ulm university universität
uulm

Institut für Biochemie

Prof. Dr. Dr. Walter Knöchel

Zur Rolle von Genen, die in pluripotenten Stadien der Embryogenese von *Xenopus laevis* exprimiert werden

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften (*Dr. rer. nat.*)
der Fakultät für Naturwissenschaften
der Universität Ulm

vorgelegt von
Doreen Siegel
aus Erlabrunn

2009

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Axel Groß

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Walter Knöchel

2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler

Tag der Promotion: 09.12.2009

1. Einleitung 1

1.1 Pluripotenz und frühembryonale Entwicklung von *Xenopus laevis* 2

1.2 Transkriptionsfaktoren der POU-V Klasse 6

1.3 Festlegung der drei Keimblätter, Mesoderm, Ektoderm und Endoderm 9

1.4 Pluripotenz assoziierte (*Developmental Pluripotency associated: Dppa)* Gene 13

1.5 Aufgabenstellung 16

2. Materialien und Methoden 17

2.1 Geräte, Chemikalien und Bezugsquellen 17

2.1.1 Geräte 17

2.1.2 Reagenzien, Lösungen und Radioaktivität 18

2.1.3 Sonstige Gebrauchsartikel und -gegenstände 19

2.2. Verwendete Software für Datenbankanalysen, zur Protein- und Nukleinsäureanalyse 20

2.3. Antikörper, Enzyme und Hormone 21

2.3.1 Antikörper 21

2.3.2 Enzyme 21

2.3.3 Hormone 22

2.3.4 Antibiotika 22

2.4. Kits 22

2.5 Nukleinsäuren 22

2.5.1 Vektoren 22

2.5.2 cDNA-Klone 23

2.5.3 Oligonukleotide und Morpholino Oligonukleotide 23

2.5.3.1 Primer für ChIP 23

2.5.3.2 Morpholino *antisense* Oligonukleotide 23

2.6. Organismen 24

2.6.1 Bakterienstämme 24

2.6.2 Versuchstiere 24

2.7. Methoden 25

2.7.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren 25

2.7.1.1 Arbeiten mit DNA 25

2.7.1.1.1. Manuelle Aufreinigung von DNA 25

2.7.1.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien mittels Telt-(LiCl)-Methode 25

2.7.1.1.1.2. Aufreinigungen von DNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion 26

2.7.1.1.1.3 Aufreinigungen über Agarosegelelektrophorese 26

2.7.1.1.2 Aufreinigung der DNA mittels diverser Kits 27

2.7.1.1.2.1 Plasmidisolation aus Bakterien mit Qiagen Plasmid Midi/Mini Kit 27

2.7.1.1.2.2 Aufreinigungen von DNA aus wässrigen Lösungen mittels des Qiagen PCR Purification Kit 28

2.7.1.1.3 Fällungsreaktionen der DNA ... 28
2.7.1.1.3.1 Ethanolfällung von DNA aus wässrigen Lösungen ... 28
2.7.1.1.3.2 Isopropanolfällung von DNA aus wässrigen Lösungen ... 28
2.7.1.1.4 Konzentrationsbestimmungen von wässrigen Nukleinsäurelösungen ... 29
2.7.1.1.5 Enzymatische Modifikation von DNA zu Klonierungszwecken ... 29
2.7.1.1.5.1 Restriktionsspaltungen ... 29
2.7.1.1.5.2 Dephosphorylierung linearer DNA am 5´-Ende ... 30
2.7.1.1.5.3 Ligation ... 30
2.7.1.1.6. Endständige Markierung mit Polynukleotidkinase ... 31
2.7.1.1.7 PCR (Polymerase chain reaction) ... 32
2.7.1.1.7.1 Primer Design und Testläufe ... 33
2.7.1.1.7.2 Kolonie-PCR ... 34
2.7.1.1.7.3 RT-PCR Analysen ... 34
2.7.1.1.7.3.1 cDNA-Synthese ... 35
2.7.1.1.7.3.2 Vergleichende RT-PCR-Analysen über Agarosegele ... 35
2.7.1.1.7.3.3 Semiquantitative real time RT-PCR Analysen ... 35
2.7.1.1.7.4 DNA-Sequenzierung nach Dideoxy-Kettenabbruchmethode ... 36
2.7.1.1.8. Klonierungen ... 37
2.7.1.2 Arbeiten mit RNA ... 38
2.7.1.2.1. RNA-Isolation aus Embryonen ... 38
2.7.1.2.2. *In vitro* Transkription von RNA ... 38
2.7.2. Arbeiten mit Proteinen ... 39
2.7.2.1. *In vitro* Translation ... 39
2.7.2.2 Induzierte Proteinexpression in Bakterien ... 40
2.7.2.3. Native Aufreinigung von His- und GST-markierten Fusionsproteinen ... 40
2.7.2.4. Proteinbestimmung nach Bradford ... 41
2.7.2.5 SDS-Polyacryamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ... 41
2.7.2.6 Autoradiographie ... 43
2.7.2.7 Westernblot/Immunoblot ... 43
2.7.2.7.1 Herstellung von Proteinextrakten aus *Xenopus* Embryonen ... 43
2.7.2.7.2 Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran ... 44
2.7.2.7.3. Immunologische Detektion ... 44
2.7.2.8. Gel-Retardations Experimente/ EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) ... 45
2.7.2.9. GST-Pulldown Assays ... 45
2.7.3. Arbeiten mit Organismen ... 46
2.7.3.1 Arbeiten mit Bakterien ... 46
2.7.3.1.1 Anzucht von Bakterien ... 46
2.7.3.1.2. Herstellung chemokompetenter Zellen nach der RbCl-Methode ... 47
2.7.3.1.3 Transformation von Bakterien ... 47

2.7.3.1.4. Blau-Weiß Selektion von Bakterien ... 48
2.7.4. Arbeiten mit Zellkultur ... 48
2.7.4.1. Zellkultur und Herstellung von Zellextrakten ... 48
2.7.4.2. Darstellung von Zellen ... 48
2.7.5. Arbeiten mit *Xenopus laevis* ... 48
2.7.5.1. HCG-induziertes Ablaichen zur Gewinnung von Froschembryonen ... 49
2.7.5.2. *In vitro* Fertilisation der *Xenopus laevis* Eier und Entfernen der Gallerthülle ... 49
2.7.5.3. Injektionsexperimente mit *Xenopus laevis* Embryonen ... 50
2.7.5.4. Genknockdown mittels Morpholino *antisense* Oligonukleotid-Injektion ... 50
2.7.5.5. Animale Kappen und Explantate ... 51
2.7.5.6. Fixieren von Embryonen ... 52
2.7.5.7. *In vivo* Transkription/Translation Assay ... 52
2.7.5.8. Luziferase Reporter Assay ... 53
2.7.5.9. Histologische und immunohistologische Methoden ... 54
2.7.5.9.1 Whole Mount *in situ* Hybridisierung ... 54
2.7.5.9.2. Galaktosidase-Färbung ... 56
2.7.5.9.3. Nachweis von Apoptose ... 56
2.7.5.9.3.1. TUNEL ... 56
2.7.5.9.3.2. Kaspase Assay ... 56
2.7.5.9.4. Anfertigen von histologischen Schnitten von *Xenopus laevis* Embryonen ... 57
2.7.5.9.5. Koimmunopräzipitation (KoIP) ... 57
2.7.5.9.6. Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) ... 58
2.7.5.8.7. TSA-Behandlung von Embryonen ... 58

3. Ergebnisse ... 59
3.1. Analyse der *POU-V* Gene in *Xenopus laevis* ... 59
3.1.1. Ektopische Expression von *Oct25*, *Oct60* oder *Oct91* in vegetalen Zellen inhibiert die Ausbildung des Mesendoderms ... 59
3.1.2. Oct25 steigert die Transkription früher neuroektodermaler Gene ... 61
3.1.3. Oct25 Überexpression inhibiert die Aktivität von Aktivin A und bFGF in animalen *Xenopus* Explantaten ... 62
3.1.4. Oct25 inhibiert die Aktivität der *Xnrs* in *X. laevis* Embryonen ... 64
3.1.5. Funktioneller Knockdown von Oct25 und Oct60 führen zu einer verstärkten Ausbildung mesendodermaler Gewebe ... 65
3.1.6. mOct3/4 kann den Funktionsverlust von Oct25 und Oct60 ersetzen ... 68
3.1.7. Die maternal exprimierten POU-V Faktoren inhibieren die für die Keimblatt- und Musterbildung essentiellen Gene ... 69
3.1.8 Die Überexpression von Oct25 oder Oct60 inhibiert in animalen Kappen die Transkription der Zielgene von VegT und β-Catenin ... 71

3.1.9. Interaktionen zwischen Oct25, VegT und Tcf3 74
3.1.10. Oct25, VegT und Tcf3 bilden Komplexe auf den Promotoren von *Xnr1* und *Siamois* 77
3.1.11 Oct25 reprimiert die Promotoraktivitäten von *Xnr1* und *Siamois* 81
3.1.12. Oct25 reguliert die Transkription der *Gsc* und *Mix2* Gene 86
3.1.13. Oct25 interagiert mit Komponenten des Nodal/Aktivin Signalwegs 88
3.1.14. Oct25 bindet an die Promotoren von *Gsc* und *Mix2* 89
3.1.15. Oct25 reprimiert die Aktivität der Promotoren von *Gsc* und *Mix2* 92
3.1.16. Das Oktamer-Motiv ist für den inhibitorischen Effekt von Oct25 nicht essentiell 94
3.1.17. Der reprimierende Einfluss von Oct25 auf die Transkription von *Gsc* und *Mix2* ist unabhängig von der Aktivität der HDACs 97
3.2. Untersuchung des *Dppa* Gens von *Xenopus laevis* 98
3.2.1. Identifizierung des *XDppa2/4* Gens in *Xenopus* 98
3.2.2. Die Expression des *XDppa2/4* Gens entspricht dem Muster eines Pluripotenzfaktors 101
3.2.3. Der Knockdown von XDppa2/4 führt zu einer fehlgesteuerten Gastrulation und letztlich zu einer Unterdrückung der Neurulation 102
3.2.4. Die Überexpression von XDppa2/4, mDppa2 und mDppa4 resultiert in identischen Phänotypen 104
3.2.5. Expression von Markergenen nach Überexpression und Funktionsverlust von XDppa2/4 106
3.2.6. Die Injektion von *mDppa2* revertiert den frühen Phänotyp des XDppa2/4-Funktionsverlusts 109
3.2.7. Funktionelle Untersuchungen der verschiedenen Domänen in XDppa2/4 111
3.2.8. Lokalisation der XDppa2/4-Deletionsmutanten innerhalb der Zelle 113
3.2.9. Sowohl Funktionsverlust als auch ektopische Expression von XDppa2/4 induzieren den apoptotischen Signalweg 115

4. Diskussion 118
4.1. Oct25 und Oct60 inhibieren die Bildung des Mesendoderms und unterstützen die Bildung des Neuroektoderms 118
4.2. Die Nodal/Aktivin und bFGF Signalwege werden durch Oct25 und Oct60 inhibiert 119
4.3. Funktionelle Konservierung der POU-V Faktoren 120
4. 4. POU-V Faktoren antagonisieren die primären Induktionsereignisse 121
4.5. Oct25, ein Korepressor der Transkription von VegT und β-Catenin Zielgenen 123
4.6. Die Interaktion von VegT mit Tcf3 bietet eine Erklärung für den Synergismus von VegT und β-Catenin bei der Transkription von *Siamois* 124
4.7. Ein Mechanismus für die Erhaltung der Pluripotenz 125
4.8. Die POU-V Faktoren inhibieren die Transkription von *Gsc* und *Mix2*, die Zielgene des Nodal/Aktivin Signalweges darstellen 126

4.9. Die Reprimierung von *Gsc* und *Mix2* durch Oct25 ist unabhängig von der Aktivität der Histondeacetylasen der Klasse I und II 128
4.10. Die Existenz der *Dppa2/4* Gene ist nicht auf höhere Vertebraten begrenzt 129
4.11. XDppa2/4 ist für die Embryogenese essentiell 131
4.12. Die SAP-Domäne von XDppa2/4 ist für den Ablauf der Gastrulation entbehrlich 132

5. Zusammenfassung 135
6. Summary 136
7. Literaturverzeichnis 137
8. Abkürzungsverzeichnis 152

Lebenslauf 155
Publikationen 156
Danksagung 157
Erklärung 158

1. Einleitung

Seit den Anfängen entwicklungsbiologischer Forschung stellt sich die Frage, welche Faktoren für die Spezifizierung und Musterbildung eines komplexen vielzelligen Organismus ausgehend von einer befruchteten Eizelle benötigt werden. Besonderes Interesse gilt hier dem Übergang des pluripotenten Stadiums in Richtung einsetzender Determinierung bzw. der Differenzierung einzelner Zellen. Der Status der Pluripotenz ist gekennzeichnet durch die Möglichkeit der Selbsterneuerung einer Zelle und ihrer Fähigkeit, sich in eine Vielzahl unterschiedlicher Zellarten zu entwickeln (Weissman, 2000; Boiani und Schöler, 2005). Diese so genannten pluripotenten Zellen werden auch als Stammzellen bezeichnet. Mit einsetzender Determinierung wird das Schicksal der Zelle festgelegt. Diese Zellen unterscheiden sich von pluripotenten Stammzellen durch verminderte Expression von Genen, die für die Aufrechterhaltung des pluripotenten Charakters essentiell sind, und durch eine erhöhte Expression von Genen, die für die Ausbildung der drei Keimblätter benötigt werden. Eine Zelle spezifiziert sich schließlich in ihrem Aussehen, ihrer Positionierung und ihrer Funktion gegenüber anderen Zellen. Nach Differenzierung der einzelnen Zellen erfolgt lediglich die Expression spezifischer Gene des sich entwickelten Gewebes und lebensnotwendiger Haushaltsgene. Sich daraus ergebende Fragen sind, welche Faktoren die Auslöser für das Ende des pluripotenten Zustands und die veränderten Expressionsmuster einzelner Zellen sind und wie diese Faktoren wirken. Veränderungen der Genexpression können durch direkte Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit dem Promotor eines entsprechenden Gens verursacht werden. Alternativ können Kofaktoren indirekt über Protein/Protein Interaktionen oder über Modifikationen der DNA, wie z.B. Methylierung, wirken. Des Weiteren können die Histonproteine, die das Gerüst der Nukleosomen im Chromatin bilden, zahlreichen Modifikationen, wie z.B. Acetylierung, Methylierung, Ubiquitinylierung oder Sumosylierung, unterliegen. Die Bedeutung dieser Prozesse ist jedoch teilweise noch unverstanden. Für Untersuchungen dieser Vorgänge ist der Südafrikanische Krallenfrosch (*Xenopus laevis*), dessen frühembryonale Determinierungs- und Differenzierungsprozesse bereits in zahlreichen Studien untersucht worden sind, ein geeignetes Modellsystem. Die ersten Schritte zur Erforschung der Embryogenese in Amphibien wurden schon Mitte des letzten und vorletzten Jahrhunderts durchgeführt. Diese Untersuchungen hatten jedoch überwiegend deskriptiven Charakter (Vogt, 1842; Gutzeit 1889; Dreyer 1915; Edgeworth, 1930). 1924 wurde von Spemann und Mangold eine Studie veröffentlicht, in der mit Hilfe von Transplantationsexperimenten in *Triturus alpestris* (Alpenmolch) gezeigt wurde, dass

induktive Wechselwirkungen während der Gastrulation für die Festlegung der unterschiedlichen Gewebe essentiell sind. Somit war der Grundstein für detailliertere Untersuchungen zur Keimblattinduktion und Gewebsdetermination gelegt, deren Mechanismen mit Beginn der molekuarbiologischen Forschung und Einführung neuer Methoden entschlüsselt wurden.

