubuli, Glomerus, pronephrischer Gang) beschrieben worden (detaillierte Übersicht in Davies und Brändli, 1997); dennoch sollen im Folgenden nur drei Beispiele erwähnt werden: Der Transkriptionsfaktor XPax-2 (Heller und Brändli, 1997) zeigt im Bereich von Pronephros, Hinterhirn und Wirbelsäule überlappende Expressionsdomänen mit Xegr-3. Auch der Transkriptionsregulator Xl-ets-2 (Meyer et al., 1997) weist in Schwanzknospen-Stadien ein ähnliches Expressionsmuster wie Xegr-3 auf und wird neben der Expression in Pronephros, pronephrischem Gang und Wirbelsäule auch in den Ganglien im Bereich der Augen und des Ohrbläschens stark exprimiert. Im Gegensatz zu XPax-2 und Xl-ets-2, die beide bereits früher als Xegr-3 exprimiert werden, existiert mit dem *Xenopus* Wilms Tumor-Gen (xWT1; Carroll und Vize, 1996) ein Transkriptionsfaktor, dessen Expression von Stadium 20 bis zum späten Schwanzknospen-Stadium auf das entstehende Nierensystem beschränkt bleibt. Das Tumorsuppressor-Gen WT1 kodiert für ein Zinkfinger-Protein, dessen Zinkfinger-Domäne der der EGR-Familie sehr ähnlich ist und an die gleiche EGR Konsensus-Sequenz binden kann (Gessler et al., 1990; Call et al., 1990). Es wird in *Xenopus* im Glomus des Pronephros exprimiert.

Welche Funktion Xegr-3 beispielsweise bei der Muskelbildung oder der Entstehung der (embryonalen) Niere im Rahmen der frühen Entwicklung besitzt, bleibt zu klären.

## 4.7 Ausblick

Zur weiteren Charakterisierung von Xegr-1 sollte untersucht werden, ob und wo eine spezifische Expression während der Organogenese stattfindet. Die Herstellung eines Antikörpers zum Nachweis des endogenen Proteins wäre ein wichtiger Schritt, um den tatsächlichen Wirkungort von Xegr-1 lokalisieren zu können. Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der Regulation von Xegr-1 stellt die Promotoranalyse in transgenen Fröschen dar. Dafür stehen seit kurzem zwei Strategien zur Verfügung, die die Nachteile des *Xenopus*-Systems umgehen, denn aufgrund der langen Generationszeit und des tetraploiden Chromosomensatzes sind Mutagenese- und Züchtungsexperimente in *Xenopus* nicht in der Art durchführbar, wie dies für Analysen in Maus oder Fisch der Fall ist. Kroll und Amaya (1996) etablierten eine Methode, bei der Plasmide durch Restriktionsenzyme in dekondensierte Spermienkerne integriert und anschließend in unbefruchtete Oozyten transplantiert wurden (REMI, restriction enzyme mediated integration). Die zweite Methode zur Erzeugung transgener Frösche basiert auf der Verwendung viraler invertierter Sequenzen (ITRs, inverted terminal repeats) des Adeno-assoziierten Virus (Fu et al., 1998).

Im Hinblick auf eine Analyse des Xegr-1 Promotors könnte sich allerdings die nur schwache Expression des Xegr-1 Gens als nachteilig herausstellen.

Für Xegr-3 gilt es, nach Vervollständigung des 5'-terminalen Bereichs der cDNA die Beteiligung an Entwicklungsprozessen wie z.B. der Morphogenese des Pronephros oder der Muskelentwicklung funktionell zu charakterisieren.

## Anmerkung

Teile dieser Arbeit wurden vorab veröffentlicht:

Panitz F, Krain B, Hollemann T, Nordheim A, Pieler T (1998). The Spemann Organizer-expressed zinc finger gene Xegr-1 responds to the MAP kinase/Ets-SRF signal transduction pathway. EMBO J. 17, 4414-4425.



## 5. Literaturverzeichnis

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Amaya E, Stein PA, Musci TJ, Kirschner MW (1993). FGF signalling in the early specification of mesoderm in *Xenopus*. *Development* 118, 477-487.
- Amaya E, Musci TJ, Kirschner MW (1991). Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 66, 257-270.
- Arnone MI und Davidson EH (1997). The hardwiring of development: organization and function of genomic regulatory systems. *Development* 124, 1851-1864.
- Artinger M, Blitz I, Inoue K, Tran U, Cho KW (1997). Interaction of goosecoid and brachyury in *Xenopus* mesoderm patterning. *Mech. Dev.* 65, 187-196.
- Avruch J, Zhang XF, Kyriakis JM (1994). Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends. Biochem. Sci.* 19, 279-283.
- Bellefroid EJ, Bourguignon C, Hollemann T, Ma Q, Anderson DJ, Kintner C, Pieler T (1996). X-MyT1, a *Xenopus* C2HC-type zinc finger protein with a regulatory function in neuronal differentiation. *Cell* 87, 1191-1202.
- Bellefroid EJ, Marine JC, Ried T, Lecocq PJ, Riviere M, Amemiya C, Poncelet DA, Coulie PG, de Jong P, Szpirer C, et al. (1993). Clustered organization of homologous KRAB zinc-finger genes with enhanced expression in human T lymphoid cells. *EMBO J.* 12, 1363-1374.
- Bellefroid EJ, Lecocq PJ, Benhida A, Poncelet DA, Belayew A, Martial JA (1989). The human genome contains hundreds of genes coding for finger proteins of the Kruppel type. *DNA* 8, 377-387.
- Berg JM (1988). Proposed structure for the zinc-binding domains from transcription factor IIIA and related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 99-102.
- Berg JM und Shi Y (1996). The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science* 271, 1081-1085.
- Biesiada E, Razandi M, Levin ER (1996). Egr-1 activates basic fibroblast growth factor transcription. Mechanistic implications for astrocyte proliferation. *J. Biol. Chem.* 271, 18576-18581.
- Blitz IL und Cho KW (1995). Anterior neurectoderm is progressively induced during gastrulation: the role of the *Xenopus* homeobox gene orthodenticle. *Development* 121, 993-1004.
- Blum M, Gaunt SJ, Cho KW, Steinbeisser H, Blumberg B, Bittner D, DeRobertis EM. (1992). Gastrulation in the mouse: the role of the homeobox gene goosecoid. *Cell* 69, 1097-1106.
- Bradley LC, Snape A, Bhatt S, Wilkinson DG (1992). The structure and expression of the *Xenopus* Krox-20 gene: conserved and divergent patterns of expression in rhombomeres and neural crest. *Mech. Dev.* 40, 73-84.
- Boterenbrood EC und Niewkoop PD (1973). The formation of the mesoderm in Urodelan amphibians: V. Its regional induction by the endoderm. *Wilhelm Roux's Arch. Entwicklungsmech. Org.* 173, 319-332.
- Bouwmeester T, Kim S, Sasai Y, Lu B, de Robertis EM (1996). Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* 382, 595-601.

- Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Glaser T, Housman DE (1991). Isolation, characterization, and expression of the murine Wilms' tumor gene (WT1) during kidney development. *Mol. Cell. Biol.* 11, 1707-1712.
- Cahill MA, Janknecht R, Nordheim A (1996). Signalling pathways: jack of all cascades. *Curr. Biol.* 6, 16-19.
- Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Rose EA, Kral A, Yeger H, Lewis WH, Jones C, Housman DE (1990). Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60, 509-520.
- Candia AF, Watabe T, Hawley SH, Onichtchouk D, Zhang Y, Derynck R, Niehrs C, Cho KW (1997). Cellular interpretation of multiple TGF-beta signals: intracellular antagonism between activin/BVg1 and BMP-2/4 signaling mediated by Smads. *Development* 124, 4467-4480.
- Caricasole A, Duarte A, Larsson SH, Hastie ND, Little M, Holmes G, Todorov I, Ward A (1996). RNA binding by the Wilms tumor suppressor zinc finger proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7562-7566.
- Carroll TJ und Vize PD (1996). Wilms' tumor suppressor gene is involved in the development of disparate kidney forms: evidence from expression in the *Xenopus* pronephros. *Dev. Dyn.* 206, 131-138.
- Chang YN, Jeang KT, Chiou CJ, Chan YJ, Pizzorno M, Hayward GS (1993). Identification of a large bent DNA domain and binding sites for serum response factor adjacent to the NFI repeat cluster and enhancer region in the major IE94 promoter from simian cytomegalovirus. *J. Virol.* 67, 516-529.
- Changelian PS, Feng P, King TC, Milbrandt J (1989). Structure of the NGFI-A gene and detection of upstream sequences responsible for its transcriptional induction by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 377-381.
- Chavrier P, Lemaire P, Revelant O, Bravo R, Charnay P (1988a). Characterization of a mouse multigene family that encodes zinc finger structures. *Mol. Cell. Biol.* 8, 1319-1326.
- Chavrier P, Zerial M, Lemaire P, Almendral J, Bravo R, Charnay P (1988b). A gene encoding a protein with zinc fingers is activated during G0/G1 transition in cultured cells. *EMBO J.* 7, 29-35.
- Chen X, Rubock MJ, Whitman M (1996). A transcriptional partner for MAD proteins in TGF-beta signalling. *Nature* 383, 691-696.
- Cho KW, Blumberg B, Steinbeisser H, de Robertis EM (1991). Molecular nature of Spemann's organizer: the role of the *Xenopus* homeobox gene goosecoid. *Cell* 67, 1111-1120.
- Chowdhury K, Deutsch U, Gruss P (1987). A multigene family encoding several 'Finger' structures is present and differentially active in mammalian genomes. *Cell* 48, 771-778.
- Christian JL, McMahon JA, McMahon AP, Moon RT (1991). Xwnt-8, a *Xenopus* Wnt-1/int-1-related gene responsive to mesoderm-inducing growth factors, may play a role in ventral mesodermal patterning during embryogenesis. *Development* 111, 1045-1055.
- Christy BA, Lau LF, Nathans D (1988). A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with "zinc finger" sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7857-7861.
- Clarke PR (1994). Switching off MAP kinases. *Curr. Biol.* 4, 647-650.
- Conlon FL, Sedgwick SG, Weston KM, Smith JC (1996). Inhibition of Xbra transcription activation causes defects in mesodermal patterning and reveals autoregulation of Xbra in dorsal mesoderm. *Development* 122, 2427-2435.
- Crosby SD, Veile RA, Donis-Keller H, Baraban JM, Bhat RV, Simburger KS, Milbrandt J (1992). Neural-specific expression, genomic structure, and chromosomal localization of the gene encoding the zinc-finger transcription factor NGFI-C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4739-4743.

- Crosby SD, Puetz JJ, Simburger KS, Fahrner TJ, Milbrandt J (1991). The early response gene NGFI-C encodes a zinc finger transcriptional activator and is a member of the GCGGGGGCG (GSG) element-binding protein family. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3835-3841.
- Cunliffe V und Smith JC (1994). Specification of mesodermal pattern in *Xenopus laevis* by interactions between Brachyury, noggin and Xwnt-8. *EMBO J.* 13, 349-359.
- Cunliffe V und Smith JC (1992). Ectopic mesoderm formation in *Xenopus* embryos caused by widespread expression of a Brachyury homologue. *Nature* 358, 427-430.
- Dahmane N, Lee J, Robins P, Heller P, Ruiz i Altaba A (1997). Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. *Nature* 389, 876-881.
- Dale L, Howes G, Price BM, Smith JC (1992). Bone morphogenetic protein 4: a ventralizing factor in early *Xenopus* development. *Development* 115, 573-585.
- Dale TC (1998). Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem. J.* 329, 209-223.
- Davidson EH (1993). Later embryogenesis: regulatory circuitry in morphogenetic fields. *Development* 118, 665-690.
- Davies JA und Brandli AW, "The Kidney Development Database"; <http://mbisg2.sbc.man.ac.uk/kidbase/kidhome.html> und <http://www.ana.ed.ac.uk/anatomy/database/kidbase/kidhome.html>.
- De Block M und Debrouwer D (1993). RNA-RNA in situ hybridization using digoxigenin-labeled probes: the use of high-molecular-weight polyvinyl alcohol in the alkaline phosphatase indoxyl-nitroblue tetrazolium reaction. *Anal. Biochem.* 215, 86-89.
- Derynck R und Zhang Y (1996). Intracellular signalling: the mad way to do it. *Curr. Biol.* 6, 1226-1229.
- Desjarlais JR und Berg JM (1993). Use of a zinc-finger consensus framework and specificity rules to design specific DNA binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2256-2260.
- Dirksen ML und Jamrich M (1992). A novel, activin-inducible, blastopore lip-specific gene of *Xenopus laevis* contains a fork head DNA-binding domain. *Genes Dev.* 6, 599-608.
- Drummond IA, Rohwer-Nutter P, Sukhatme VP (1994). The zebrafish *egr1* gene encodes a highly conserved, zinc-finger transcriptional regulator. *DNA Cell. Biol.* 13, 1047-1055.
- Dynan WS und Tjian R (1983). The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35, 79-87.
- El-Baradi T und Pieler T (1991). Zinc finger proteins: what we know and what we would like to know. *Mech. Dev.* 35, 155-169.
- Engelke DR, Ng SY, Shastry BS, Roeder RG (1980). Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S RNA genes. *Cell* 19, 717-728.
- Etkin L, Pearman B, Roberts M, Bektesh SL (1984). Replication, integration and expression of exogenous DNA injected into fertilized eggs of *Xenopus laevis*. *Differentiation.* 26, 194-202.
- Fainsod A, Deissler K, Yelin R, Marom K, Epstein M, Pillemer G, Steinbeisser H, Blum M (1997). The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP-4. *Mech. Dev.* 63, 39-50.
- Fairall L, Schwabe JWR, Chapman L, Finch JT, Rhodes D (1993). The crystal structure of a two zinc-finger peptide reveals an extension to the rules for zinc-finger/DNA recognition. *Nature* 366, 483-487.
- Franz T (1994). Extra-toes (Xt) homozygous mutant mice demonstrate a role for the Gli-3 gene in the development of the forebrain. *Acta Anat* 150, 38-44.
- Fu Y, Wang Y, Evans SM (1998). Viral sequences enable efficient and tissue-specific expression of transgenes in *Xenopus*. *Nat. Biotechnol.* 16, 253-257.