Im Unterschied zu den anderen gängigen Modellorganismen, wie der Maus (*Mus musculus*), dem Huhn (*Gallus gallus*) und dem Zebrafisch (*Danio rerio*), besitzt der Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) mehrere Eigenschaften, die ihn zum idealen Modellsystem der Untersuchung von Induktionsprozessen in Vertebraten machen. Die Weibchen können durch die Injektion des menschlichen Schwangerschaftshormons, Choriongonatropin (Humanes Choriongonatropin: HCG), zur Eiablage stimuliert werden, wobei eine große Anzahl an Nachkommen für anschließende Untersuchungen erhalten werden. Eine *in vitro* Fertilisation gewährleistet, dass sich alle Embryonen eines Geleges im gleichen Entwicklungsstadium befinden. Zwischen den jeweiligen Eiablagen wird eine kurze Regenerationszeit von lediglich drei Monaten benötigt. Weitere Vorteile sind die extrakorporale Entwicklung, d.h. außerhalb der Leibeshöhle des Muttertieres, die eine permanente Beobachtung der Eier bzw. der frühen Teilungsstadien ermöglicht. Ferner können die Embryonen durch Mikroinjektionen von Nukleinsäuren oder Proteinen manipuliert werden, um deren Wirkung auf die embryonale Entwicklung zu erkennen. Für genetische Studien ist *Xenopus laevis* aber auf Grund seiner langen Reproduktionszeit und einer Tetraploidie ungeeignet.

Ein Modellorganismus, der ähnliche Vorteile wie der Krallenfrosch aber bei kurzer Reproduktionszeit bietet, ist der Zebrafisch (*Danio rerio*). Allerdings hat sich dieser Vorteil mit der Entdeckung einer partiellen Tetraploidie relativiert. Solche Tetraploidien können sehr leicht zu einer Fehlinterpretation eines genspezifischen Funktionsverlusts führen. Die zum Funktionsverlust von Genen verwendeten Morpholino *antisense* Oligonukleotide unterdrücken oftmals nur die Translation eines der beiden nicht sequenzhomologen Pseudoallele, wohingegen aber die Genfunktion von beiden Allelen ausgeführt werden und folglich ein Überlagerungseffekt (Redundanz) auftreten kann.

1.1. Pluripotenz und frühembryonale Entwicklung von *Xenopus laevis*

Zu Beginn der Embryonalentwicklung besitzen die Zellen eines Embryos das Potential, sich in Derivate jedes der drei Keimblätter, Ektoderm, Mesoderm und Endoderm, zu entwickeln. Damit sind sie zu diesem frühen Stadium pluripotent. Des Weiteren besitzen sie die Fähigkeit, mittels Teilung, die sowohl symmetrisch als auch asymmetrisch ablaufen kann (Xi und Xie,

2005), Zellen ihresgleichen zu erzeugen. Beide Merkmale, die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und die Pluripotenz, charakterisieren solche Zellen als Stammzellen (Weissmann, 2000; Boiani und Schöler, 2005). Allerdings verlieren die meisten Zellen im Laufe der Entwicklung diese Eigenschaften. Den adulten Stammzellen, die in den Geweben eines ausgewachsenen Lebewesens anzutreffen sind, ist ein gewisses Potential geblieben. Sie können sich allerdings nicht in Derivate jedes der drei Keimblätter entwickeln, sondern bilden Vorläuferzellen und ausdifferenzierte Zellen einer spezifischen Linie. Dies ist für die lebenslange Selbsterneuerung und Reparatur eines Gewebes essentiell (Weissmann, 2000). Solche Stammzellen zeichnen sich durch asymmetrische Teilungen aus, bei denen eine Kopie zum weiteren Erhalt der Stammzellen des spezifischen Gewebes dient und die andere Zelle der Differenzierung unterliegt (Pei, 2009).

In *Xenopus* verschiebt sich nach der Befruchtung der Eier die Zellmembran inklusive der äußeren Schicht des Zytoplasmas (Kortex) gegenüber dem inneren Zytoplasma, einem Prozess der auch als kortikale Rotation bekannt ist. An der Stelle, an der das Spermium eingedrungen ist, schiebt sich das vegetale Zytoplasma unter den animalen Kortex und wird als ventraler Pol bezeichnet. Auf der entgegengesetzten Seite kommt der vegetale Kortex über dem animalen Zytoplasma zu liegen, wobei die anteroposteriore Achse festgelegt wird. Nach der fünften Furchungsteilung befindet sich der Embryo im Morulastadium (32-Zellstadium). Bei den folgenden Zellteilungen entsteht innerhalb des Embryos eine mit Flüssigkeit gefüllte Hohlkugel, die als Blastocoel bezeichnet wird. Bis zum Ende des Blastula-Stadiums existieren lediglich maternale Signale, deren Transkripte und Proteine unterschiedlich lokalisiert sind (Zhang et al., 1998). Ab der 12. Teilung, der Midblastula Transition (MBT) (Newport und Kirschner, 1984), reduziert sich die Teilungsgeschwindigkeit und die Synchronität der Zellteilungen geht verloren. Zu diesem Zeitpunkt setzt auch die zygotische Transkription des Genoms ein. Anschließend erfolgt die Gastrulation, bei der die drei Keimblätter entstehen. Mit dem Ende des Blastula-Stadiums und der Festlegung der drei Keimblätter verlieren auch die Zellen ihren pluripotenten Charakter.

Während der Gastrulation, dem Beginn der Differenzierungsprozesse, wird zuerst aus den Zellen der animalen Region das Ektoderm und aus den vegetal gelegenen das Endoderm gebildet. Das Mesoderm formt sich im Folgenden durch das Einwandern von den Zellen um den Bereich des Blastoporus, auch Urmund genannt, zwischen die beiden bereits gebildeten Keimblätter. Aufgrund der einwandernden Zellen des Mesoderms kommt es im Inneren des Embryos zu einer Verdrängung des Blastocoels. Mit dem Schluss des Blastoporus ist die Gastrulation beendet. In diesem Zusammenhang haben zahlreiche Studien belegt, dass die

Zellen des zukünftigen Ektoderms und der ventralen marginalen Zone bis in die späte Gastrulation hinein multipotent bleiben (Domingo und Keller, 2000; Okabayashi und Asashima, 2003). Durch die im Anschluss an die Gastrulation stattfindende Induktion der Neuralplatte auf der dorsalen Körperseite wird die Neurulation eingeleitet, wobei sich Teile des dorsalen Ektoderms zur so genannten Neuralfurche einfalten. Der Schluss dieser Furche bildet das Neuralrohr, das sich im Verlauf der weiteren Entwicklung zum Zentralen Nervensystems differenziert. Die ektodermalen Bereiche, die nicht dem Neuralrohr zugeordnet sind, entwickeln sich zur Epidermis und den Sinnesepithelien. Die mesodermalen Zellen sind die Vorläufer der Muskeln, des Skeletts, des Gefäßsystems und der Exkretionsorgane. Die endodermalen Zellen bilden z.B. den Verdauungstrakt, die Leber, das Pankreas und die Lunge.

Der Zeitpunkt, zu dem der Embryo oder embryonale Stammzellen (ES-Zellen) die Differenzierungsprozesse einleiten und den pluripotenten Status verlieren, ist ein entscheidender Übergang in der Entwicklung und wird von einer Veränderung des genetischen Programms und Modifikationen des Genoms begleitet. Dieser Übergang ist an Säugetier ES-Zellen, die aus der inneren Zellmasse der Blastozyste kultiviert werden, vielfach untersucht worden (Ivanova et al., 2006). Die ersten Maus ES-Zellen wurden 1981 durch Evans und Kaufman und die ersten humanen ES-Zellen 1998 durch Thomson et al. isoliert. Im Unterschied zu den totipotenten Zellen zu Beginn der Embryonalentwicklung sind ES-Zellen weniger potent, da ihnen die Fähigkeit fehlt, sich in Zellen des Trophektoderms und folglich zu einem vollständigen Lebewesen zu differenzieren (Jaenisch und Young, 2008). Des Weiteren sind sie durch symmetrische Teilungen charakterisiert. Um die ES-Zellen in einem pluripotenten Status zu halten, müssen sie allerdings unter speziellen Bedingungen kultiviert werden (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981), da ansonsten eine spontane Differenzierung und folglich ein Verlust der Pluripotenz eingeleitet wird. So werden z.B. die ES-Zellen der Maus auf Feeder-Layers und unter Zugabe von LIF (Leukämie inhibierender Faktor) oder anderen Zytokinen, welche die spontane Differenzierung hemmen, in Kultur gehalten (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981). Bei den humanen Stammzellen werden weitere Zytokine für die Unterdrückung der Differenzierung herangezogen, z.B. BMPs und FGFs (Thomson et al., 1998). Zu den für die Selbsterneuerung der ES-Zellen und die Aufrechterhaltung der Pluripotenz intrazellulär benötigten Transkriptionsfaktoren gehört neben Sox2, Nanog und Faktoren der Polycomb-Gruppe (PcG) auch der POU-Faktor Oct3/4, ein Mitglied der Unterklasse V, der in Säugetier-Blastozysten und in den davon abgeleiteten pluripotenten Stammzellen exprimiert wird (Nichols et al., 1998; Niwa et al., 2000; Chambers

et al., 2003; Mitsiu et al., 2003; Chambers et al., 2004). Trotz der bereits gewonnenen Erkenntnisse, wie einer Komplexbildung zwischen Nanog, Oct3/4 und Sox2 (Wang et al., 2006), der Identifikation gemeinsamer Zielgene (Boyer et al., 2005) und der Aktivierung des *Oct3/4* Promotors via Nanog (Pan et al., 2006), Sox2 (Masui et al., 2007) und FoxD3 (Pan et al., 2006), ist der molekulare Mechanismus, dem der Verlust des pluripotenten Status während der Entwicklung des Embryos unterliegt, immer noch nicht vollständig geklärt. Für die Erhaltung des Stammzellcharakters ist vermutlich ein regulatorischer Kreislauf, der sich aus Autoregulation und Feed-Forward-Loops von *Nanog, Oct3/4* und *Sox2* zusammensetzt, verantwortlich (Boyer et al., 2005; Jaenisch und Young, 2008). Allerdings scheint *Nanog*, ein bisher in *Xenopus* noch nicht identifiziertes Gen, eher für die Stabilisierung des Pluripotenzstatus als für dessen Erhaltung notwendig zu sein (Chambers et al., 2007). Für das Einleiten der Differenzierungsprozesse spielen hingegen neben der Suppression der für die Erhaltung der Pluripotenz verwendeten Genprodukte, wie Oct3/4, Sox2 und Nanog, scheinbar auch DNA Methylierung (Carlone et al., 2005; Li et al., 2007; Yeo et al., 2007) und Chromatinmodifikationen (Azuara et al., 2006; Mikkelsen et al., 2007), verursacht durch Methylierung und Acetylierung der Histone, eine Rolle. Diese Veränderungen werden unter anderem durch die Interaktionen von Oct3/4, Sox2 und Nanog mit den Proteinen der Polycomb-Gruppe, eine Familie epigenetischer Regulatoren, welche die Fähigkeit zur Erhaltung des pluripotenten Charakters durch Silencing, dem Stilllegen, von Genen beeinflussen, vermittelt (Bernstein et al., 2006; Boyer et al., 2006a; Lee et al., 2006). Die PcGs können verschiedene Polycomb-Repressionskomplexe (PRCs) bilden (Schuettengruber et al., 2007). PRC2 z.B. katalysiert die Methylierung des Histons H3 Lysinrestes 27 (H3K27), der daraufhin einen Komplex mit dem PRC1 eingehen kann. Dieser wiederum ruft eine Oligomerisierung und eine Kondensierung der Chromatinstruktur hervor und verhindert die Remodelierung des Chromatins, wodurch eine stabile Stilllegung gewährleistet wird. Das Resultat ist eine starke Heterochromatisierung eines bestimmten genomischen Abschnittes, zusätzlich verstärkt durch Entfernung der aktivierenden und Einführung der heterochromatisierenden Modifikationen der Histone und der Rekrutierung der *de novo* DNA Methyltransferase DNMT3a/3b (Feldman et al., 2006). Dabei kommt es zum Erliegen der Transkription ein oder mehrerer Gene, wie *Oct3/4* und *Nanog* (Jaenisch und Young, 2008). Zusammenfassend werden solche Modifikationen als epigenetische Veränderungen bezeichnet, die bei der Zellteilung teilweise an die Tochtergeneration weitergegeben werden. Der damit einhergehende Verlust der nukleären Potenz während der Differenzierung wird auch beim Klonen von Lebewesen durch den Transfer eines Zellkerns einer Donorzelle in

eine Oozyte deutlich. Das Potential des Zellkerns, eine normale Embryonalentwicklung einzuleiten, sinkt mit zunehmendem Alter der Spenderzelle sowohl in Amphibien (Briggs und King, 1960; Gurdon et al., 1975) als auch in Säugern (Willadsen, 1986; Tsunoda et al., 1987; Campbell et al., 1996; Solter, 2000). Auch weisen Zellkerne von pluripotenten ES-Zellen gegenüber denen der somatischen Zellen unterschiedliche Potentiale auf (Rideout et al., 2000; Eggan et al., 2001). Unter der gemeinsamen ektopischen Expression entweder von *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* und *Klf4* (Takahashi und Yamanaka, 2006; Maherali et al., 2007; Okita et al., 2007; Takahashi et al., 2007; Wernig et al., 2007) oder von *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* und *Lin-28* (Yu et al., 2007) konnte beobachtet werden, dass sowohl fötale als auch adulte Zellen zum Status der Pluripotenz reprogrammiert werden können (Jaenisch und Young, 2008). Eine Reprogrammierung des Genoms differenzierter Zellen zu totipotenten Zygoten ist ebenfalls mit Hilfe des Transfers der somatischen Zellkerne oder durch Klonen zu beobachten (Jaenisch und Young, 2008). Diese so genannten induzierten pluripotenten Stammzellen (induced pluripotent stem cells, iPSC) sind vor allem im Hinblick auf die regenerative Medizin und Gentherapie von entscheidender Bedeutung, da sie eine unbegrenzte Quelle körpereigener Stammzellen darstellen, aus denen durch gewebsspezifische Induktion diverse Zelllinien differenzieren könnten.

1.2. Transkriptionsfaktoren der POU-V Klasse

Die Mitglieder der POU(Pit-Oct-Unc)-Familie (Ryan und Rosenfeld, 1997) sind sowohl für die Embryogenese und Musterbildung als auch für die zelluläre Differenzierung notwendig. Diese Transkriptionsfaktoren zeichnen sich durch eine zweiteilige DNA-bindende Domäne aus, die durch eine POU-spezifische Domäne (POU_S) und eine POU-Homeodomäne (POU_{HD}) charakterisiert sind. Aufgrund der unterschiedlichen Konservierung der Sequenzen der beiden Domänen und des dazwischenliegenden flexiblen Verbindungsstückes (Linker), findet eine weitere Unterteilung der POU-Familie in sechs bis sieben Unterfamilien statt (Herr und Cleary, 1995; Ryan und Rosenfeld, 1997).

Mitglieder dieser Familie interagieren über die DNA-bindende Domäne mit einem spezifischen Oktamer-Motiv der Consensussequenz ATGCAAAT, das in Promotoren und Enhancer-Elementen vieler Gene als regulatorisches Element der Transkription gefunden wurde (Schöler et al., 1990; Herr und Cleary, 1995). Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass Oct1, Oct2 und Pit1 in Abhängigkeit von der Anordnung der Bindungsstellen sowohl in homodimeren als auch in heterodimeren Komplexen mit der DNA interagieren können (Wegner et al., 1993; Herr und Cleary, 1995; Ryan und Rosenfeld, 1997). Dabei sind

zwei hoch affine Bindungsstellen für Oct-Dimere, PORE (palindromes Oct regulatorisches Element) und MORE (mehr PORE), bereits beschrieben worden (Botquin et al., 1998; Pesce und Schöler, 2001).

In der Unterklasse V befindet sich auch der von Schöler et al. (1990) beschriebene Transkriptionsfaktor Oct3/4 der Säugetiere, der für die Selbsterneuerung der embryonalen Stammzellen (ES) und die Aufrechterhaltung der Pluripotenz verantwortlich ist (Nichols et al., 1998). Sowohl die Transkripte als auch das Protein des maternal transkribierten *Oct3/4* Gens können in befruchteten Oozyten bis zum 2-Zell-Stadium nachgewiesen werden. Die nachfolgende zygotische Expression beginnt während des 4- bis 8-Zell-Stadiums (Rosner et al., 1990; Schöler et al., 1990; Yeom et al., 1991). Die Verteilung der *Oct3/4* RNA während der frühen Teilungsstadien ist in allen Blastomeren uniform, reduziert sich allerdings in den äußeren Zellen der Morula bei beginnender Polarisierung und Trophektodermbildung. In dieser epithelialen Schicht wird die Menge an *Oct3/4* RNA und Protein weiter reduziert, bis sie 4,5 Tage post-coitum (day post-coitum: dpc) nicht mehr zu detektieren ist (Schöler et al., 1990; Palmieri et al., 1994). Im Gegensatz dazu bleibt die Expression in der inneren Zellmasse (ICM) bestehen, bis diese Zellen sich 4,5 dpc in den Epiblast, der das primitive Ektoderm und embryonales Ektoderm bildet, und den Hypoblast, der die Zellen des primitiven und embryonalen Endoderms liefert, aufteilen. Bei beginnender Differenzierung des Hypoblasten kommt es zu einer kurzzeitigen Erhöhung der *Oct3/4* Expression, um im Anschluss auf eine nicht mehr nachweisbare Menge reprimiert zu werden. Während der Gastrulation ist *Oct3/4* immer noch im Epiblast zu detektieren. Ab 7,5 dpc weist das Gen allerdings eine lediglich auf die sich bildenden PGCs (primordialen Keimbahnzellen, primordial germ cells) beschränkte Expression auf (Schöler et al., 1990; Yeom et al., 1996). Das Oct3/4 Protein wird im Zytosol synthetisiert und anschließend über ein Kernlokalisationssignal (nuclear localisation signal: NLS) in den Zellkern transportiert, um seine transkriptionelle Aktivität ausüben zu können (Pan et al., 2004). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass unterschiedliche Mengen an Oct3/4 während der Differenzierung ausschlaggebend für die Induktion unterschiedlicher Differenzierungsprogramme in ES-Zellen sind (Niwa et al., 2000; Hay et al., 2004). So resultiert ein Funktionsverlust von Oct3/4 oder ein Knockdown mit Hilfe von siRNA (Zaehres et al., 2005) bei Mausembryonen in einer Ausweitung des extraembyonalen Trophektoderms und dem Tod der Embryonen um den Zeitpunkt der Implantation aufgrund einer fehlenden Ausbildung der pluripotenten ICM der Blastozyste, aus der sich die unterschiedlichen Gewebe differenzieren (Nichols et al., 1998; Niwa et al., 2000). Allerdings lässt die offensichtlich normale Entwicklung der Oct3/4-

defizienten Embryonen bis zum Blastozystenstadium vermuten, dass eine Kombination von maternalen, zygotischen und Haushaltsgenen notwendig ist, um eine normal verlaufende Entwicklung während der Präimplantation zu gewährleisten. Bei einem Keimbahn spezifischen Verlust von *Oct3/4* wurde nachgewiesen, dass die PGCs in die Apoptose gehen (Kehler et al., 2004). Eine Verdopplung des *Oct3/4* Spiegels hingegen führt zu einer Differenzierung in Richtung des primitiven Endoderms (Niwa et al., 2000). Die Ursache dieses Effektes liegt wahrscheinlich darin, dass Oct3/4 direkt durch eine Interaktion mit Cdx2, das die trophektodermale Differenzierung einleitet, einen repressorischen Komplex bildet und somit die Differenzierung verhindern kann (Niwa et al., 2005).

Homologe des *Oct3/4* Gens wurden ebenfalls in anderen Vertebraten identifiziert, die nicht zu den Säugern gehören, wie Hühnchen, Frosch und Fisch (Hinkley et al., 1992; Burgess et al., 2002; Cao et al., 2006; Morrison und Brickman, 2006; Cao et al., 2007; Lavial et al., 2007). Die in *Xenopus* existierenden Gene, die für POU-Faktoren der Unterklasse V kodieren, sind *Oct60* (Hinkley et al., 1992; Whitfield et al., 1993), *Oct25* (Hinkley et al., 1992) und *Oct91* (Frank und Harland, 1992; Hinkley et al., 1992; Henig et al., 1998). Dabei weist das Oct60 Protein die größte Sequenzhomologie zu Oct3/4 auf (Whitfield et al., 1993). Die Expression der drei Gene beschränkt sich hauptsächlich auf die Oogenese und die frühzeitige Embryogenese (Hinkley et al., 1992; Whitfield et al., 1993; Whitfield et al., 1995). *Oct60* wird lediglich während der Oogenese transkribiert und weist eine zellautonome Verlagerung seiner intrazellulären Verteilung vom Zytoplasma in den Zellkern auf (Whitfield et al., 1995; Ryan und Rosenfeld, 1997). Nach dem Einsetzen der zygotischen Transkription werden die Transkripte mit beginnender Gastrulation abgebaut. Hingegen weist *Oct25* sowohl eine maternale als auch eine zygotische Expression auf. Transkripte sind in der späten Oozyte bis zur Neurula nachweisbar. Die größte Transkriptmenge wird während der frühen Gastrulationsstadien erreicht. Hauptsächlich kann *Oct25* in dem sich bildenden Ekto- und Mesoderm nachgewiesen werden (Cao et al., 2004). Zu Zeiten der Neurulation findet sich *Oct25* noch im posterioren Neuroektoderm und zum Schwanzknospenstadium in der Spitze des Schwanzes. Zwischen dem Säuger *Oct3/4* und dem *Oct25* Gen von *Xenopus laevis* konnte eine weitgehende Konservierung der Proteinsequenzen beobachtet werden (Hinkley, et al. 1992).

Das rein zygotisch transkribierte *Oct91* wird erst mit beginnender Gastrulation aktiviert und erreicht sein Maximum während der späten Gastrulationsstadien. Für alle drei Gene konnte eine Anreicherung in der animalen Hälfte des sich entwickelnden Embryos gefunden werden. Bei einer Überexpression von Oct25 wird die Differenzierung neuroektodermaler und

mesodermaler Gewebe unterdrückt (Cao et al., 2004).

1.3. Festlegung der drei Keimblätter, Mesoderm, Ektoderm und Endoderm

Für die Festlegung der unterschiedlichen Keimblätter bedarf es mehrerer Induktionsereignisse. Diese stimulieren auf der einen Seite die Expression essentieller Gene für die weitere Entwicklung und Differenzierung in den entsprechenden Zellen und inhibieren andererseits die für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz notwendigen Gene. Die ungleichmäßige Verteilung maternaler Faktoren dient hierbei als initiierender Signalweg für die Induktion der mesodermalen und endodermalen Keimblätter (Mesendoderm). Zusammenfassend wurde ein Drei-Signal-Modell aufgestellt, das die grundsätzlichen induktiven Ereignisse des Mesoderms darstellt (Dale und Slack, 1987; Smith, 1989; Slack, 1994). Während des Blastula-Stadiums werden Signale aus der vegetalen Hemisphäre des zukünftigen Mesoderms, das in ventrale und dorsale Bereiche unterteilt ist, in die animale Hemisphäre projiziert. Das davon vegetal gelegene Nieuwkoop Zentrum induziert dabei die dorsalen Bereiche. Die Signale aus der ventralen und lateralen Region regen die Bildung des ventrolateralen Mesoderms an, das sich zu Mesenchym, dem Seitenplattenmesoderm und den Blutinseln differenziert. Hingegen induzieren die dorsalen Signale zuerst die Bildung des Spemann'schen Organisators, aus dem die Gewebe des dorsalen Mesoderms, das Notochord und die Somiten abgeleitet werden. Erst nach Beginn der zygotischen Transkription wird das aus der dorsalen Äquatorregion, dem Spemann'schen Organisator kommende dritte Signal in die horizontale Richtung ausgesendet. Dieses Signal bestimmt das Ausmaß des dorsalen mesodermalen Gewebes, indem die Ventralisierung verhindert wird.

Eine besonders wichtige Rolle in der bereits vor der MBT stattfindenden primären Mesendoderminduktion spielt hierbei der maternal exprimierte T-Box-Transkriptionsfaktor VegT (Lustig et al., 1996; Stennard et al., 1996; Zhang und King, 1996). Die Transkripte zeigen eine Anreicherung am vegetalen Pol der reifen Oozyten und der frühen Teilungsstadien. Der Funktionsverlust des maternalen VegT äußert sich in einer fehlerhaften primären Induktion der Keimblätter (Zhang et al., 1998) und in einer unterdrückten Expression zygotisch transkribierter Wachstumsfaktoren, wie FGF (fibroblast growth factor) und TGF-β/Nodal (transforming growth factor) (Kofron et al., 1999). Letzteres ist damit begründet, dass maternales VegT die Transkription der für die Liganden des TGF-β/ Nodal Signalwegs kodierenden Gene aktiviert (Clements et al., 1999; Hyde und Old, 2000; White et al., 2002). Bei Inkubation von animalen embryonalen Kappen, einem undifferenzierten Zellverband des zukünftigen Ektoderms mit pluripotentem Charakter, mit Wachstumsfaktoren

konnte aufgrund der Differenzierung in mesodermale und/oder endodermale Gewebe deren induktives Potential nachgewiesen werden. Allerdings besitzen auch Mitglieder aus der Wnt-Familie sowie andere vom Organisator sezernierte Proteine, wie Noggin, Chordin, und Follistatin (Kimelman und Kirschner, 1987; Slack et al., 1987; Albano et al., 1990; Asashima et al., 1990; Köster et al., 1991; Sokol et al., 1991; Dale et al., 1992; Moon und Christian, 1992; Smith und Harland, 1992; Christian und Moon, 1993; Smith et al. 1993; Harland, 1994), induktive Aktivität. Die Wachstumsfaktoren FGF und Aktivin A gehören in diesem Fall zu den klassischen Faktoren, die auch dazu verwendet werden, die Entstehung von mesodermalen und endodermalen Geweben zu fördern (Slack et al., 1987; Asashima et al., 1990; Smith et al., 1990). FGF agiert hierbei als ein Kompetenzfaktor für die mesodermale Induktion und Aufrechterhaltung des mesodermalen Zustands (Kimelman et al., 1988; Cornell et al., 1995; Harland und Gerhart, 1997; LaBonne und Whitman, 1997) sowie als neuraler Induktor, mit der Fähigkeit das Neuroektoderm zu posteriorisieren (Cox und Hemmati-Brivanlou, 1995; Lamb und Harland, 1995; Isaacs et al., 1998). Bei Aktivin A handelt es sich um ein Mitglied der sezernierten transformierenden Wachstumsfaktoren TGF-β (Asashima et al., 1990; Smith et al., 1990), zu denen auch die ventral induzierenden BMPs (Bone morphogenetic proteins) gehören. In Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration kann durch Aktivin A das vollständige Spektrum mesodermaler und endodermaler Gewebe induziert werden (Green und Smith, 1990; Ariizumi et al., 1991; Gurdon et al., 1994). Die induzierende Aktivität von Aktivin A wird innerhalb des *Xenopus* Embryos durch Nodal verwandte Faktoren (Xnrs) wahrgenommen, die ebenfalls zu den sezernierten Proteinen der TGF-β Familie gehören (Agius et al., 2000). In Vertebraten, wie Maus und Fisch, führt eine Unterbrechung des Nodal Signalweges zu einer reduzierten Mesendodermbildung und zu daraus folgenden Fehlern bei der Festlegung der Körperachse.

In *Xenopus* werden sechs verschiedene *Nodal* verwandte Gene, *Xnr1-6*, während der Blastula- und Gastrulationsstadien exprimiert (DeRobertis und Kuroda, 2004). Bis auf Xnr3, das eine Rolle während der Neuralinduktion übernimmt, sind die restlichen fünf für die Bildung des Mesendoderms erforderlich (Agius et al., 2000; Jones, et al., 1995; Joseph und Melton, 1997). Ebenso können das Nodal der Maus sowie Cyclops und Squint des Zebrafisches die Bildung des Mesoderms induzieren (Schier und Shen, 2000; Whitman, 2001; Schier, 2003; Schier und Talbot, 2005, Shen, 2007). Während eine ektopische Expression der Nodals zu einer ektopischen Mesendodermentstehung führt, resultiert ihre Inhibition mit Hilfe eines dominant-negativen Konstrukts oder eines Inhibitors, z.B. Cerberus, in einer fehlerhaften Bildung des Mesendoderms. Sowohl in *Xenopus* als auch anderen Vertebraten, wie Maus und

Zebrafisch führt dies zu einer inkorrekt ausgebildeten Körperachse (Schier und Shen, 2000). Neben ihrer Funktion bei der Bildung des Mesendoderms sind die Nodals ebenso bei der links-rechts Spezifizierung der Körperachse involviert (Ramsdell und Yost, 1998).