- Gashler A und Sukhatme VP (1995). Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 50, 191-224.
- Gashler AL, Swaminathan S, Sukhatme VP (1993). A novel repression module, an extensive activation domain, and a bipartite nuclear localization signal defined in the immediate-early transcription factor Egr-1. *Mol. Cell Biol.* 13, 4556-4571.
- Gawantka V, Delius H, Hirschfeld K, Blumenstock C, Niehrs C (1995). Antagonizing the Spemann organizer: role of the homeobox gene *Xvent-1*. *EMBO J.* 14, 6268-6279.
- Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GA (1990). Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 343, 774-778.
- Gilbert SF (1994). *Developmental Biology* (4th ed.). Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Gont LK, Fainsod A, Kim SH, De Robertis EM (1996). Overexpression of the homeobox gene *Xnot-2* leads to notochord formation in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 174, 174-178.
- Gont LK, Steinbeisser H, Blumberg B, de Robertis EM (1993). Tail formation as a continuation of gastrulation: the multiple cell populations of the *Xenopus* tailbud derive from the late blastopore lip. *Development* 119, 991-1004.
- Gotoh Y, Masuyama N, Suzuki A, Ueno N, Nishida E (1995). Involvement of the MAP kinase cascade in *Xenopus* mesoderm induction. *EMBO J.* 14, 2491-2498.
- Graff JM, Bansal A, Melton DA (1996). *Xenopus* Mad proteins transduce distinct subsets of signals for the TGF beta superfamily. *Cell* 85, 479-487.
- Green JB, New HV, Smith JC (1992). Responses of embryonic *Xenopus* cells to activin and FGF are separated by multiple dose thresholds and correspond to distinct axes of the mesoderm. *Cell* 27, 731-739.
- Guan KL (1994). The mitogen activated protein kinase signal transduction pathway: from the cell surface to the nucleus. *Cell. Signal.* 6, 581-589.
- Gupta MP, Gupta M, Zak R, Sukhatme VP (1991). Egr-1, a serum-inducible zinc finger protein, regulates transcription of the rat cardiac alpha-myosin heavy chain gene. *J. Biol. Chem.* 266, 12813-12816.
- Haber DA, Park S, Maheswaran S, Englert C, Re GG, Hazen-Martin DJ, Sens, DA, Garvin AJ (1993). WT1-mediated growth suppression of Wilms tumor cells expressing a WT1 splicing variant. *Science* 262, 2057-2059.
- Haber DA, Buckler AJ, Glaser T, Call KM, Pelletier J, Sohn RL, Douglass EC, Housman DE (1990). An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor. *Cell* 61, 1257-1269.
- Han K und Manley JL (1993). Functional domains of the Drosophila Engrailed protein. *EMBO J.* 12, 2723-2733.
- Harland R und Gerhart J (1997). Formation and function of Spemann's organizer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 611-667.
- Hastie ND (1994). The genetics of Wilms' tumor - A case of disrupted development. *Annu. Rev. Genet.* 28, 523-558.
- Härd T, Kellenbach E, Boelens R, Maler BA, Dahlman K, Freedman LP, Carlstedt-Duke J, Yamamoto KR, Gustafsson JA, Kaptein R (1990). Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science* 249, 157-160.
- Heasman J (1997). Patterning the *Xenopus* blastula. *Development* 124, 4179-4191.
- Heller N und Brändli AW (1997). *Xenopus* Pax-2 displays multiple splice forms during embryogenesis and pronephric kidney development. *Mech. Dev.* 69, 83-104.

- Hipskind RA, Rao VN, Mueller CG, Reddy ES, Nordheim A (1991). Ets-related protein Elk-1 is homologous to the c-fos regulatory factor p62TCF. *Nature* 354, 531-534.
- Hogan BL (1996a). Bone morphogenetic proteins in development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 432-438.
- Hogan BL (1996b). Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* 10, 1580-1594.
- Holleman T, Bellefroid E, Pieler T (1998). The *Xenopus* homologue of the *Drosophila* gene *tailless* has a function in early eye development. *Development* 125, 2425-2432.
- Holleman T (1994). X-sal: ein Zinkfinger-Gen in der frühen Embryogenese von *Xenopus laevis*. Dissertation, Universität Göttingen.
- Holst C, Skerka C, Lichter P, Bialonski A, Zipfel PF (1993). Genomic organization, chromosomal localization and promoter function of the human zinc-finger gene pAT133. *Hum. Mol. Genet.* 2, 367-372.
- Honda BM und Roeder RG (1980). Association of a 5S gene transcription factor with 5S RNA and altered levels of the factor during cell differentiation. *Cell* 22, 119-126.
- Hopwood ND, Pluck A, Gurdon JB, Dilworth SM (1992). Expression of XMyoD protein in early *Xenopus laevis* embryos. *Development* 114, 31-38.
- Hu RM und Levin ER (1994). Astrocyte growth is regulated by neuropeptides through Tis-8 and basic fibroblast growth factor. *J. Clin. Invest.* 93, 1820-1827.
- Huang RP und Adamson ED (1994). The phosphorylated forms of the transcription factor, Egr-1, bind to DNA more efficiently than non-phosphorylated. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200, 1271-1216.
- Isaacs HV, Tannahill D, Slack JM (1992). Expression of a novel FGF in the *Xenopus* embryo. A new candidate inducing factor for mesoderm formation and anteroposterior specification. *Development* 114, 711-720.
- Izpisua-Belmonte JC, de Robertis EM, Storey KG, Stern CD (1993). The homeobox gene *gooseoid* and the origin of organizer cells in the early chick blastoderm. *Cell* 74, 645-659.
- Jain N, Mahendran R, Philp R, Guy GR, Tan YH, Cao X (1996). Casein kinase II associates with Egr-1 and acts as a negative modulator of its DNA binding and transcription activities in NIH 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 271, 13530-13536.
- Janknecht R und Nordheim A (1992). Elk-1 protein domains required for direct and SRF-assisted DNA-binding. *Nucleic. Acids. Res.* 20, 3317-3324.
- Jansen E, Ayoubi TA, Meulemans SM, Van De Ven WJ (1997). Regulation of human prohormone convertase 2 promoter activity by the transcription factor EGR-1. *Biochem. J.* 328, 69-74.
- Jaynes JB und O'Farrell PH (1991). Active repression of transcription by the engrailed homeodomain protein. *EMBO J.* 10, 1427-1433.
- Joannidis M, Cantley LG, Spokes K, Stuart-Tilley AK, Alper SL, Epstein FH (1997). Modulation of c-fos and egr-1 expression in the isolated perfused kidney by agents that alter tubular work. *Kidney Int.* 52, 130-139.
- Joho KE, Darby MK, Crawford ET, Brown DD (1990). A finger protein structurally similar to TFIIIA that binds exclusively to 5S RNA in *Xenopus*. *Cell* 61, 293-300.
- Jones CM, Lyons KM, Lapan PM, Wright CV, Hogan BL (1992). DVR-4 (bone morphogenetic protein-4) as a posterior-ventralizing factor in *Xenopus* mesoderm induction. *Development* 115, 639-647.
- Joseph LJ, Le Beau MM, Jamieson GA Jr, Acharya S, Shows TB, Rowley JD, Sukhatme VP (1988). Molecular cloning, sequencing, and mapping of EGR2, a human early growth response gene encoding a protein with "zinc-binding finger" structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7164-7168.

- Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR, Tjian R (1987). Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 51, 1079-1090.
- Kao KR und Elinson RP (1988). The entire mesodermal mantle behaves as Spemann's organizer in dorsoanterior enhanced *Xenopus laevis* embryos. *Dev. Biol.* 127, 64-77
- Kaufmann E, Paul H, Friedle H, Metz A, Scheucher M, Clement JH, Knöchel W (1996). Antagonistic actions of activin A and BMP-2/4 control dorsal lip-specific activation of the early response gene XFD-1' in *Xenopus laevis* embryos. *EMBO J.* 15, 6739-6749.
- Khachigian LM, Lindner V, Williams AJ, Collins T (1996). Egr-1-induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury. *Science* 271, 1427-1431.
- Khachigian LM, Williams AJ, Collins T (1995). Interplay of Sp1 and Egr-1 in the proximal platelet-derived growth factor A-chain promoter in cultured vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270, 27679-27686.
- Kimelman D und Kirschner M (1987). Synergistic induction of mesoderm by FGF and TGF-beta and the identification of an mRNA coding for FGF in the early *Xenopus* embryo. *Cell* 51, 869-877.
- Kinzler KW und Vogelstein B (1990). The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Mol. Cell. Biol.* 10, 634-642.
- Kinzler KW, Ruppert JM, Bigner SH, Vogelstein B (1988). The GLI gene is a member of the Krüppel family of zinc finger proteins. *Nature* 332, 371-374.
- Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, Trent JM, Law ML, O'Brien SJ, Wong, AJ, Vogelstein B (1987). Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science* 236, 70-73.
- Klocke B, Köster M, Hille S, Bouwmeester T, Böhm S, Pieler T, Knöchel W (1994). The FAR Domain defines a new *X. laevis* zinc finger protein subfamily with specific RNA Homopolymer binding activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1217, 81-89.
- Knöchel W, Pötting A, Köster M, El-Baradi T, Nietfeld W, Bouwmeester T, Pieler T (1989). Evolutionary conserved modules associated with zinc fingers in *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6097-6100.
- Kobel HR und Du Pasquier L (1986). Genetics of polyploid *Xenopus*. *Trends Genetics* 2, 310-315.
- Köster M, Pieler T, Pötting A, Knöchel W (1988). The finger motif defines a multigene family represented in the maternal mRNA of *Xenopus laevis* oocytes. *EMBO J.* 7, 1735-1741.
- Kozak M (1991). An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J. Cell. Biol.* 115, 887-903.
- Kretzschmar M und Massague J (1998). SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 103-111.
- Krishnaraju K, Nguyen HQ, Liebermann DA, Hoffman B (1995). The zinc finger transcription factor Egr-1 potentiates macrophage differentiation of hematopoietic cells. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5499-5507.
- Krain B (1997). Rolle von SRF und Ets-Proteinen in der frühen Embryonalentwicklung des Krallenfrosches *Xenopus laevis*. Dissertation, Universität Hannover.
- Kroll KL und Amaya E (1996). Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development* 122, 3173-3183.
- LaBonne C, Burke B, Whitman M (1995). Role of MAP kinase in mesoderm induction and axial patterning during *Xenopus* development. *Development* 121, 1475-1486.
- Lamond AI (1995). RNA processing. Wilms' tumour -The splicing connection? *Curr. Biol.* 5, 862-865.
- Lane MC und Keller R (1997). Microtubule disruption reveals that Spemann's organizer is subdivided into two domains by the vegetal alignment zone. *Development* 124, 895-906.