Die induktive Aktivität von Nodal/Aktivin A/BMP wird über Signalkaskaden vermittelt. Der erste Schritt ist die Bindung des Liganden Nodal oder Aktivin A an einen membranständigen Serin-Threonin-Kinase-Aktivin-Rezeptor vom Typ I, ActRIB (ALK4), wodurch eine Komplexierung mit dem Typ II Aktivinrezeptor, ActRIIA oder ActRIIB, induziert wird (Whitman, 2001; Balemans und Van Hul, 2002; ten Dijke und Hill, 2004). Diese Bindung ermöglicht die Phosphorylierung und daraus resultierende Aktivierung des Typ I-Rezeptors durch den Typ II-Rezeptor. Im Gegensatz zu Aktivin A braucht der Signalweg der Nodals allerdings zusätzliche EGF-CFC-Korezeptoren, um das Signal weiterzuleiten (Shen und Schier, 2000). In der Signalkaskade sind die intrazellulären Smads, die für die Weiterleitung des Signals in den Kern verantwortlich sind, dem Rezeptor der Liganden der TGF-β Familie nachgeschaltet. Allerdings bedarf es hierbei einer Phosphorylierung der R-Smads (rezeptorregulierter Smads), Smad2 oder Smad3, durch den aktivierten Typ I-Rezeptor. Bei einer Bindung von BMP2/4 an den Rezeptor kommt es im Folgenden zu einer Aktivierung der Smads 1 und 5 (Graff et al., 1996; Heldin et al., 1997). Aktivierte R-Smads wiederum bilden heteromere Komplexe mit dem Ko-Smad Smad4. Die gebildeten Komplexe leiten die aktivierenden Effekte des Aktivin/Nodal Signals durch eine Translokalisation in den Zellkern weiter und führen somit direkt zu einer gesteigerten Expression mesodermal induzierender Gene, wie *Goosecoid* (*Gsc*), *Xlim* und *Xnr1*, und endodermal induzierender Gene, wie *Milk*, *Mix1*, *Mixer* oder *Sox17* (Whitman, 2001; Xanthos et al., 2001; Shivdasani, 2002).

Aufgrund der relativ geringen Bindungsaffinität der Smads an die DNA werden zur Stimulation der Transkription der Zielgene zusätzliche DNA-bindende Faktoren benötigt, die eine starke gewebs- oder stadienspezifische Bindung an die entsprechenden Enhancersequenzen ermöglichen (Schier und Shen, 2000; Whitman, 2001; Shen, 2007). Während der Bildung des Mesendoderms interagiert beispielsweise der winged-helix Transkriptionsfaktor FAST1 (FoxH1) mit Smad2, wodurch die Transkription der Gene *Goosecoid (Gsc*) und *Mix2* induziert wird (Whitman, 2001; Ring et al., 2002). Das organisatorspezifische Homeoboxprotein Gsc kann nach ektopischer Expression in ventralen Geweben dorsale Strukturen induzieren (Cho et al., 1991; Niehrs et al., 1993). Durch Mix2 und dessen Paralog Mix1 werden die endodermalen und mesodermalen Bereiche während der Prä-Gastrulations- und Gastrulationsstadien in *Xenopus*-Embryonen festgelegt (Lemaire et al., 1998).

Die Tatsache, dass der *Gsc* Promotor ein responsives distales Element (DE) enthält, macht eine Antwort auf das Aktivin/Nodal-Signal erst möglich (Watabe et al., 1995). Ein zusätzlich enthaltenes proximales Element (PE), das responsiv gegenüber dem Wnt Signalweg ist, scheint für die Aufrechterhaltung der *Gsc* Transkription verantwortlich zu sein (Laurent et al., 1997; Ring et al., 2002). Ebenso ist das PE bzw. das darin enthaltene Bindungsmotiv AATATACA die Interaktionsstelle des *Gsc* Promotors mit FAST1. Die Bindung eines weiteren Transkriptionsfaktors, WBSCR11, innerhalb des DE konnte in vorangegangenen Studien gezeigt werden. Die Transkription von *Gsc* selbst wird allerdings erst durch eine Komplexbildung zwischen FAST1, Smad2 und WBSCR11 eingeleitet (Ring et al., 2002).
Der *Mix2* Promotor enthält ebenfalls ein Aktivin-responsives Element (ARE) zwischen den Positionen -215 bis -166 (Huang et al., 1995; Vize, 1996). Mittels Sequenzanalysen konnte innerhalb des AREs jeweils eine Bindungsstelle für FAST1 (TGTGTATT) und eine für Smad (GTCT) identifiziert werden, die für eine Interaktion zwischen FAST1 und Smad2 verantwortlich sind und zu einer Aktivierung des *Mix2* Promotors führen.
Während die Aktivität des Nodal/Aktivin Signalwegs eine Grundvoraussetzung für die Bildung des Mesendoderms im Embryo ist, spielt auch die negative Regulation dieser Kaskade eine wichtige Rolle. Erst durch die präzise Regulation des Signalwegs können die entsprechenden Funktionen zu den gewünschten Zeitpunkten an den dafür vorgesehenen Stellen innerhalb des Embryos von einer definierten Signalstärke übernommen werden, damit die Mesendodermspezifizierung und folglich die Embryogenese korrekt ablaufen kann. Mehrere Studien haben bereits gezeigt, dass die Regulation zu jedem Zeitpunkt des Signaltransfers eingreifen kann. Neben einer extrazellulären Inhibition der Nodal/Aktivin Liganden kann eine zytoplasmatische Inhibition der Smads oder eine nukleäre Unterdrückung von FAST1 oder Smad2 stattfinden (Schier, 2003; Shen, 2007).
Ein weiteres, neben VegT parallel existierendes Signal spezifiziert die Musterbildung der Keimblätter entlang der dorsoventralen Achse und wird durch das maternal transkribierte *β-Catenin* vermittelt. Nach Befruchtung findet auf der dorsalen Seite eine nukleären Akkumulierung von *β-Catenin* statt, die zu einer Unterbrechung der radialen Symmetrie des Embryos führt. Die Interaktion von β-Catenin mit den Transkriptionsfaktoren TCF/LEF (Behrens et al., 1996) führt zu einer Aktivierung der Expression des Zielgens *Siamois* im Nieuwkoop Center (Wodarz und Nusse, 1998). Des Weiteren existiert ein Synergismus zwischen β-Catenin und VegT, der zu einer verstärkten Transkription der *Xnrs* führt (Agius et al., 2000; Takahashi et al., 2000). Das Resultat ist ein entlang der dorsoventralen Achse ausgebildeter Gradient von induzierenden Signalen, der am Maximum die darüber liegende

äquatoriale Region zur Ausbildung von dorsalem Mesoderm, dem Spemann'schen Organisator, induziert. Im Gegensatz dazu kommt es bei geringer Dichte der induzierenden Signale zu einer Bildung von ventralem Mesoderm. Im Organisator aktiviert der Signalweg von β-Catenin die Expression der neuralen Induktoren *Xnr3*, *Chordin* und *Noggin* (Wessely et al., 2001). Während die Unterdrückung der endogenen β-Catenin Signalkaskade zu einem Verlust dorsoanteriorer Strukturen führt (Heasman et al., 2000), wird bei ektopischer Aktivierung des Signalwegs eine vollständige sekundäre Körperachse ausgebildet. Folglich wird durch maternales β-Catenin eine Dorsalisierung der drei Keimblätter initiiert.
Ob die POU-V Faktoren auf dieses oder andere Netzwerke einwirken, an welcher Stelle sie angreifen und wie genau der Mechanismus abläuft, sind bislang noch nicht geklärte Fragen in der Untersuchung der Pluripotenz und der frühzeitigen embryonalen Entwicklung.

1.4. Pluripotenz assoziierte (*Developmental Pluripotency associated: Dppa)* Gene

Wie bereits erwähnt exprimieren embryonale Stammzellen sowie undifferenzierte Zellen während der frühen Embryogenese bestimmte Transkriptionsfaktoren, die für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz erforderlich sind und während der fortschreitenden Differenzierung stillgelegt werden. Neben *Oct3/4* konnten weitere Gene identifiziert werden, die in Säugern mit dem Zustand der Pluripotenz in Verbindung stehen, wie die *developmental pluripotency associated* (*Dppa*) Gene (Bortvin et al., 2003). Allerdings gehören die bislang fünf identifizierten *Dppas* nicht zu einer bestimmten Familie, die sich durch ein spezifisches Motiv auszeichnen. Stattdessen wurden sie aufgrund ihrer auf pluripotente Zellen beschränkten Expressionsmuster in einer Gruppe zusammengefasst. In Korrelation mit den Pluripotenzmarkern *Oct3/4*, *Sox2* und *Nanog* wird auch die Expression der *Dppas* nach beginnender Differenzierung der Zellen unterdrückt (Boiani und Schöler, 2005).
Dppa1 der Maus wird in ES-Zellen exprimiert und zeigt im Embryo beim Übergang von Morula zu Blastula eine verstärkte Transkription (Bortvin et al., 2003). Aufgrund einer Transmembrandomäne konnten Ähnlichkeiten zwischen dem Dppa1 Protein und Kim-1 identifiziert werden (Ichimura et al., 1998). *Dppa2*, das ursprünglich als Embryo/Cancer Sequenz A beschrieben wurde (ECSA: Monk und Holding, 2001), und *Dppa4* sind miteinander verwandt. Wahrscheinlich haben sich diese Gene während der Evolution aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt, da sie sich sowohl bei Mensch als auch bei Maus auf dem gleichen genomischen Lokus befinden (Maldonado-Saldivia et al., 2007). Ihnen gemeinsam ist eine putative DNA-bindende Domäne, die SAP-Domäne (Scaffold-attachment factor A/B, Acinus und PIAS (protein inhibitor of activated STATs); Aravind und Koonin,

2000), die in verschiedenen Proteinen anzutreffen ist und deren Aufgaben über chromosomale Organisation bis zu RNA Modifikationen reichen. SAP-Domänen enthalten eine zweiteilige Anordnung stark konservierter hydrophober, polarer und ausladender Aminosäuren, die durch eine, ein nicht austauschbares Glycin enthaltende Region voneinander getrennt werden. Weiterhin ähneln sich die Expressionsmuster von *Dppa2* und *Dppa4* in den Blastozysten und der Keimbahn von Mäusen, sind aber nicht komplett identisch (Bortvin et al., 2003; Maldonado-Saldivia et al., 2007). Eine Überexpression von Dppa4 inhibiert die mesodermale Differenzierung von ES-Zellen und verursacht den Tod der Zelle. Im Gegensatz dazu führt der mit Hilfe von shRNA erzeugte Knockdown zu einer Induktion der Differenzierung in eine primitive ektodermale Richtung, die über eine gesteigerte *FGF5* Expression nachgewiesen wurde. Für die Dppa2 Überexpression in ES-Zellen konnte kein Effekt beobachtet werden (Masaki et al., 2007). Das anfangs als *stella* oder *PGC7* beschriebene *Dppa3* wurde erstmals aus ursprünglichen Keimzellen isoliert (Saitou et al., 2002; Sato et al., 2002). Dppa3 enthält wie Dppa2 und Dppa4 eine SAP-Domäne, besitzt aber zusätzlich eine Struktur, die ein Spleißfaktor-ähnliches Motiv aufweist (Payer et al., 2003; Bortvin et al., 2004), das weder in Dppa2 noch in Dppa4 gefunden werden kann. Die Defizienz von *Dppa3* in Mäusen resultiert in einer reduzierten Fertilität der Weibchen (Payer et al., 2003). Vorangegangene Studien haben bereits gezeigt, dass *Dppa3* für die Methylierung des maternalen Genoms notwendig ist (Nakamura et al., 2007). Dieser Befund deutet auf die Einbindung einiger Dppa Proteine in epigenetische Prozesse. Erwähnenswert ist ferner die Beobachtung, dass *Dppa3* den gleichen genomischen Lokus wie *Nanog*, *FOXJ2* und *GDF3* einnimmt, eine Region, die für strukturelle chromosomale Veränderungen beschrieben wurde und die mit der Keimzellkarzinogenese in Verbindung steht (Clark et al., 2004). Dppa5, auch bekannt als Ph34 oder ECAT2, ein Protein, das durch Retinsäure reprimiert wird (Siomi et al., 1994), wird zur KHDC1/ECAT1/OOEP/Dppa5-Familie gezählt. Diesen Proteinen ist eine für die RNA-Bindung notwendige KH-Domäne gemeinsam. Die Expression der dazugehörenden Gene beschränkt sich auf die Oozyten und embryonalen Stammzellen. Interessanterweise werden sie nur im Genom von Eutheria, aber weder in Marsupialier noch in Nicht-Säugern gefunden (Pierre et al., 2007). Allerdings ist die Funktion von *Dppa5* noch nicht aufgeklärt, da selbst Mäuse mit einer Defizienz für das *Dppa5* Gen (*Dppa5*$^{-/-}$) sich normal entwickeln und fertil sind (Amano et al., 2006).

Bisher sind alle Erkenntnisse über die Dppas auf den Bereich der Säugetiere begrenzt. Es stellt sich die Frage, ob auch Vertreter der *Dppa*-Familie in niederen Vertebraten existieren. Auch bleiben die Funktionen der einzelnen Gene, vor allem im Hinblick auf die

Selbsterneuerung der Zellen und die Aufrechterhaltung der Pluripotenz im Ablauf der frühzeitigen embryonalen Entwicklung zu klären.

1.5 Aufgabenstellung

Der Inhalt dieser Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung der POU-V Faktoren *Oct25, Oct60* und *Oct91* in *Xenopus laevis*. Die Funktion dieser drei bereits bekannten *POU-V* Gene in *Xenopus laevis* wurde durch Überexpression und Funktionsverluststudien untersucht. Ihr Einfluss auf die frühzeitige Entwicklung, d.h. auf die Determinierung und die Differenzierung, sollte anhand von möglichen Interaktionspartnern sowie potentiellen Zielgenen näher charakterisiert werden. Die daran beteiligten Signalwege sollten identifiziert werden.

Ebenso sollte das *XDppa2/4* Gen, ein potentielles Homolog von *Dppa2* und *Dppa4* aus Maus und Mensch, erstmals charakterisiert werden. Das zeitliche wie räumliche Expressionsmuster, die Effekte nach Überexpression und Funktionsverlust sowie Zielgene und Regulatoren sollen dazu dienen, die Funktion dieses Gens im niederen Vertebraten, *Xenopus laevis,* aufzuklären.