- Larsson SH, Charlier JP, Miyagawa K, Engelkamp D, Rassoulzadegan M, Ross A, Cuzin F, van Heyningen V, Hastie ND (1995). Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* 81, 391-401.
- Latinkic BV, Umbhauer M, Neal KA, Lerchner W, Smith JC, Cunliffe V (1997). The *Xenopus* Brachyury promoter is activated by FGF and low concentrations of activin and suppressed by high concentrations of activin and by paired-type homeodomain proteins. *Genes Dev.* 1997 11, 3265-3276
- Lee J, Platt KA, Censullo P, Ruiz i Altaba A (1997). Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* 124, 2537-2552.
- Lee SL, Sadovsky Y, Swirnoff AH, Polish JA, Goda P, Gavrilina G, Milbrandt J (1996a). Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1). *Science* 273, 1219-1221.
- Lee SL, Wang Y, Milbrandt J (1996b). Unimpaired macrophage differentiation and activation in mice lacking the zinc finger transcription factor NGFI-A (EGR1). *Mol. Cell Biol.* 16, 4566-4572.
- Lee SL, Tourtellotte LC, Wesselschmidt RL, Milbrandt J (1995). Growth and differentiation proceeds normally in cells deficient in the immediate early gene NGFI-A. *J. Biol. Chem.* 270, 9971-9977.
- Lee MS, Gippert GP, Soman KV, Case DA, Wright PE (1989). Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain. *Science* 245, 635-637.
- Lemaire P und Kodjabachian L (1996). The vertebrate organizer: structure and molecules. *Trends. Genet.* 12, 525-531.
- Lemaire P, Garrett N, Gurdon JB (1995). Expression cloning of Siamois, a *Xenopus* homeobox gene expressed in dorsal-vegetal cells of blastulae and able to induce a complete secondary axis. *Cell* 81, 85-94.
- Lemaire P, Revelant O, Bravo R, Charnay P (1988). Two mouse genes encoding potential transcription factors with identical DNA-binding domains are activated by growth factors in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4691-4695.
- Letovsky J und Dynan WS (1989). Measurement of the binding of transcription factor Sp1 to a single GC box recognition sequence. *Nucleic Acids Res.* 17, 2639-2653.
- Leyns L, Bouwmeester T, Kim SH, Piccolo S, De Robertis EM (1997). Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell* 88, 747-756.
- Lillie JW und Green MR (1989). Transcription activation by the adenovirus E1a protein. *Nature* 338, 39-44.
- Lim RW, Varnum BC, Herschman HR (1987). Cloning of tetradecanoyl phorbol ester-induced 'primary response' sequences and their expression in density-arrested Swiss 3T3 cells and a TPA non-proliferative variant. *Oncogene* 1, 263-270.
- Liu C, Rangnekar VM, Adamson E, Mercola D (1998). Suppression of growth and transformation and induction of apoptosis by EGR-1. *Cancer Gene Ther.* 5, 3-28.
- Liu C, Adamson E, Mercola D (1996a). Transcription factor EGR-1 suppresses the growth and transformation of human HT-1080 fibrosarcoma cells by induction of transforming growth factor beta 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11831-11836.
- Liu C, Calogero A, Ragona G, Adamson E, Mercola D (1996b). EGR-1, the reluctant suppression factor: EGR-1 is known to function in the regulation of growth, differentiation, and also has significant tumor suppressor activity and a mechanism involving the induction of TGF-beta1 is postulated to account for this suppressor activity. *Crit. Rev. Oncog.* 7, 101-125.
- Lombardo A und Slack JM (1997). Inhibition of eFGF expression in *Xenopus* embryos by antisense mRNA. *Dev. Dyn.* 208, 162-169.

- Mackman N (1995). Regulation of the tissue factor gene. *FASEB J.* 9, 883-889.
- Madden SL, Cook DM, Morris JF, Gashler A, Sukhatme VP, Rauscher FJ, III (1991). Transcriptional repression mediated by the WT1 Wilms tumor gene product. *Science* 253, 1550-1553.
- Mages HW, Stamminger T, Rilke O, Bravo R, Kroczeck RA (1993). Expression of PILOT, a putative transcription factor, requires two signals and is cyclosporin A sensitive in T cells. *Int. Immunol.* 5, 63-70.
- Marin M, Karis A, Visser P, Grosveld F, Philipsen S (1997). Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell* 89, 619-628.
- Marine JC, Bellefroid EJ, Pendeville H, Martial JA, Pieler T (1997). A role for *Xenopus* Gli-type zinc finger proteins in the early embryonic patterning of mesoderm and neuroectoderm. *Mech. Dev.* 63, 211-225.
- Marini NJ, Etkin LD, Benbow RM (1988). Persistence and replication of plasmid DNA microinjected into early embryos of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 127, 421-434.
- Marshall CJ (1995). MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 5, 82-89.
- Maslanski JA, Leshko L, Busa WB (1992). Lithium-sensitive production of inositol phosphates during amphibian embryonic mesoderm induction. *Science* 256, 243-245.
- Massague J (1996). TGFbeta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell* 85, 947-950.
- Matheny C, Day ML, Milbrandt J (1994). The nuclear localization signal of NGFI-A is located within the zinc finger DNA binding domain. *J. Biol. Chem.* 269, 8176-81.
- Matsunaga E (1981). Genetics of Wilms' tumor. *Hum. Genet.* 57, 231-246.
- McMahon SB und Monroe JG (1995). A ternary complex factor-dependent mechanism mediates induction of *egr-1* through selective serum response elements following antigen receptor cross-linking in B lymphocytes. *Mol. Cell Biol.* 15, 1086-10893.
- Mead PE, Brivanlou IH, Kelley CM, Zon LI (1996). BMP-4-responsive regulation of dorsal-ventral patterning by the homeobox protein Mix-1. *Nature* 382, 357-360.
- Meyer D, Wolff CM, Stiegler P, Senan F, Befort N, Befort JJ, Remy P (1997). *Xl-fli*, the *Xenopus* homologue of the *fli-1* gene, is expressed during embryogenesis in a restricted pattern evocative of neural crest cell distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7170-7175.
- Milbrandt J (1987). A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science* 238, 797-799.
- Miller J, McLachlan AD, Klug A (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 4, 1609-1614.
- Mohun TJ, Chambers AE, Towers N, Taylor MV (1991). Expression of genes encoding the transcription factor SRF during early development of *Xenopus laevis*: identification of a CArG box-binding activity as SRF. *EMBO J.* 10, 933-940.
- Mohun TJ, Garrett N, Taylor MV (1989). Temporal and tissue-specific expression of the proto-oncogene *c-fos* during development in *Xenopus laevis*. *Development* 107, 835-846.
- Molnar G, Crozat A, Pardee AB (1994). The immediate-early gene *Egr-1* regulates the activity of the thymidine kinase promoter at the G0-to-G1 transition of the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5242-5248.
- Monte D, Coutte L, Baert JL, Angeli I, Stehelin D, de Launoit Y (1995). Molecular characterization of the ets-related human transcription factor ER81. *Oncogene* 11, 771-779.



- Moon RT, Brown JD, Torres M (1997). WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development. *Trends Genet.* 13, 157-162.
- Moriya N und Asashima M (1992). Mesoderm and neural inductions on newt ectoderm by activin A. *Dev. Growth Differ.* 34, 589-594.
- Muller HJ, Skerka C, Bialonski A, Zipfel PF (1991). Clone pAT 133 identifies a gene that encodes another human member of a class of growth factor-induced genes with almost identical zinc-finger domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10079-10083.
- Mundlos S, Pelletier J, Darveau A, Bachmann M, Winterpacht A, Zabel, B (1993). Nuclear localization of the protein encoded by Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development* 119, 1329-1342.
- Nair P, Muthukkumar S, Sells SF, Han SS, Sukhatme VP, Rangnekar VM (1997). Early growth response-1-dependent apoptosis is mediated by p53. *J. Biol. Chem.* 272, 20131-20138.
- Nakayama T, Snyder MA, Grewal SS, Tsuneizumi K, Tabata T, Christian JL (1998). *Xenopus* Smad8 acts downstream of BMP-4 to modulate its activity during vertebrate embryonic patterning. *Development* 125, 857-867.
- Narayan VA, Kriwacki RW, Caradonna JP (1997). Structures of zinc finger domains from transcription factor Sp1. Insights into sequence-specific protein-DNA recognition. *J. Biol. Chem.* 272, 7801-7809.
- Nardelli J, Gibson TJ, Vesque C, Charnay P (1991). Base sequence discrimination by zinc-finger DNA-binding domains. *Nature* 349, 175-178.
- Newport J und Kirschner M (1982a). A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. Characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell* 30, 675-686.
- Newport J und Kirschner M (1982b). A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: II. Control of the onset of transcription. *Cell* 30, 687-696.
- Nguyen HQ, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA (1993). The zinc finger transcription factor Egr-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage. *Cell* 72, 197-209.
- Niehrs C, Steinbeisser H, de Robertis EM (1994). Mesodermal patterning by a gradient of the vertebrate homeobox gene goosecoid. *Science* 263, 817-820.
- Nieto MA, Bradley LC, Wilkinson DG (1991). Conserved segmental expression of Krox-20 in the vertebrate hindbrain and its relationship to lineage restriction. *Development Suppl.* 2, 59-62.
- Nieuwkoop PD (1977). Origin and establishment of embryonic polar axes in amphibian development. *Curr. Top. Dev. Biol.* 11, 115-132.
- Nieuwkoop PD (1969a). The formation of the mesoderm in Urodelan amphibians: I. Induction by the endoderm. *Wilhelm Roux's Arch. Entwicklungsmech. Org.* 162, 341-373.
- Nieuwkoop PD (1969b). The formation of the mesoderm in Urodelan amphibians: II. The origin of the dorso-ventral polarity of the mesoderm. *Wilhelm Roux's Arch. Entwicklungsmech. Org.* 163, 289-315.
- Nieuwkoop PD, Faber J (1967). A normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). North Holland Publishing Co, Amsterdam, The Netherlands.
- O'Reilly MA, Smith JC, Cunliffe V (1995). Patterning of the mesoderm in *Xenopus*: dose-dependent and synergistic effects of Brachyury and Pintallavis. *Development* 121, 1351-1319.
- Orenic TV, Slusarski DC, Kroll KL, Holmgren RA (1990). Cloning and characterization of the segment polarity gene cubitus interruptus Dominant of *Drosophila*. *Genes Dev.* 4, 1053-1067
- Onichtchouk D, Gawantka V, Dosch R, Delius H, Hirschfeld K, Blumenstock C, Niehrs C (1996). The Xvent-2 homeobox gene is part of the BMP-4 signalling pathway controlling dorsoventral patterning of *Xenopus* mesoderm. *Development* 122, 3045-3053.

- Oxtoby E und Jowett T (1993). Cloning of the zebrafish *krox-20* gene (*krx-20*) and its expression during hindbrain development. *Nucleic Acids Res.* 21, 1087-1095.
- Padgett RA, Grabowski PJ, Konarska MM, Seiler S, Sharp PA (1986). Splicing of messenger RNA precursors. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 1119-1150.
- Palaty CK, Kalmar GB, Pelech S (1994). Cloning, expression and characterization of *Pim1* from *Xenopus laevis*. Unpublished. GenBank, Accession L29495.
- Pannese M, Polo C, Andreazzoli M, Vignali R, Kablar B, Barsacchi G, Boncinelli E (1995). The *Xenopus* homologue of *Otx2* is a maternal homeobox gene that demarcates and specifies anterior body regions. *Development* 121, 707-720.
- Panitz F, Krain B, Hollemann T, Nordheim A, Pieler T (1998). The Spemann Organizer-expressed zinc finger gene *Xegr-1* responds to the MAP kinase/Ets-SRF signal transduction pathway. *EMBO J.* 17, 4414-4425.
- Papioannou VE und Silver LM (1998). The T-box gene family. *Bioessays* 20, 9-19.
- Parraga G, Horvath SJ, Eisen A, Taylor WE, Hood L, Young ET, Klevit RE (1988). Zinc-dependent structure of a single-finger domain of yeast *ADR1*. *Science* 241, 1489-1492.
- Patwardhan S, Gashler A, Siegel MG, Chang LC, Joseph LJ, Shows TB, Le Beau MM, Sukhatme VP (1991). *EGR3*, a novel member of the *Egr* family of genes encoding immediate-early transcription factors. *Oncogene* 6, 917-928.
- Pavletich NP und Pabo CO (1993). Crystal structure of a five-Finger *GLI*-DNA complex: New perspectives on Zinc Fingers. *Science* 261, 1701-1707.
- Pavletich NP und Pabo CO (1991). Zinc finger-DNA recognition: Crystal structure of a *Zif268*-DNA complex at 2.1Å. *Science* 252, 809-817.
- Pelham HRB und Brown DD (1980). A specific transcription factor that can bind either the 5S RNA gene or 5S RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4170-4174.
- Petersen M (1995). Untersuchungen zur Laminrezeptorproteinfamilie: Klonierung, Genstrukturanalyse und Charakterisierung eines sequenzhomologen Proteins aus *Xenopus*. Dissertation, Universität Göttingen.
- Picard B und Wegnez M (1979). Isolation of a 7S particle from *Xenopus laevis* oocytes: A 5S RNA-protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 241-245.
- Piccolo S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM (1996). Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to *BMP-4*. *Cell* 86, 589-598.
- Pieler T und Bellefroid E (1994). Perspectives on zinc finger protein function and evolution - An update. *Mol. Biol. Rep.* 20, 1-8.
- Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T (1995). *MatInd* and *MatInspector*: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic. Acids. Res.* 23, 4878-4884.
- Rangnekar VM, Aplin AC, Sukhatme VP (1990). The serum and TPA responsive promoter and intron-exon structure of *EGR2*, a human early growth response gene encoding a zinc finger protein. *Nucleic Acids Res.* 18, 2749-2757.
- Rao Y (1994). Conversion of a mesodermalizing molecule, the *Xenopus* *Brachyury* gene, into a neuralizing factor. *Genes Dev.* 8, 939-947.
- Rauscher FJ, Morris JF, Tournay OE, Cook DM, Curran T (1990). Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the *EGR-1* consensus sequence. *Science* 250, 1259-1262.