2. Materialien und Methoden

2.1 Geräte, Chemikalien und Bezugsquellen

2.1.1 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Agaroseflachbettgelektro-phorese-Gelkammern	GNA 100 und 200	Pharmacia (Freiburg)
Binokular		Saur (Reutlingen)
Brutschränke (für *Xenopus laevis*)	WB22K	Mytron (Heiligenstadt)
Brutschrank (37°C)	BR6000	Heraeus Instruments GmbH (Hanau)
Dokumentationsanlage für Embryonen und histologische Schnitte	DP 11 (Digitalkamera) SZH 10 (Binokular) BH-2 (Mikroskop)	Olympus (Hamburg)
Eismaschine	AF-10	Scotman (Milano; Italien)
Gefrierschrank -20°C	Premium	Liebherr
Gefrierschrank -70°C	Herafreeze	Heraeus Instruments GmbH (Hanau)
Gefriertruhe -70°C	E80-360 T	Colora GmbH (Lorch)
Geltrockner	Gel Air Dryer	Biorad (München)
Heizblock	HBT130	HLC (Bovenden)
Heizrührer	MR3000	Heidolph (Schwabach)
Injektionsanlage	Pneumatic Picopump PV 820	Bachofer (Reutlingen)
Inkubationsschrank 14°C (für *Xenopus laevis*)	BK-600	Heraeus Instruments GmbH (Hanau)
Kaltlichtquelle	EK-1	Euromex (Ed Arnheim, Niederlande)
Kapillaren	Borosilicatglas mit Filament 0,1 mm	H. Saur Laborbedarf (Reutlingen)
Konfokales Lasermikroskop	Leica TCS 40	Leica (Solms)
Kühlschränke	FKS 5000 Type 2000	Liebherr
Kühlzentrifuge	Biofuge primoR	Heraeus Instruments GmbH (Hanau)
Kryostat	Frigomix	Braun (Melsungen)
Luminometer	LB 9507	Berthold (Bad Wildbad)
Mikroskop	Axiophot mit Epifluoreszenz- und Phasenkontrastausstattung	Zeiss (Oberkochen)
Mikrotom	1512	Leitz (Bensheim)
Mikrowelle	Micromat	AEG (Stockholm, Schweden)
N_2-Flaschen	EG-Nr 231-783-9	MTI Industriegase (Neu-Ulm)
Netzgerät	P25	Biometra (Göttingen)
PCR-Gerät	Gene Amp PCR System 2400 und DNA-Cycler 480	Perkin Elmer (Weiterstadt)
pH-Meter	CG837	Schott (Mainz)
Phospho-Imager (Bio-Imaging-System)	Fujix BAS 1000 und BAS 1500	Fuji (Düsseldorf)
Phosphoimaging Hypercasette		Amersham (Braunschweig)
Pipetten	2er; 10er; 20er; 200er; 1000er	Gilson (Middleton, USA)
Proteinelektrophorese-und Tankblotsystem	Trans-Blot Protean II,	Biorad (München)
Puller (f. Injektionsnadeln)	Flaming, Brown Micropipette Puller Modell P-97	Sulter Instrument Co (Novato, USA)

Schüttler (Rotat.)	Rocky	Fröbel Labortechnik (Lindau)
Sequenziergerät	ABI PRISM 377	Applied Biosystems Inc. (Weiterstadt)
Screen (Phosphoimager)	Fuji BAS III S	Fuji (Düsseldorf)
Software (Agarosegele)	Bioprofil V4.6	Vilbert Lourmat, (Marne La Vallée, Frankreich)
Software (Sequenzer)	ABI PRISM	Applied Biosystems Inc. (Weiterstadt)
Software (Phosphoimager)	MacBas 3.0	Fuji (Düsseldorf)
Spannungsgerät	200/2,0	Biorad (München)
	ST 3002	Life (Eggenstein)
Spektralphotometer	Lamda Bio	Perkin-Elmer (Weiterstadt)
Tischzentrifuge	5415 D	Eppendorf (Hamburg)
UV-Tisch	UV-Transilluminator 312 nm	Bachofer (Reutlingen)
Schüttler (Bakterien)	Certomat	B. Braun (Melsungen)
Szintillationszähler	LS 1701	Beckman (Krefeld)
Vibratom	Serie 1000	Technical Products Internat. (St. Louis, USA)
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc. (New York, USA)
Waage	PE360	Mettler Toledo (Giessen)
Feinwaage	Explorer	Ohaus (Pine Brook, USA)
Wasserbäder		Köttermann (Uetze/Hänigsen)
Zentrifugen	RC5B, SS34- und GSA-Rotor	Sorvall Du Pont (Bad Homburg)
	Biofuge Primo R, 15, 15R	Heraeus Instruments GmbH (Hanau)
	Megafuge 1.0R Rotor 2705	Heraeus Instruments GmbH (Hanau)

Tabelle 1: Aufstellung der verwendeten Geräte inklusive Modelnamen und Herstellerangaben

2.1.2 Reagenzien, Lösungen und Radioaktivität

Die aufgeführten Reagenzien wurden, sofern nicht anders beschrieben, in p.a. Qualität von den angegebenen Firmen bezogen.

Reagenzien	**Firmen (Sitz)**
Acrylamid-Bis (29:1) 30% (w/v)	Serva (Heidelberg)
Agar	Amersham Life Science (Braunschweig)
Agarose	Gibco BRL (Eggenstein)
Chorionogonadotropin, human (β-HCG)	Schering (Berlin)
BCIP (X-phosphat/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate)	Roche (Basel, Schweiz)
BM-Purple AP Substrat (präzipitiert)	Roche (Basel, Schweiz)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (München)
Cysteinhydrochlorid	Bender und Hohbein (Ulm)
Dimethylpyrocarbonat (DMPC)	Sigma-Aldrich (München)
1,4-Dithio-DL-threitol (DTT)	Gibco BRL (Eggenstein)
Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich (München)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (München)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck (Darmstadt)

Ethylenglycol-bis-(β-aminoethylether)-N,N,N´,N´-Tetraessigsäure (EGTA)	Merck (Darmstadt)
Fast Red Tablets	Roche (Basel, Schweiz)
Ficoll 400	Amersham Life Science (Braunschweig)
Formamid, deionisiert	Roth (Karlsruhe)
Glycerin	Sigma-Aldrich (München)
Hefeextrakt	Amersham Life Science (Braunschweig)
Heparin (Heparin Sodium)	Serva (Heidelberg)
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-ethansulfonsäure (HEPES)	Serva (Heidelberg)
d-Luziferin	Promega (Heidelberg)
2-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich (München)
Natriumacetat	Sigma-Aldrich (München)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
NBT (4-Nitro blue tetrazolium chloride)	Roche (Basel, Schweiz)
Polyethylenglycol 6000 (PEG 6000)	Serva (Heidelberg)
Pepton 40	Difco (Hamburg)
Phenol	Roth (Karlsruhe)
Polyvinylpyrrolidon (PVPP)	Fluka (Buchs, Schweiz)
Random Hexamer Primer	Amersham Life Science (Braunschweig)
Radioaktivität: ^{32}P-markiertes dCTP und ^{35}S-Methionin	Amersham Life Science (Braunschweig)
Rubidiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Salzsäure	Bender und Hohbein (Ulm)
Torula-RNA	Sigma-Aldrich (München)
Triethanolamin	Sigma-Aldrich (München)
Triethylammoniumacetat	Sigma-Aldrich (München)
Triton X-100	Serva (Heidelberg)
Tween 20 (Polyethylenorbitanmonolaurat)	Sigma-Aldrich (München)
Yeast-RNA	Roche (Basel, Schweiz)

Tabelle 2: Aufstellung der verwendeten Reagenzien, Chemikalien und Radioaktivität

Alle weiteren Reagenzien, die in dieser Tabelle (Tab. 2) nicht aufgeführt werden, wurden von den Firmen Bender und Hohbein (Ulm), Bio-Rad (München), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg) oder Sigma-Aldrich (München) bezogen.

2.1.3 Sonstige Gebrauchsartikel und -gegenstände

Artikel	**Hersteller**
Alufolie	Gut & Billig
Einwegspritzen	HenkeSassWolf GmbH (Tuttlingen)
Falcongefäße	Corning (Wiesbaden)

Whatmanpapier/ 3MM Filterpapier	Schleicher & Schuell (Dassel)
Glasmaterialien: Flaschen, Pasteurpipetten, Erlenmeyerkolben usw.	Brand, Schott
Haushaltsfolie	Gut & Billig
Kanülen	Braun (Melsungen)
Kunststoff-Einwegmaterial: Spitzen, Pipetten, Reaktionsgefäße, Petrischalen usw.	Eppendorf, Brand, Greiner, Sarstedt
Nitrozellulose MembranHybond	Schleicher & Schuell (Dassel)
Objektträger und Deckgläschen	Knittel Glasbearbeitungs GmbH, (Braunschweig)
Quarz-Küvette	Hellma (Essen)
Platten 6-, 12- und 24-well	Costar (N.Y., USA)
Parafilm	Pechiney (Chicago, USA)
Dumont Pinzetten	Merck (Darmstadt)
Pipettenspitzen	Multimed Wicker GmbH (Kirchheim/Teck)
Röntgenfilm XO-Mat XAR 5	Kodak AG (Stuttgart)
Sterilfilter Millex-GS 0,22 µm und 0,45 µm Porengröße	Millipore (Eschborn)
Weichplastikzentrifugenröhrchen	Beckmann (München)
Zentrifugenröhrchen 15 und 50 ml	Falcon (Heidelberg)

Tabelle 3: Aufstellung weiterer verwendeter Gebrauchsartikel und Gegenstände

2.2. Verwendete Software für Datenbankanalysen, zur Protein- und Nukleinsäureanalyse

Für theoretische Untersuchungen und Vergleiche von DNA- und Proteinsequenzen, sowie zur Erstellung von Verwandtschaftsanalysen und genomischen Recherchen im Internet wurden die folgenden Programme und Internetseiten herangezogen (Tab. 4).

Verwendete Software	**Analysemethoden**
NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)	Genomische Analysen und Vergleiche
	Proteinsuche
	BLAST- und EST-Analysen
ENSEMBL (http://www. ensembl.org/index.html)	Genomische Analysen und Vergleiche
	Proteinsuche
	BLAST- und EST-Analysen
Xenbase (http://www.xenbase.org/)	Genomische Analysen und Vergleiche
	Proteinsuche
	BLAST- und EST-Analysen
MacMolly Tetra (Mac Molly ® Tetra Version 3.9 © Soft-Gene-GmbH; Berlin)	Bestimmung des offenen Leserahmens
	Proteinsequenzbestimmung
	Berechnung des Proteingewicht
	Alignment von DNA-Sequenzen
	Alignment von Protein-Sequenzen
CLUSTALW (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)	Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen

Tabelle 4: Aufstellung der verwendeten Programme und Internetseiten

2.3. Antikörper, Enzyme und Hormone

2.3.1 Antikörper

Unter Verwendung eines synthetischen Peptides mit der Sequenz HKNDLFPQTVPHGMA, aus dem C-terminalem Bereich des Oct25 Proteins wurde von der Firma Davids Biotechnologies ein Kaninchen immunisiert. Der dabei generierte Oct25 Peptidantikörper kam in diversen Immunoblots für die Oct25 Detektion in einer Verdünnung von 1:200 für Westernblots und 1:10 000 für Koimmunopräzipitationen zum Einsatz.

Weitere für die Immunoblots herangezogene primäre Antikörper, die gewerblich erhältlich sind, und deren Verdünnung sind der Tabelle 5 zu entnehmen. In Tabelle 6 finden sich die eingesetzten sekundären Antikörper.

Primäre Antikörper	Firma	Verdünnung
Mouse anti Myc-tag	Santa Cruz	1:2000 (IP) 1:10000 (KoIP)
Mouse anti-Flag M5 (monoklonal)	Sigma	1:10000
Mouse anti-Flag M2 (monoklonal)	Sigma	1:10000 für KoIP
Mouse anti-HA MMS-101P (monoklonal)	BaBCo	1:1000
Rabbit anti-GFP	Santa Cruz	1:10000 (IP)
Anti-Digoxigenin-AP, FAB-Fragment AP, Alkalische Phosphatase-gekoppelt	Roche	1:2000
Anti-Fluorescein-AP, FAB-Fragment	Roche	bei Doppel-WM

Tabelle 5: Verwendete primäre Antikörper, deren Hersteller und eingesetzte Verdünnung

Sekundäre Antikörper	Firma	Verdünnung
Peroxidase-gekoppelter Ziege anti-rabbit IgG	Amersham	1:10000
Peroxidase-gekoppelter Esel anti-mouse IgG	Amersham	1:10000
Peroxidase-gekoppelter Schaf anti-mouse IgG	Sigma	1:10000

Tabelle 6: Verwendete sekundäre Antikörper, deren Hersteller und eingesetzte Verdünnung

2.3.2 Enzyme

Alle eingesetzten Enzyme wurden von den folgenden Firmen bezogen:

DNaseI RNase-frei (Boehringer, Mannheim)
Klenow Fragment (Boehringer, Mannheim)
Phusion Polymerase (Finnzymes, Finnland; Espoo)
Proteinase K (Merck, Darmstadt)
Restriktionsendonukleasen (Life Technologies, Karlsruhe; Fermentas, Vilnius, Litauen; Gibco BRL, Eggenstein; New England Biolabs)
RNasen (Boehringer, Mannheim; Qiagen, Hilden)
SP6, T3, T7 RNA-Polymerasen (Boehringer, Mannheim)
Taq-Polymerase (Abgene)
T4 DNA Ligase (Life Technologies, Karlsruhe)

2.3.3 Hormone

Humanes Choriongonatropin (Sigma, München)

2.3.4 Antibiotika

Tetracyclin: 5 mg/ml in Ethanol, aliquotiert und bei -70°C gelagert. Die eingesetzte Endkonzentration beträgt 10 µg/ml.

Ampicillin: 100 mg/ml in autoklaviertem Wasser, aliquotiert und bei -70°C gelagert. Die eingesetzte Endkonzentration beträgt 100 µg/ml.

2.4. Kits

Alle zur Durchführung der beschriebenen Experimente benötigten Kits (Firmen; Sitz) werden im Folgenden aufgelistet.

DIG RNA Labeling Mix 10x (Roche, Basel, Schweiz)
DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham, Braunschweig)
ECL Western Blotting Detection Reagent (Amersham, Braunschweig)
Endofree Plasmid Kit (Qiagen, Hilden)
GeneRacer Kit (Invitrogen, Karlsruhe)
mMessage machine Kit (SP6; T3; T7) (Ambion, Austin, USA)
MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)
PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)
Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden)
Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden)
QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)
Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)
Qiaquick Spin PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)
Qiazol Lysis Reagent (Qiagen, Hilden)
Random-Prime-Labelling Kit (Gibco, Eggenstein)
Revert AidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Vilnius, Litauen)
RNeasy-RNA Purifikation Kit (Qiagen, Hilden)
Sp6-TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega, Heidelberg)
Superscript II RT (Invitrogen, Karlsruhe)
Thermisequenase Kit (Amersham, Braunschweig)

2.5 Nukleinsäuren

2.5.1 Vektoren

pBluescript II KS+ (Stratagene, Heidelberg)
pCS2+ (Rupp et al., 1994)
pCS2+4Hamcs (M. Taira, unveröffentlichte Daten)
pCS2+flag
pCS2+Myc tag (pCS2+MT, Rupp et al., 1994)
p-Drive Cloning Vector (Qiagen, Hilden)

pGEX-4T1 (Amersham)
pGL3-Basic (Promega, Heidelberg)
pGL4.10[*luc*2] (Promega, Heidelberg)
pGL4.18[*luc2P*/Neo] (Promega, Heidelberg)
pGL4.23[*luc*2/minP] (Promega, Heidelberg)
pRSET (Invitrogen)

2.5.2 cDNA-Klone

Soweit nicht anders aufgeführt entstammen die cDNA Klone der Plasmid-Bibliotheken der AG Prof. Knöchel (Abteilung Biochemie, Universität Ulm).

2.5.3 Oligonukleotide und Morpholino Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Thermo Scientific (Ulm) bezogen. Eine Aufzählung aller bei den Klonierungen eingesetzten Primer erfolgte nicht zusätzlich.
Die sowohl für die klassischen RT-PCRs als auch für die real time RT-PCRs verwendeten Primer können den Veröffentlichungen Cao et al. (2006), Cao et al. (2007), Cao et al. (2008) und Siegel et al. (2009) entnommen werden.
Für die Sequenzierungsreaktionen wurden die Sequenzierprimer SP6 5´-CCCAAGCTTGATTTAGGTGA-3´, T7 5´-TATAGTGAGTCGTATTAC-3´ und T3 5´-ATTAACCCTCACTAAAG-3´ herangezogen.

2.5.3.1 Primer für ChIP (Chromatin-Immunopräzipitation)

Die für die Amplifikation der Promotorregionen in der Chromatin-Immunopräzipitation verwendeten Primer können der Tabelle 7 entnommen werden.

Promotor	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
Xnr1	5'-TTAGCATGCAGTTTGCTAGGG-3' (-419/ -399)	5'-GAGCTGCCATTGCTCTTCAC-3' (-100/ -119)
Siamois	5'-GTGTAAGTAAGGGACTTTGAAGTCTTG-3' (-370/ -344)	5'-GGTGTGTCCAGGATGTGTTTTG-3' (-51/ -72)
Gsc-A	5'-CCTGTGGATTCCCTGTACCA-3' (-1089/ -1070)	5'-GGCCTGGGATAATTTTTGGA-3' (-837/ -856)
Gsc-B	5'-TAATGTCCCATCACGCTCAA-3' (-285/ -266)	5'-AAGCACAGCAGCTCCACTCT-3' (-54/ -73)
Mix2	5'-GCCACAGTTCTGACAAAGCA-3' (-318/ -299)	5'-CTCAGACCTGGCCTACAGGA-3' (-74/ -93)

Tabelle 7: In Chromatin-Immunopräzipitationen verwendete Primer

2.5.3.2 Morpholino *antisense* Oligonukleotide

Die Morpholino *antisense* Oligonukleotide (MO) wurden in lyophilisiertem Zustand von der Firma Gene Tools (LLC, Philomath, USA) bezogen. Die Aufnahme der Morpholinos erfolgte

im RNase-freiem H_2O in einer Konzentration von 10 ng/nl. Unmittelbar nach der Aufnahme in H_2O wurden die Morpholinos aliquotiert und bei -70°C gelagert. Jeweils vor den Mikroinjektionen wurden die Morpholinos mit H_2O (RNase-frei) auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt.

Im Folgenden findet sich eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Morpholino *antisense* Oligonukleotide:

Oct25MO	5'- TTGGGAAGGGCTGTTGGCTGTACAT -3'
Oct60MOa1	5'- TCCATCTCCAGCACTTGCTCAGGCC -3'
Oct60MOb1	5'- CCATTTCCAACACTTGGTCCCGCCC -3'
XDppaMO	5'- GAGTCTTGGCTCGTCGTTTGGGCAT -3'
ctrlMO	5'- CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA -3'.

2.6. Organismen

2.6.1 Bakterienstämme

Stamm Genotyp

Escherichia coli Xl 1 blue (Bullock et al., 1987)

Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F´proAB lacqZDM15 Tn10 (tetr)]c

Escherichia coli BL21 (DE3) (Studier et al., 1990)

Genotyp: F- ompT gal [dcm][Ion] hsd SB (rB-mB); DE 3 (l Prophage mit T7 RNA Polymerasegen)

2.6.2 Versuchstiere

Die verwendeten Frösche der Gattung *Xenopus laevis* wurden von der Firmen Nasco (Wisconsin, USA) oder Xenopus express (Vernassal, Frankreich) bezogen. Die Haltung der Versuchstiere wird vom Tierforschungszentrum Oberberghof, Universität Ulm übernommen.

2.7. Methoden

2.7.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.7.1.1 Arbeiten mit DNA

2.7.1.1.1. Manuelle Aufreinigung von DNA

2.7.1.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien mittels Telt-(LiCl)-Methode

Die Telt-Methode oder auch LiCl-Methode genannt (Wilimzig, 1985) ist eine effiziente Methode zur Aufreinigung kleinerer DNA-Mengen. Diese können für Testrestriktionen, Umklonierungen, sowie für Sequenzierungen oder ähnliches herangezogen werden.

Teltlösung:

62,5 mM EDTA
50 mM Tris-HCl pH 7,5
0,4 % (v/v) Triton X-100 1 mM EDTA
2,5 M LiCl

TE-Puffer: (10 mM Tris-HCl pH 8,0/1 mM EDTA)

Die mit der zu untersuchenden DNA transformierten Bakterien werden mit einer Pipettenspitze von der Ampicillin-Selektivplatte in jeweils 3 ml Medium überführt und über Nacht angezogen. Am folgenden Tag werden 1,5 ml der Kultur in einem Eppendorfgefäß für 1 min bei 10.000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Bakterien, die sich im Pellet befinden, werden in einer Mischung aus 150 µl Telt- und 15 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml in H_2O) durch vortexen resuspensiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Proben auf 95°C im Wasserbad für 2 min erhitzt und 30 min auf Eis gestellt. Durch 15-minütige Zentrifugation bei 12000 oder 13000 g und 4°C werden die Zelltrümmer abzentrifugiert. Diese können mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers oder einer Pipettenspitze aus dem Eppendorfgefäß entfernt werden. Die DNA wird durch die Zugabe von 150 µl Isopropanol und einer Zentrifugation über 10 min bei 12000 o. 13000 g ausgefällt. Das Auswaschen der Salze wird mit 500 µl 70% Ethanol ermöglicht. Zum Abschluss wird die DNA getrocknet und in 30-40 µl Wasser oder TE-Puffer gelöst. Eine Entfernung der mit aufgereinigten RNA kann bei Bedarf durch Zugabe von 2 µl RNase-Stammlösung (200 µg/ml in H_2O) erfolgen.

2.7.1.1.1.2. Aufreinigungen von DNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion

Mit Hilfe dieser Methode wurde genomische DNA aus Embryonen aufgereinigt. Bei der Durchführung der Phenol/Chloroform-Extraktion (Kirby, 1956) wird zu einem Volumen einer wässrigen DNA-Lösung ein Volumen einer Mischung aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol pipettiert (Mengenverhältnis 25:24:1). Einem intensiven Mischen mit Hilfe des Vortexers folgt eine dreiminütige Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 13000 rpm. Während dieser Zeit stellt sich in der Emulsion eine Phasentrennung ein. In der unteren Phase, der Phenol/Chloroform-Phase, und in der Interphase befinden sich die durch Phenol und Chloroform denaturierten Proteine, Membranbestandteile und organisch lösliche Moleküle. Der zugegebene Isoamylalkohol verhindert ein zu starkes Aufschäumen der Interphase. Die obere wässrige Phase enthält die DNA, die nach der Zentrifugation vorsichtig abgenommen wird. Zur Entfernung vorhandener Phenolreste werden eine oder mehrere weitere Aufreinigungen über Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) vorgenommen und anschließend die obere, wässrige Phase in ein neues Röhrchen überführt. Eine abschließende Fällungsreaktion der DNA mit Ethanol entfernt die restlichen verbliebenen Spuren von Phenol und Chloroform.

2.7.1.1.1.3 Aufreinigungen über Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese (Thorne et al., 1966; Helling et al., 1974; McDonell et al., 1976; Johnson und Grossmann, 1977; Southern et al., 1979) können DNA-Fragmente ihrer Größe nach durch Anlegen einer elektrischen Spannung aufgetrennt werden. In der Gelkammer liegt ein elektrisches Feld vor, in dem sich die DNA aufgrund der negativen Ladungen ihrer Phosphatgruppen zur Anode hin bewegt. Folglich ist es möglich DNA-Fragmenten d.h. linearisierte DNA unterschiedlicher Größe in einer Agarosematrix voneinander zu trennen. Die Agarosekonzentration kann in Abhängigkeit von der zu erwartenden Fragmentlänge zwischen 0,8 und 3% (w/v) gewählt werden. Eine Auftrennung von kleinen DNA Fragmenten erfolgt durch Agarosegele mit größerer Agarosekonzentration, was eine dichtere Gelmatrix zur Folge hat. Bei großen DNA-Fragmenten wird die Konzentration der Agarose reduziert wodurch die Gelmatrix ein Netzwerk mit größeren Poren aufweist. Durch Aufkochen wird die Agarose in 1x TAE-Puffer (50x TAE: 2 M Tris, pH 8,0; 1 M Eisessig; 50 mM EDTA) gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wird der gelösten Agarose Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben und die Mischung anschließend in die Gelapparatur gegossen. Das Gel wird nachdem es vollständig erkaltet ist mit 1x TAE überschichtet und die zu untersuchenden Proben, die zur einfacheren Lokalisation und zur Erhöhung der Dichte mit

1/10 Volumen Ladungspuffer (0,02% (w/v) Bromphenolblau/ 0,02% (w/v) Xylenxyanol, 40% Saccharose in H_2O) gemischt wurden, werden in die Taschen des Gels aufgetragen. An die mit TAE gefüllte und das Agarosegel enthaltene Elektrophoresekammer wird anschließend eine konstante Stromstärke zwischen 20 und 200 mA angelegt. Die DNA kann anschließend unter UV-Licht bei 302 nm sichtbar gemacht und die gewünschten Fragmente ausgeschnitten werden (UV-Tisch), da das zugegebene Ethidiumbromid während des Laufes in die DNA interkaliert. Die Größenzuordnung der DNA-Fragmente erfolgt durch den Vergleich ihrer Laufstrecken mit den Banden von definierten DNA-Standards, 1 kb und 100 bp Leitern von Life Technologies (Karlsruhe) und GeneRuler von Fermentas (Vilnius, Litauen). Um die DNA aus dem Agarose-Block zu extrahieren wird der Qiaquick Gel Extraction Kit, der MinElute Qiaquick Gel Extraction Kit oder der QIAEX-II Isolierungs Kit (alle drei: Qiagen, Hilden) gemäß dem Protokoll des Herstellers (www.qiagen.de) angewendet.

2.7.1.1.2 Aufreinigung der DNA mittels diverser Kits

2.7.1.1.2.1 Plasmidisolation aus Bakterien mit Qiagen Plasmid Midi/Mini Kit

Handelt es sich um ein Promotorkonstrukt, das in die Embryonen injiziert werden soll, so wird für die Durchführung das Endofree Plasmid Buffer Set von der Firma Qiagen verwendet. Falls dies nicht der Fall ist und es sich nur um ein Expressionsplasmid handelt, werden die nicht-Endotoxinfreien Puffer (Qiagen) eingesetzt. Für die Isolation der Plasmide werden die Bakterien mit Hilfe einer alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) aufgeschlossen. Dafür werden sie in einem Lysepuffer inkubiert, der zumeist NaOH und SDS enthält. In Folge des niedrigen pH-Wertes und des enthaltenen Detergenz werden sowohl die chromosomale DNA, die Plasmid-DNA als auch die bakteriellen Proteine denaturiert. Die kovalent geschlossene Plasmid-DNA wird durch die Zugabe eines sauren Kaliumacetatpuffers, was eine Neutralisierung der Lösung bewirkt, renaturiert. Im Gegensatz dazu werden die hochmolekulare, chromosomale DNA und die Proteine in einem Komplex mit Kalium und SDS ausgefällt. Die Plasmid-DNA kann unter Niedrigsalzbedingungen an die Ionenaustauscher-Matrix einer Säule binden, wohingegen die ausgefällte DNA und die Proteine in zwei Waschschritten herausgefiltert werden. Nach Elution der Plasmid-DNA von der Affinitätssäule kann die im Eluat enthaltene Plasmid-DNA durch Isopropanolzugabe und anschließender Zentrifugation präzipitiert werden. Eine höhere Reinheit kann auch hier mittels Ethanolfällung erreicht werden. Das Präzipitat wird entweder in H_2O oder in TE-Puffer resuspensiert und kann zur Bestimmung der Konzentration photometrisch vermessen werden. Die Durchführung folgt exakt den Anweisungen des Herstellers.

2.7.1.1.2.2 Aufreinigungen von DNA aus wässrigen Lösungen mittels des Qiagen PCR Purification Kit

Der Qiagen PCR Purification Kit wird verwendet um Plasmide, die als Template für *in vitro* Transkriptionen eingesetzt werden, nach einer Restriktionsspaltung aufzureinigen. Auch bei diesem Kit erfolgt die Aufreinigung über eine Qiagen DNA-Affinitätssäule. Dem Protokoll des Herstellers (www.qiagen.de) wurde Folge geleistet. Die Elution der DNA erfolgte mit 30 µl RNase-freiem Wasser.

2.7.1.1.3 Fällungsreaktionen der DNA

2.7.1.1.3.1 Ethanolfällung von DNA aus wässrigen Lösungen

Die Aufreinigung einer DNA mit Hilfe einer Ethanolfällung läuft über einem Lösungsmittelentzuges der DNA durch Ethanol ab (Geiduschek und Gray, 1956). Parallel dazu wird sich dem Effekt des Aussalzens bedient, bei dem es aufgrund einer Zugabe von Kationen zu einer Ladungsneutralisierung der negativen Ladungen der DNA kommt. Dabei verlieren die DNA-Moleküle ihre Hydrathülle und bildet eine kompakte Packung (Eickbush und Mondriakis, 1978), wodurch die DNA ausfällt.