- Riva A, Wilson GL, Kehrl JH (1997). In vivo footprinting and mutational analysis of the proximal CD19 promoter reveal important roles for an SP1/Egr-1 binding site and a novel site termed the PyG box. *J. Immunol.* 159, 1284-1292.
- Rivera-Perez JA, Mallo M, Gendron-Maguire M, Gridley T, Behringer RR (1995). Goosecoid is not an essential component of the mouse gastrula organizer but is required for craniofacial and rib development. *Development* 121, 3005-3012.
- Roberts WM, Douglass EC, Peiper SC, Houghton PJ, Look AT (1989). Amplification of the GLI gene in childhood sarcomas. *Cancer Res* 49, 5407-5413.
- Robinson L, Panayiotakis A, Papas TS, Kola I, Seth A (1997). ETS target genes: Identification of Egr-1 as a target by RNA differential display and whole genome PCR techniques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7170-7175.
- Ruiz i Altaba A (1997). Catching a Gli-mpse of Hedgehog. *Cell* 90, 193-196.
- Russo MW, Severson BR, Milbrandt J (1995). Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A- and Krox20-mediated transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6873-6867.
- Russo MW, Matheny C, Milbrandt J (1993). Transcriptional activity of the zinc finger protein NGFI-A is influenced by its interaction with a cellular factor. *Mol. Cell Biol.* 13, 6858-6865.
- Saffer JD, Jackson SP, Annarella MB (1991). Developmental expression of Sp1 in mouse. *Mol. Cell. Biol* 11, 2189-2199.
- Sakamoto KM, Bardeleben C, Yates KE, Raines MA, Golde DW, Gasson JC (1991). 5' upstream sequence and genomic structure of the human primary response gene, EGR-1/TIS8. *Oncogene* 6, 867-871.
- Sakonju S, Bogenhagen DF, Brown DD (1980). A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: I. The 5' border of the region. *Cell* 19, 13-25.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sasai Y, Lu B, Steinbeisser H, de Robertis EM (1995). Regulation of neural induction by the Chd and Bmp-4 antagonistic patterning signals in *Xenopus*. *Nature* 376, 333-336.
- Sasai Y, Lu B, Steinbeisser H, Geissert D, Gont LK, de Robertis EM (1994). *Xenopus* chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell* 79, 779-790.
- Sasaki H, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H (1997). A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development* 124, 1313-1322.
- Scharf SR und Gerhart JC (1983). Axis determination in eggs of *Xenopus laevis*: a critical period before first cleavage, identified by the common effects of cold, pressure and ultraviolet irradiation. *Dev. Biol.* 99, 75-87
- Schimmang T, Lemaistre M, Vortkamp A, Rüther U (1992). Expression of the zinc finger gene GLI3 is affected in the morphogenetic mouse mutant extra-toes (Xt). *Development* 116, 799-804.
- Schmeichel KL und Beckerle MC (1994). The LIM Domain Is a Modular Protein-Binding Interface. *Cell* 79, 211-219.
- Schuh R, Aicher W, Gaul U, Côté S, Preiss A, Maier D, Seifert E, Nauber U, Schröder C, Kemler R, Jäckle H (1986). A Conserved Family of Nuclear Proteins Containing Structural Elements of the Finger Protein Encoded by Krüppel, a Drosophila Segmentation Gene. *Cell* 47, 1025-1032.
- Schulte-Merker S und Smith JC (1995). Mesoderm formation in response to Brachyury requires FGF signalling. *Curr. Biol.* 5, 62-67.

- Sham MH, Vesque C, Nonchev S, Marshall H, Frain M, Das Gupta R, Whiting J, Wilkinson D, Charnay P, Krumlauf R (1993). The Zinc Finger Gene Krox20 Regulates HoxB2 (Hox2.8) during Hindbrain Segmentation. *Cell* 72, 183-196.
- Sharma PM, Yang X, Bowman M, Roberts V, Sukumar S (1992). Molecular cloning of rat Wilms' tumor complementary DNA and a study of messenger RNA expression in the urogenital system and the brain. *Cancer Res.* 52, 6407-6412.
- Skerka C, Decker EL, Zipfel PF (1995). A regulatory element in the human interleukin 2 gene promoter is a binding site for the zinc finger proteins SP1 and EGR-1. *J. Biol. Chem.* 270, 22500-22506.
- Slack JM (1994). Inducing factors in *Xenopus* early embryos. *Curr. Biol.* 4, 116-26.
- Smith J (1997). Brachyury and the T-box genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 474-80.
- Smith JC, Price BM, Green JB, Weigel D, Herrmann BG (1991). Expression of a *Xenopus* homolog of Brachyury (T) is an immediate-early response to mesoderm induction. *Cell* 67, 79-87.
- Smith JC, Symes K, Heasman J, Snape A, Wylie CC (1987). The *Xenopus* animal pole blastomere. *Bioessays* 7, 229-234.
- Smith JC und Slack JMW (1983). Dorsalization and neural induction: properties of the organizer in *Xenopus laevis*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 78, 299-317.
- Smith WC, McKendry R, Ribisi S Jr, Harland RM (1995). A nodal-related gene defines a physical and functional domain within the Spemann organizer. *Cell* 82, 37-46.
- Smith WC und Harland RM (1992). Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* 70, 829-840.
- Smith WC und Harland RM (1991). Injected Xwnt-8 RNA acts early in *Xenopus* embryos to promote formation of a vegetal dorsalizing center. *Cell* 67, 753-765.
- Spemann H und Mangold H (1924). Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Roux's Arch. Entw. Mech.* 100, 599-638.
- Steinbeisser H, Fainsod A, Niehrs C, Sasai Y, de Robertis EM (1995). The role of gsc and BMP-4 in dorsal-ventral patterning of the marginal zone in *Xenopus*: a loss-of-function study using antisense RNA. *EMBO J.* 14, 5230-5243.
- Stiegler P, Wolff CM, Meyer D, Senan F, Durlat M, Hourdry J, Befort N, Remy P (1993). The c-ets-1 proto-oncogenes in *Xenopus laevis*: expression during oogenesis and embryogenesis. *Mech. Dev.* 41, 163-174.
- Suggs SV, Katzowitz JL, Tsai-Morris C, Sukhatme VP (1990). cDNA sequence of the human cellular early growth response gene Egr-1. *Nucleic Acids Res.* 18, 4283.
- Sukhatme VP, Cao XM, Chang LC, Tsai-Morris CH, Stamenkovich D, Ferreira PC, Cohen DR, Edwards SA, Shows TB, Curran T (1988). A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell* 53, 37-43.
- Supp DM, Witte DP, Branford WW, Smith EP, Potter SS (1996). Sp4, a member of the Sp1-family of zinc finger transcription factors, is required for normal murine growth, viability, and male fertility. *Dev. Biol.* 176, 284-299.
- Svaren J, Severson BR, Apel ED, Zimonjic DB, Popescu NC, Milbrandt J (1996). NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Mol. Cell Biol.* 16, 3545-3553.
- Swiatek PJ und Gridley T (1993). Perinatal lethality and defects in hindbrain development in mice homozygous for a targeted mutation of the zinc finger gene Krox20. *Genes Dev.* 7, 2071-2084.