Für die Durchführung wird der DNA-Lösung ein Zehntel des Volumens an 3 M Natriumacetat (pH 5,2) oder Ammoniumacetat zugegeben. Handelt es sich bereits um eine Lösung mit hohem Salzgehalt kann dieser erste Schritt unterbleiben. Im Anschluss folgt die Zugabe von 3 Volumina des jetzigen Lösungs-Volumens absoluten (oder 96-prozentigen) Ethanols. Für den Fall, dass mit einer hohen Konzentration an DNA zu rechnen ist, kann auch mit geringeren Ethanol-Mengen (2- bis 2,5-faches Volumen) eine effiziente Fällung erreicht werden. Nach Zugabe des Ethanols wird die Lösung gemischt und für ca. 30 Minuten bei 4°C oder 20 Minuten bei -20°C gefällt. Nach einer Zentrifugation für 15 bis 30 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C in der Tischzentrifuge liegt die DNA im Sediment vor und der Überstand wird abgenommen. Die DNA kann durch die Zugabe von 1 ml 70% Ethanol, kräftigem Mischens und drei- bis fünfminütiger Zentrifugation von eventuell noch enthaltenen Salz- oder Phenolresten gereinigt werden. Nach dem Entfernen des Überstandes wird das DNA-Pellet getrocknet und in Puffer oder H_2O aufgenommen.

2.7.1.1.3.2 Isopropanolfällung von DNA aus wässrigen Lösungen

Das Prinzip der Isopropanolfällung ist analog dem der Ethanolfällung. Zur Fällung der DNA

werden allerdings nur 0,7 Volumina Isopropanol zugegeben. Verursacht durch die geringe Flüchtigkeit des Isopropanols ist das Pellet weniger fest und durchsichtig. Außerdem werden weniger Salze ausgefällt. Es ist daher ratsam zum Abschluss der Isopropanolfällung stets einen Waschschritt der DNA mit 70% Ethanol (siehe oben) durchzuführen.

2.7.1.1.4 Konzentrationsbestimmungen von wässrigen Nukleinsäurelösungen

Nukleinsäuren haben ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm und lassen sich auf Grund dieser Tatsache photometrisch quantifizieren Die Konzentration und Reinheit von wässrigen DNA- und RNA-Lösungen werden durch Messungen der Absorptionswerte der jeweiligen Lösungen bei zwei verschiedenen Wellenlängen (260 und 280 nm) in einem Photometer bestimmt. Der Messpunkt bei 280 nm entspricht dem Absorptionsmaximum von Proteinen, die in den Nukleinsäurelösungen enthalten sein könnten. Die Berechnung der Konzentration erfolgt nach dem Lambert-Beerschen Gesetz. Der Quotient aus der Absorption beider Wellenlängen A_{260}/A_{280} dient dabei zur Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäurelösung. Dieser Wert sollte bei reinen DNA bzw. RNA-Lösungen etwa 1,8 bis 2,0 betragen.

2.7.1.1.5 Enzymatische Modifikation von DNA zu Klonierungszwecken

Als Klonierung wird die Insertion einer bestimmten DNA-Sequenz in einen Vektor bezeichnet. Der Vektor selbst kann nach Transformation in Bakterien vermehrt werden. Unter Verwendung von Restriktionsenzymen und Ligasen können verschiedene Elemente miteinander kombiniert und mittels PCR können Mutationen künstlich erzeugt werden.

2.7.1.1.5.1 Restriktionsspaltungen

Restriktionsendonukleasen gehören zu den bakteriellen Enzymen, die DNA-Sequenzen spezifisch spalten, indem sie die Phosphodiester-Bindungen doppelsträngiger DNA an spezifischen Basensequenzen schneiden. Die Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen in der Regel palindrome Sequenzen. Es gibt eine Vielzahl verschiedener Restriktionsendonukleasen, die jeweils bestimmte Erkennungssequenzen haben (Roberts, 1985). Je nach Enzym entstehen entweder glatte DNA Enden ("blunt ends") oder 5´- bzw. 3´-überhängende Enden ("sticky ends"). Die Reaktionen finden in einem Puffer mit definierter Ionenkonzentration, definiertem pH-Wert und Temperatur in Ansätzen von 20-50 µl statt. Es muss darauf geachtet werden, dass die eingesetzte DNA frei von Kontaminationen wie hohen Salzkonzentrationen, Komplexbildnern wie z.B. EDTA oder organischen Lösungsmitteln

sind, um die Enzyme nicht zu inaktivieren oder ihre Aktivität herabzusetzen. Für eine Restriktionsspaltung von 1 µg DNA werden 5-10 U Enzym eingesetzt. Es ist allerdings darauf zu achten, dass die Enzymmenge 10% des Gesamtansatzvolumens nicht überschreitet, da das im Lagerungspuffer enthaltene Glycerin die Aktivität des Enzyms stört. Ebenso kann eine unspezifische Spaltung der DNA durch übermäßige Enzymzugabe, eine so genannte Staraktivität, stattfinden. Die optimalen Bedingungen werden mit dem vom Hersteller mitgelieferten Restriktionspuffer eingestellt. Bei Kontrollrestriktionsspaltungen, mit denen lediglich die erfolgreiche Ligation eines DNA-Fragments in den dafür vorgesehenen Vektor bestimmt werden soll, ist eine Inkubationszeit von 1,5-2 h ausreichend. Soll allerdings die DNA vollständig geschnitten sein, z.B. für den Einsatz in eine Klonierung, wird empfohlen, die Hydrolyse über Nacht zu inkubieren. Die Länge der jeweiligen Restriktionsprodukte wird mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.7.1.1.1.3) kontrolliert.

2.7.1.1.5.2 Dephosphorylierung linearer DNA am 5´-Ende

Bei linearisierten Vektoren, die nur mit einem Restriktionsenzym gespalten wurden, oder bei langen Fragmenten, die an beiden Seiten identische Restriktionsschnittstellen aufweisen, kann es ohne das Einsetzen neuer Fragmente zu einer Rezirkularisierung während der Ligation kommen. Um dies zu verhindern bzw. generell bei jeder Klonierung, wird mit Hilfe einer thermosensitiven Alkalischen Phosphatase (=Phosphomonoesterase, Fermentas) die Phosphatgruppe am 5´-Ende hydrolytisch abgespalten. Unmittelbar nach Durchführung der Restriktionsspaltung wird 1 µl Enzym (1 U/ µl) zugegeben und bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgt die Aufreinigung mittels Agarosegelelektrophorese.

2.7.1.1.5.3 Ligation

Um rekombinante DNA-Fragmente vermehren zu können oder um weitere Untersuchungen durchzuführen, werden diese in Plasmidvektoren kloniert (Dugaiczyk et al., 1975). Eine Ligation findet nur statt, sofern die durch Restriktionsspaltung erzeugten Enden der zu ligierenden Fragmente kompatibel sind. Die Klonierung von Taq-DNA-Polymerase synthetisierten PCR-Fragmenten stellt hierbei eine Ausnahme dar. Hierzu wird der PCR Cloning Kit der Firma Qiagen herangezogen. Taq-DNA-Polymerasen fügen an die 3´-Enden der neu synthetisierten DNA-Stränge zusätzliche Nukleotide an, wobei es sich meist um Adenosinbasen handelt. Der in linearisierter Form vorliegende p-Drive Vektor von Qiagen (www.qiagen.de) besitzt im Gegensatz dazu überhängende Thymidinbasen an den 3´-Enden, die mit den überhängenden Adenosinbasen eines PCR-Fragmentes hybridisieren können.

Somit wird die Ligationseffizienz erheblich gesteigert. Kolonien die im Besitz dieses Vektors sind, besitzen zusätzlich den Vorteil Blau-Weiß selektiert zu werden (siehe 2.7.3.1.4).
Bei der Verwendung der T4-DNA-Ligase wird für die Verknüpfung der offenen Enden Energie in Form von ATP benötigt. Dieses liegt entweder schon in Reaktionspuffer vor oder muss zuerst in diesem supplementiert werden.
Das Volumen für die Reaktion sollte so gering wie möglich gehalten und die Temperatur zwischen 14°C und 20°C gewählt werden. Die Art der Ligation, je nachdem ob „glatte" oder „überhängende" Enden (siehe 2.7.1.1.5.1) ligiert werden sollen, ist ausschlaggebend für die Länge der Reaktionszeit (zwischen 2-24 h). Allerdings gibt es auch Fast-Link Ligasen, wie den Rapid Ligation Kit (USB), die Ligationen bei Raumtemperatur und einer Reaktionsdauer von 5-10 min ermöglichen.
Zwischen 20 und 100 ng linearisierte Vektor-DNA wird mit einem 3- bis 10-fachen molaren Überschuss an Insert-DNA, dem entsprechenden Volumen des Ligase-Puffers und der Ligase gemäß den Angaben des Herstellers gemischt. Die optimalen Ligationsbedingungen sind den Angaben der jeweiligen Hersteller zu entnehmen.

2.7.1.1.6. Endständige Markierung mit Polynukleotidkinase

Unter Verwendung der Polynukleotidkinase können einzelsträngige oder DNA-Fragmente mit überhängender 5´-Phosphatgruppe radioaktiv markiert werden. Hierbei kommt es zu einem Austausch der Phosphatgruppe gegen ein radioaktives Phosphat ([γ-^{32}P]dATP).

Reaktionsansatz (20 µl) enthält folgende Komponenten:

2,0 µl 10xKinase-Puffer
1,5 µl T4 Polynukleotidkinase (10 U/µl)
5,0 µl [γ-^{32}P]dATP (5000 Ci/mmol) (=5 µCi)
5 pmol DNA-Fragment oder Oligonukleotid

Der Reaktionsansatz wird bei 37°C für 30 min inkubiert. Beim Vorliegen von einzelsträngigen Oligonukleotiden erfolgt ein so genanntes Annealing (Anlagerung), indem zuerst eine Erwärmung auf 80°C und anschließend ein langsames Abkühlen durchgeführt wird.
Die erhaltene DNA wird anschließend durch eine Acrylamidgelelektrophorese, die je nach Länge der Fragmente zwischen 6-12% Polyacrylamid enthält, von den einzelsträngigen DNA-Molekülen separiert und kann unter Anwendung der Autoradiographie identifiziert werden. Nach Ausschneiden der gewünschten Bande aus dem Gel, wird das Gelstück gewogen und zerkleinert. Nach einer Zugabe von 1-2 Volumina Diffusionspuffer (100-200 µl pro 100 mg

Gel; 0,5 M Ammoniumacetat, 10 mM Magnesiumacetat, 0,1% (v/v) SDS, 1 mM EDTA, pH 8,0), erfolgt eine Inkubation bei 50°C über eine Dauer von 30 min und eine einminütige Zentrifugation bei 15000 U/min. Um restliche Gelstücke zu entfernen wird der danach abgenommene Überstand durch eine mit Glaswolle versetzte Spitze gedrückt. Die weitere Aufreinigung wird nach Anleitung des QIAEX-II Kits (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Der erhaltenen Lösung werden 3-6 Volumen QX1 und 10 µl QIAEX-II Suspension zugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation, bei der alle 2 min ein Vortex-Schritt eingeschoben ist, wird die Probe 30 s zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Sediment wird zwei weiteren Waschschritten unterzogen, bei dem der Puffer PE zugegeben, gevortext und zentrifugiert wird. Das Sediment bzw. die DNA wird nach Abnahme des Überstands und Trocknen an der Luft in 20 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen.

2.7.1.1.7 PCR (Polymerase chain reaction)

Eine gezielte Vervielfältigung von definierten DNA-Fragmenten kann über das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase-chain-reaktion = PCR; Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1986) erreicht werden. Unter einem zyklischen Wechsel zwischen Aufschmelzen der DNA (Denaturierung), Anlagerung des Oligonukleotid-Primers (Annealen) und Amplifizierung das gewünschte Fragment (Elongation) wird DNA von einer hitzestabilen DNA-Polymerase exponentiell vermehrt. Die PCR dient auch dem Einfügen gezielter Mutationen oder Restriktionsstellen in die DNA unter Verwendung speziell ausgewählter Primer.

Die Bedingungen unter denen die PCRs ablaufen, werden für jedes zu amplifizierende DNA-Fragment neu bestimmt, da sie von der eingesetzten DNA-Polymerase, den Primern, der Länge des Amplikons sowie der vorhandenen Menge der zu amplifizierenden Matrix (Template) abhängig sind. Zur Vervielfältigung wurden diverse Polymerasen verwendet (Phusion DNA Polymerase, Finnzymes; Thermoprime Plus DNA Polymerase, Abgene). Durchgeführt wurden die PCRs nach Anleitung der einzelnen Produzenten der genannten Enzyme bzw. sind den Protokollen der Bücher „PCR1“, „PCR2“ aus der Practical Approach Serie (McPherson et al., 1991 und 1995) und der Kapitel Nukleinsäureanalytik aus Bioanalytik, F. Lottspeich/H. Zorbas, Heidelberg, Berlin, Spektrum, Akad. Verlag 1998) abgeleitet.

Im Anschluss findet sich ein Beispiel für einen PCR-Ansatz:

5 ng Template-DNA
1/10 Vol. 10x Reaktionspuffer
5 mM dNTP-Mix

10 pmol Primer 1
10 pmol Primer 2
3 mM $MgCl_2$
5 U Taq-Polymerase
auf 50 µl auffüllen mit H_2O und Überschichten mit Mineralöl

Da es sich bei den Polymerasen um Magnesium-abhängige Enzyme handelt, liegt entweder das $MgCl_2$ bereits im Reaktionspuffer vor oder muss dem Ansatz separat zugegeben werden. Die Geschwindigkeit der Amplifikation einer Taq-Polymerase liegt in der Regel bei ca. 1000 Nukleotiden pro Minute. Demzufolge können die benötigten Elongationszeiten aufgrund der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes berechnet werden. Eine Standard-PCR läuft folgendermaßen ab:

Denaturierung:	94°C	1	min	(Dauer hängt von der Länge der DNA ab)
Annealen der Primer:	53°C	1/2	min	(abhängig von Primerlänge und Nukleotid-Zusammensetzung zwischen 50°C und 65°C)
Elongation:	72°C	1/2	min	(richtet sich nach der Länge des Amplifikats)

Es werden je nach Template-Menge 25 bis 40 Zyklen, bestehend aus Denaturierung, Annealen und Elongation, durchgeführt. Anschließend wird der Ansatz für 10 min bei 72°C inkubiert. In dieser Zeit kann die DNA-Polymerase noch unvollständige DNA-Fragmente vervollständigen.

2.7.1.1.7.1 Primer Design und Testläufe

Um optimale PCRs ablaufen zu lassen, müssen die Primer gewisse Voraussetzungen erfüllen. Im Folgenden ist aufgezählt, auf was beim Design von Primern geachtet werden sollte:

1.) Die Auswahl spezifischer PCR-Primer erfolgt anhand der DNA-Sequenz des zu amplifizierenden bzw. des nachzuweisenden Gens
2.) Die Primer sollten eine Länge von mindestens 17 Oligonukleotiden besitzen.
3.) Beim Design sollte auf einen ausgeglichenen G/C zu A/T-Gehalt geachtet werden.
4.) Der Schmelzpunkt sollte zwischen 55° und 80° C liegen und für beide Primer möglichst identisch sein.
5.) Die Ausbildung von Sekundärstrukturen (z.B. Haarnadelstrukturen) sollte vermieden werden.
6.) Dimerbildung, entweder mit sich selbst oder mit den zweiten Primern sollten unterbunden werden.
7.) Am 3´-Ende soll eine Abfolge mehrerer G/C-Nukleotide möglichst vermieden werden, da eine erhöhte „mispriming“ Gefahr bestehen würde.
8.) Bestimmte Basenfolgen, wie PolyA oder lange G/C-Abschnitte, sollten nicht enthalten sein.