- Swirnoff AH, Apel ED, Svaren J, Severson BR, Zimonjic DB, Popescu NC, Milbrandt J (1998). Nab1, a corepressor of NGFI-A (Egr-1), contains an active transcriptional repression domain. *Mol. Cell Biol.* 18, 512-524.
- Swirnoff AH und Milbrandt J (1995). DNA-binding specificity of NGFI-A and related zinc finger transcription factors. *Mol. Cell Biol.* 15, 2275-2287.
- Taira M, Jamrich M, Good PJ, Dawid IB (1992). The LIM domain-containing homeo box gene *Xlim-1* is expressed specifically in the organizer region of *Xenopus* gastrula embryos. *Genes Dev.* 6, 356-366.
- Talbot WS, Trevarrow B, Halpern ME, Melby AE, Farr G, Postlethwait JH, Jowett T, Kimmel CB, Kimelman D (1995). A homeobox gene essential for zebrafish notochord development. *Nature* 378, 150-157.
- Theunissen O, Rudt F, Guddat U, Mentzel H, Pieler T (1992). RNA and DNA binding zinc fingers in *Xenopus* TFIIIA. *Cell* 71, 679-690.
- Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Trembleau A, Gourdji D, Driancourt MA, Rao CV, Charnay P (1998). Multiple pituitary and ovarian defects in *Krox-24* (NGFI-A, Egr-1)- targeted mice. *Mol. Endocrinol.* 12, 107-122.
- Topilko P, Levi G, Merlo G, Mantero S, Desmarquet C, Mancardi G, Charnay P (1997). Differential regulation of the zinc finger genes *Krox-20* and *Krox-24* (Egr-1) suggests antagonistic roles in Schwann cells. *J. Neurosci. Res.* 50, 702-712.
- Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chennoufi AB, Seitanidou T, Babinet C, Charnay P (1994). *Krox-20* controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* 371, 796-799.
- Treisman R (1995). Journey to the surface of the cell: Fos regulation and the SRE. *EMBO J.* 14, 4905-4913.
- Tsai-Morris CH, Cao XM, Sukhatme VP (1988). 5' flanking sequence and genomic structure of Egr-1, a murine mitogen inducible zinc finger encoding gene. *Nucleic. Acids. Res.* 16, 8835-8846.
- Umbhauer M, Marshall CJ, Mason CS, Old RW, Smith JC (1995). Mesoderm induction in *Xenopus* caused by activation of MAP kinase. *Nature* 376, 58-62.
- van Straaten F, Muller R, Curran T, Van Beveren C, Verma IM (1983). Complete nucleotide sequence of a human c-oncogene: deduced amino acid sequence of the human c-fos protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3183-3187.
- Vodicka MA und Gerhart JC (1995). Blastomere derivation and domains of gene expression in the Spemann Organizer of *Xenopus laevis*. *Development* 121, 3505-3518.
- von Dassow G, Schmidt J.E, Kimelman D (1993). Induction of the *Xenopus* Organizer: expression and regulation of *Xnot*, a novel FGF and activin-regulated homeobox gene. *Genes Dev.* 7, 355-366.
- Vortkamp A, Gessler M, Grzeschik KH (1991). *GLI3* zinc finger gene interrupted by translocation in Greig syndrome families. *Nature* 352, 539-540.
- Wang D., Mayo MW, Baldwin AS Jr (1997a). Basic fibroblast growth factor transcriptional autoregulation requires EGR-1. *Oncogene* 14, 2291-2299.
- Wang S, Krinks M, Lin K, Luyten FP, Moos M Jr (1997b). Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. *Cell* 88, 757-766.
- Wasylyk B und Nordheim A (1997). Ets transcription factors: partners in the integration of signal responses. In: Papavassiliou (Hrsg.), *Transcription factors in eukaryotes*. R.G.Landes Co., Georgetown, Texas.
- Watson DK, Robinson L, Hodge DR, Kola I, Papas TS, Seth A (1997). FLI1 and EWS-FLI1 function as ternary complex factors and ELK1 and SAP1a function as ternary and quaternary complex factors on the Egr1 promoter serum response elements. *Oncogene* 14, 213-221.

- Weintraub H (1993). The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 75, 1241-1244.
- Wilkinson D.G, Bhatt S, Charvier P, Bravo R, Charnay P (1989). Segment-specific expression of a zinc finger gene in the developing nervous system of the mouse. *Nature* 337, 461-464.
- Willert K und Nusse R (1998). Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 95-102.
- Wimmer EA, Frommer G, Purnell BA, Jackle H (1996). buttonhead and D-Sp1: a novel Drosophila gene pair. *Mech. Dev.* 59, 53-62.
- Wimmer EA, Jäckle H, Pfeifle C, Cohen SM (1993). A Drosophila homologue of human Sp1 is a head specific segmentation gene. *Nature* 366, 690-694.
- Wrana J und Pawson T (1997). Signal transduction: Mad about SMADs. *Nature* 388, 28-29.
- Yamagata K, Kaufmann WE, Lanahan A, Papapavlou M, Barnes CA, Andreasson KI, Worley PF (1994). *Learning Memory* 1, 140-152.
- Zarkower D und Hodgkin J (1992). Molecular analysis of the *C. elegans* sex-determining gene *tra-1*: a gene encoding two zinc finger proteins. *Cell* 70, 237-249.
- Zoltewicz JS und Gerhart JC (1997). The Spemann organizer of *Xenopus* is patterned along its anteroposterior axis at the earliest gastrula stage. *Dev. Biol.* 192, 482-491.

## 6. Zusammenfassung

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Frage, ob im Krallenfrosch *Xenopus laevis* neben dem Egr-2/Krox-20 Gen, daß eine essentielle Funktion in der Entwicklung des Nervensystems hat, weitere Gene der EGR ('early growth response') Zinkfinger-Familie existieren und ob diese eine Funktion in der frühen Embryonalentwicklung besitzen. Die vollständige Sequenz des Egr-1 homologen Gens in *Xenopus* (Xegr-1), ein genomisches Xegr-1 Promotorfragment sowie ein partieller Xegr-3 Klon konnten isoliert werden.

Xegr-1 ist ein Zinkfinger-Protein des C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Typs und gehört zu einer evolutionär konservierten Gruppe von Transkriptionsfaktoren. Die DNA-bindende Zinkfinger-Domäne ist zu 100% mit den homologen Proteinen von Maus, Ratte und Mensch identisch. Xegr-1 ist ein sehr schwach exprimiertes Gen, das bereits maternal vorhanden ist. Die stärkste Expression in der frühen Embryonalentwicklung findet während der Gastrulation statt. Xegr-1 ist der erste Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der zu Beginn der Gastrulation im Spemann Organisator exprimiert wird. Mit fortschreitender Gastrulation breitet sich die Expressionsdomäne in einem Gradienten in der marginalen Zone ringförmig um den Blastoporus aus. Ein Vergleich mit der Expression anderer Organisator-spezifischer Gene zeigt, daß Xegr-1 und Xbra hinsichtlich der räumlichen Expression die größte Übereinstimmung aufweisen.

Zur funktionellen Charakterisierung von Xegr-1 in der frühen Embryogenese durch Mikroinjektionen synthetischer RNA in *Xenopus* Embryonen wurden drei unterschiedliche Strategien eingesetzt: Überexpression, Aktivierung und Inhibition. Sowohl ektopische Expression von Xegr-1 als auch der Einsatz von 'antisense' RNA zeigte keinen phänotypischen Effekt. Auch bei der Verwendung von Fusionsproteinen, bei denen die DNA-bindende Zinkfinger-Domäne von Xegr-1 an eine Aktivator- bzw. Repressordomäne heterologer Proteine (E1A bzw. engrailed) fusioniert ist, war kein Einfluß auf die Entwicklung erkennbar. Die Überexpression heterologer NAB-Proteine, die als Korepressoren durch Wechselwirkung mit der Repressionsdomäne Egr-Proteine in ihrer Aktivität reprimieren können, ergab ebenfalls keine Anhaltspunkte für eine Störung der Embryonalentwicklung. Demgegenüber resultierte eine „aktivierte“ Form von Xegr-1, die eine Substitution einer für die NAB-Bindung essentiellen Aminosäure enthielt, in Augen- und Achsendefekten. Inwieweit diese Effekte mit der Expression von Xegr-1 im Organisator in Zusammenhang stehen, ist noch nicht bekannt.

Die Isolierung des Xegr-1 Promotors ergab, das neben anderen potentiellen regulatorischen Elementen Bindungsstellen für zwei terminale Transkriptionsfaktoren der MAP Kinase-Kaskade, SRF ('serum response element') und Elk-1 (einem Protein der ETS-Familie), konserviert sind. Durch Elektromobilityshiftassays (EMSA) konnte gezeigt werden, daß SRF und Elk-1 in der Lage sind, spezifisch an Xegr-1 Promotorsequenzen zu binden. Es konnte gezeigt werden, das die Regulation der Mesoderm-spezifischen Expression von Xegr-1 über den MAP Kinase/SRF-ets Signalweg verläuft (B. Krain, Dissertation Universität Hannover, 1997).

Zur Untersuchung, ob das Xegr-1 Promotorfragment in der Lage ist, *in vivo* die Expression des Xegr-1 Gens im Organisator zu regulieren, wurden Xegr-1 Promotor/ $\beta$ gal-Reporterkonstrukte in Embryonen injiziert. Dabei konnte eine räumliche Aktivität des Reportergens, die mit der endogenen Verteilung des Xegr-1 Gens korreliert, nicht nachgewiesen werden.

Der partielle Xegr-3 Klon enthält das zweite Exon, das den größten Teil des Proteins kodiert. Der Vergleich mit den homologen Proteinen anderer Vertebraten zeigt, das Xegr-3 ebenfalls stark konserviert ist. Die Zinkfinger-Domäne stimmt zu 99% mit der des menschlichen Homologen überein. Xegr-3 wird in der frühen Embryogenese vor allem im Nervensystem, den Somiten und der embryonalen Niere (Pronephros) exprimiert. Welche Funktion Xegr-3 im Rahmen der frühen Entwicklung, beispielsweise bei der Nephrogenese spielt, bleibt zu klären.

Schlagworte: egr-1/ egr-3/ *Xenopus laevis*/ Serum Response Element

## 6. Summary

In the clawed toad *Xenopus laevis* the EGR-2/Krox-20 gene, a member of the EGR ('early growth response') family of zinc finger proteins, plays an essential role in neural development. The aim of this study was to determine whether *Xenopus laevis* possesses additional EGR genes and whether these have a function during early embryonic development. The complete sequence of *Xenopus egr-1* homologue (Xegr-1), a genomic Xegr-1 promoter fragment as well as a partial Xegr-3 clone were isolated.

Xegr-1 is a zinc finger protein of the C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> type and belongs to an evolutionary highly conserved group of transcription factors. Its DNA binding domain is 100% identical to the homologous proteins in mouse, rat and human. Xegr-1 is weakly expressed and already maternally detectable. During early embryonic development strongest expression can be detected at gastrulation. Xegr-1 is the first zinc finger transcription factor to be expressed in the region of the Spemann organizer. As gastrulation proceeds, the expression domain spreads as a gradient in the marginal zone around the blastoporus. Comparison with the expression characteristics of other organizer-specific genes demonstrates that Xegr-1 and Xbra show the greatest overlap in regard to their spatial expression.

In order to functionally characterize the role of Xegr-1 during early development, microinjections of synthetic RNA in *Xenopus* embryos were performed using three different strategies: overexpression, activation and inhibition. Neither ectopic expression of Xegr-1 nor injection of antisense RNA resulted in a phenotypic effect. The employment of chimeric proteins containing the DNA binding zinc finger domain of Xegr-1 fused to an heterologous activation or repression domain (E1A or engrailed) also showed no influence on development.

Overexpression of heterologous NAB corepressors, which can interact with the Egr-1 repression domain thus repressing the activity of Egr proteins, did not disturb embryonic development. On the other hand, defects with respect to eye formation and body axis could be observed using an 'activated' form of Xegr-1 in which an amino acid that is essential for NAB binding was substituted. To what extent these effects are linked to the Xegr-1 expression in the organizer is not yet known.

The isolation of the Xegr-1 promoter revealed conserved binding sites for two terminal transcription factors of the MAP kinase pathway, SRF (serum response element) and Elk-1 (a protein of the ETS family). Using electromobility shift assays (EMSA) it was demonstrated that SRF and Elk-1 bind specifically to Xegr-1 promoter elements. The regulation of the mesoderm specific expression of Xegr-1 was shown to be dependent on the MAP kinase/SRF-ets signalling pathway (B. Krain, Dissertation Universität Hannover, 1997). By injection of Xegr-1 promoter/ $\beta$ gal reporter constructs into embryos it was determined whether the Xegr-1 promoter fragment is sufficient to regulate Xegr-1 gene expression in the organizer. A spatial activity of the reporter construct, correlating with the endogenous distribution of the Xegr-1 mRNA, could not be detected.

The partial Xegr-3 clone contains the second exon which codes for the major part of the protein. Comparison with the homologous proteins demonstrates that Xegr-3 is highly conserved containing a zinc finger domain with 99% identity to the human homologue. Xegr-3 expression was detected in the nervous system, somites and the embryonic nephros (pronephros). The functional role Xegr-3 plays during early development, e.g. in kidney development, remains to be investigated.

Keywords: egr-1/ egr-3/ *Xenopus laevis*/ serum response element



## Danksagung

Prof. Dr. Tomas Pieler möchte ich an dieser Stelle sehr herzlich für die Überlassung des Themas, seine konstruktive Kritik während der Arbeit und die Übernahme des Koreferats danken.

Prof. Dr. J. Alves danke ich für die Betreuung dieser Arbeit im Zentrum Biochemie der Universität Hannover und die Übernahme des Hauptreferats.

Prof. Dr. Alfred Nordheim und Bernhard Krain danke ich für die gute Kooperation bei der Charakterisierung von Xegr-1.

Dr. Thomas Hollemann, Dr. Eric Bellefroid und Dr. Martin Petersen gilt mein Dank für die vielfältige Unterstützung bei der Einführung in die Entwicklungsbiologie von *Xenopus laevis*.

Ulrike Dürr, Marion Sölter, Graciela Humbert-Lan, Helmut Hofemeister und Thorsten Ralle möchte ich für die gute Zusammenarbeit und das Korrekturlesen des Manuskripts danken.

Allen Mitarbeitern der Abt. Entwicklungsbiochemie danke ich für stete Hilfsbereitschaft und zahlreiche Diskussionen.

Diese Dissertation wurde im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 271 „Molekulare Genetik morphoregulatorischer Prozesse“ durchgeführt und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Meine Eltern danke ich auch an dieser Stelle herzlich für ihre Unterstützung während der gesamten Studienzzeit.

## Lebenslauf

Name: Frank Panitz  
Adresse: Schildweg 16, 37085 Göttingen

Geburtsdatum: 4. März 1967  
Geburtsort: Bremen  
Familienstand: ledig

## Schulbildung

1973 - 1977            Grundschule in der Steinbreite, Hannover-Davenstedt  
1977 - 1986            Gymnasium Helene-Lange-Schule, Hannover-Linden

## Zivildienst

08/ 1986 - 04/ 1988    Zivildienst an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH)  
am Institut für Hämatologie/Onkologie

## Studium

10/ 1988 - 11/ 1993    Studiengang Biochemie an der Universität Hannover  
11/ 1993                Diplomprüfung im Studiengang Biochemie  
11/ 1993 - 06/ 1994    Diplomarbeit an der MHH (Abteilung Urologische Forschung,  
Dr. J. Serth): „Quantitative PCR zur Titerbestimmung von Onko-  
viren in humanen Tumoren am Beispiel des humanen Papillom-  
virus (HPV)“

## Promotion

09/ 1994 - 07/ 1998    Dissertation am Institut für Biochemie und molekulare Zell-  
biologie der Universität Göttingen (Abteilung Entwicklungs-  
biochemie, Prof. T. Pieler): „Isolierung und Charakterisierung  
der Zinkfingerproteine Xegr-1 und Xegr-3 in der frühen  
Embryonalentwicklung des Krallenfrosches *Xenopus laevis*“