Die Berechnung der Schmelztemperatur (Tm) erfolgte nach der Formel

Tm = 4 x (G + C) + 2 x (A+T)

Die Anlagerungstemperatur der Primer wurde durch Abzug von 0-10°C von der Schmelztemperatur bestimmt. Sowohl die Primer für Klonierungen, als auch die für vergleichende RT-PCRs mittels Agarosegelen, werden per Hand ausgewählt. Beim Design der Primer für die semiquantitativen real time RT-PCRs mit Hilfe des LightCyclers wird das Primer Express™ Programm (Version 1.0) der Firma Applied Biosystems verwendet wobei die Länge der Produkte wurde zwischen 60-100 bp beträgt.

Zur Kontrolle der Primer für vergleichende RT-PCRs mittels Agarosegelen wird eine Standard-RT-PCR (s. 2.7.1.1.7.3) aus Gesamt-RNA bzw. eines Stadiums in dem bekannt ist, dass eine Expression des Gens nachweisbar ist, gefahren. Verwendet werden für nachfolgende Reaktionen nur solche, die nach 32 Zyklen eine ausreichende Menge an PCR-Produkt liefern, um im zweiprozentigen Agarosegel eine deutliche Bande erkennen zu lassen.

Die Verwendbarkeit der LightCycler-Primer wurde über Testläufe mit einer Verdünnungsreihe der cDNA eines Stadiums, in dem die Expression des zu untersuchenden Gens aktiv ist, kontrolliert. Befanden sich die Crossing-Points (CP) der einzelnen Verdünnungen bzw. deren negativen Logarithmen auf einer Geraden mit einer Steigung, die im Bereich um -3,3 (bedingt durch die Berechnungsvorschrift) lag, und einem Bestimmtheitsmaß größer/gleich 0,995, so konnten sie für eine Expressionskontrolle eingesetzt werden.

2.7.1.1.7.2 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR dient als Methode um eine große Zahl von Bakterienkolonien auf das Vorhandensein eines gewünschten Inserts hin zu überprüfen. Hierbei wird jeweils eine Kolonie mit einer Pipettenspitze angestochen und kurz in dem Reaktionsansatz einer Standard-PCR mit Primern aber ohne DNA-Matrize inkubiert. Positive Klone können zur Gewinnung der DNA über Nacht in einem Selektivmedium kultiviert und am darauf folgenden Tag aufgearbeitet werden.

2.7.1.1.7.3 RT-PCR Analysen

Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktionen (RT-PCR) werden zum Nachweis spezifischer mRNAs bzw. zum semiquantitativen Vergleich der Transkriptmenge spezifischer RNAs unterschiedlicher Proben (Injektionen, Stadien, Organe) als auch zur Synthese gewünschter cDNAs für weitere Analysen durchgeführt. Die mRNAs werden von RNA-abhängigen DNA-Polymerasen (Reverse Transkriptasen) als Matrizen herangezogen und synthetisieren komplementär dazu einen DNA-Strang (cDNA-Erststrang-Synthese). In einem

zweiten Schritt wird dieser von DNA-abhängigen Polymerasen wiederum als Matrize verwendet.

2.7.1.1.7.3.1 cDNA-Synthese

Die Reverse Transkriptase des murinen Moloney Leukämie-Virus, die gentechnisch so verändert wurde, dass sie keine RNase-Aktivität mehr aufweist, dient in dem eingesetzten RevertAid^{TM} First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) für die Umschreibung der RNA zu cDNA. Die RNA der Embryonen oder der Explantate wurde gemäß den Angaben des Herstellers in cDNA übersetzt. Je nach gewünschtem Produkt können neben Oligo dT-Primer auch genspezifische Primer oder Zufallsprimer (random Hexamerprimer) im Reaktionsansatz eingesetzt werden. Zur Negativkontrolle wurden Synthesereaktionen gefahren, in denen die Reverse Transkriptase durch RNase freies Wasser ersetzt wurde (RT-).

2.7.1.1.7.3.2 Vergleichende RT-PCR-Analysen über Agarosegele

Mit spezifischen Primern wird in Standard-PCRs selektiv ein cDNA-Fragment amplifiziert und auf einem Agarosegel analysiert. Die Bandenstärke im Agarosegel verhält sich proportional zur Transkriptmenge des amplifizierten Fragments, solange darauf geachtet wird, dass die Zyklenzahl der PCR nicht im Sättigungsbereich liegt. Zur Kontrolle dient die Amplifikation eines ubiquitär exprimierten Haushaltsgens, Histon 4 (H4) oder ODC. Anhand derer wird die Menge der einzusetzenden cDNA aller Proben abgeschätzt, da davon ausgegangen wird, dass die Expression der Kontrolle in allen Proben eines Stadiums identisch ist. Ebenfalls werden Negativkontrollen durchgeführt, bei denen einerseits der cDNA-Synthese-Ansatz ohne Reverse Transkriptase und andererseits ein Ansatz ohne cDNA stattfand, um eine Kontamination mit Fremd-DNA auszuschließen. Um eine maximale Vergleichbarkeit zu erreichen, wird grundsätzlich bei RT-PCRs mit einem Mastermix gearbeitet, der alle Komponenten bis auf die Matrize enthält.

2.7.1.1.7.3.3 Semiquantitative real time RT-PCR Analysen

Das Prinzip der real time RT-PCR entspricht dem der vergleichenden RT-PCR über Agarosegele. Allerdings ist die Effizienz und Sensibilität dieser Methode wesentlich höher, weshalb nur ein Zehntel der cDNA pro Reaktion eingesetzt werden muss. Zusätzlich sind ein Angleichen der einzusetzenden cDNA-Mengen anhand der Bandenstärke des Haushaltsgens, sowie ein Agarosegel zum Vergleich der Expressionsmengen nicht mehr nötig.

Die quantitative Expression von diversen Markergenen bzw. deren Veränderungen wurden mit dem LightCycler™ real time RT-PCR Gerät (Roche) durchgeführt. Die real time RT-PCR erfolgten nach Angaben des QuantiTect™ SYBR Green PCR Handbuches (Qiagen) in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die Reaktionen setzen sich zusammen aus 0,5 µl (0,5 µM) sowohl des 5´-, als auch des 3´-beginnenden Primers, 10 µl des QuantiTect™ SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) und 2 µl der 1:10 verdünnten cDNA. Die bei den LightCycler-Analysen verwendeten Primer und deren PCR-Bedingungen können den veröffentlichten Arbeiten entnommen werden.

Eventuelle Kontaminationen der verwendeten Reagenzien oder eine Verunreinigung der cDNAs mit genomischer DNA konnten ausgeschlossen werden, da Negativkontrollen mit Wasser oder der RT⁻-Probe anstelle der cDNA keine Amplifikationsprodukte lieferten.

Unter Benutzung der LightCycler™ Software Version 1.0 (Roche) wurden die Crossing Points (Zykluszahl, bei der die Amplifikation die Hälfte der log(logarithmischen)-Phase erreicht hat) während der log-linearen Phase der einzelnen Amplifikationen quantifiziert. Die Werte wurden auf das Expressionslevel des Referenzgenes *H4* (Histon4) bzw. auf *ODC* (*Ornithine Decarboxylase*), von denen eines von beiden in jedem Lauf ebenfalls amplifiziert wurde, normiert. Schließlich wurden die einzelnen Genexpressionen in Relation zu den nichtinjizierten Kontrollembryonen, Kappen oder äquatorialen Explantaten berechnet, deren Genexpression als jeweilige Basisexpression gesetzt wurde. Die Daten werden in Histogrammen mit relativen Einheiten präsentiert. Die Experimente unterlagen mindestens einer dreimaligen Wiederholung.

2.7.1.1.7.4 DNA-Sequenzierung nach Dideoxy-Kettenabbruchmethode

Die hier verwendete DNA-Sequenzierung basiert auf dem Prinzip des Kettenabbruches bzw. der kontrollierten Unterbrechung der DNA-Synthese (Sanger et al., 1977). Da DNA-Polymerasen für ihre Syntheseaktivität einen kurzen Abschnitt doppelsträngiger DNA benötigen, wird ein Primer zugegeben, der mit der DNA hybridisieren kann. Die einzelsträngige DNA dient auch hierbei als Matrize für die Synthese eines neuen Stranges. Der Unterschied zu einer Standard-PCR beruht darauf, dass neben der Zugabe der Desoxyribonukleotiden auch Didesoxyribonukleotide (ddNTPs), denen die Hydroxylgruppe am 3´-C-Atom des C5 Zuckers fehlt, in den Reaktionsansatz gegeben werden. Beim Einbau der ddNTPs anstelle der dNTPs in den neuen DNA-Strang wird das weitere Kettenwachstum unterbrochen, da keine neue Phosphodiesterbindung geknüpft werden kann. Daraus resultieren unterschiedlich lange neu synthetisierte DNA-Stränge, mit denen sich die

Basenabfolge nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung, dank der je nach Base unterschiedlich Fluoreszenz-markierten ddNTPs, ermitteln lässt. Die DNA-Fragmente werden mit einer Laserapparatur detektiert, wobei Längenunterschiede von einem Basenpaar aufgelöst werden können. Die Bestimmung der Nukleotidsequenzen wird auf einem ABI PRISM-377 DNA Sequencer durchgeführt. Der Reaktionsansatz mit dem Gesamtvolumen von 10 µl besteht aus:

300 - 500	ng	DNA
1	µl	Primer (2,5 pmol)
4	µl	Sequenzier-Premix
entsprechende		Wassermenge
10	µl	Gesamtvolumen

Die Durchführung des Cycle sequencing-Programms (20s 95°C; 15s 50°C; 1min 60°C; 25 Zyklen) findet in einem Perkin Elmer DNA-Cycler 480 statt. Zum Abschluss wird eine Ethanolfällung durchgeführt, die DNA in Formamid-Auftragpuffer aufgenommen und auf das Sequenziergel, einem Harnstoff-Polyacrylamidgel, mit dem sich Größenunterschiede von einem Basenpaar erkennen lassen, aufgetragen.

Pipettierschema für Harnstoff-Polyacrylamidgele:

Harnstoff (6M) (vakuumfiltriert)	18,0	g
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	7,5	ml
bidest. H_2O	23,0	ml

Diese Komponenten werden unter Rühren gemischt bis sich der Harnstoff vollständig gelöst hat. Anschließend wird eine Spatelspitze Ionenaustauscher (Serdolit) zugegeben und 15 min gemischt.

10 x TBE (vakuumfiltriert)	6	ml
TEMED	15	µl
10 % Ammoniumperoxisulfat (APS)	350	µl

Die Endkonzentration des Acrylamids im Gel beträgt 4,5%. Vor dem Auftragen der Proben wird das Polyacrylamidgel durch eine 30-minütige Vorelektrophorese äquilibriert.

2.7.1.1.8. Klonierungen

Die zur Herstellung der einzelnen Konstrukte, wie pCS2+Oct60, pCS2+Oct60MT, pCS2+VP16-Oct25, pCS2+EVE-Oct25, pCS2+VP16mcs, pCS2+EVEmcs, pGEX-4T1-FAST1, pGEX-4T1-XWBSCR11, pGEX-4T1-Smad2, pGL3-OctLuc8x, pCS2+XDppa2/4, pCS2+mutXDppa2/4, pCS2+XDppa2/4-EGFP, pCS2+mut-XDppa2/4-EGFP,

pCS2^{+}mDppa2 und pCS2^{+}mDppa4, sowie mehrere His-markierter Fusionskonstrukte im pRSET Vektor, Myc-markierter und Flag-markierter Fusionskonstrukte oder diverser Promotor-Reporterkonstrukte, durchgeführten Klonierungen sind in den Veröffentlichungen Cao et al. (2006), Cao et al. (2007), Cao et al. (2008) und Siegel et al. (2009) beschrieben.

2.7.1.2 Arbeiten mit RNA

RNA ist wesentlich instabiler als DNA und anfälliger gegenüber RNasen. Daher muss beim Arbeiten mit RNA auf höchste Sorgfalt und sterile Bedingungen geachtet werden. Alle Arbeitschritte wurden daher unter Benutzung von Handschuhen durchgeführt und nur RNase-Inhibitor DMPC/H_2O (1:1000 verdünnt) behandelte und autoklavierte Arbeitsmaterialien verwendet.

2.7.1.2.1. RNA-Isolation aus Embryonen

Die gesamte RNA aus Embryonen bzw. den geschnittenen Explantaten, die nach dem Absammeln in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert wurden, werden mit Hilfe des QiaZol Kits (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers extrahiert. Eventuell noch verbliebene DNA wurde anschließend durch eine 30-minütige DNase I Behandlung bei 37°C entfernt. Eine weitere gemäß dem Protokoll ablaufende Aufreinigung der RNA erfolgte über die Ionenaustauschersäulen des RNeasy Kits (Qiagen, Hilden). Abschließend wurde die RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -70°C gelagert.
Die Vermessung der Konzentration erfolgt im Spektralphotometer (siehe 2.7.1.1.4). Ebenfalls wird ein Aliquot auf einem Agarosegel aufgetragen, um die Qualität und Reinheit der RNA abzuschätzen.

2.7.1.2.2. *In vitro* Transkription von RNA

In Mikroinjektionsexperimenten oder in Whole Mount *in situ* Hybridisierungen werden synthetisch (*in vitro)* transkribierte RNAs verwendet. Für die Untersuchung ektopischer Expression in Mikroinjektionsexperimente wird Injektions-RNA in Richtung des Leserahmens (*sense*) und für die *in situ* Technik (siehe 2.7.5.9.1) werden Transkripte entgegen des Leserahmens (*antisense*) als Sonden eingesetzt. Die Injektions-RNAs benötigen einen Schutz gegen den zellinternen Abbau, weshalb die RNAs aus den Plasmidvektoren pCS2+ oder pSP64T3 transkribiert werden. Der pCS2+-Vektor enthält nach der multiplen Klonierungsstelle einen PolyA-Schwanz und das Plasmid pSP64T3 verleiht den Transkripten eine höhere Stabilität und Translationseffizienz, da Anteile des humanen *Globin* Gens mit

dem Insert zusammen transkribiert werden.

Zunächst wird die entsprechende Plasmid-DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert, über den PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und in RNase-freiem Wasser eluiert. Die Linearisierung erzeugt so genannte "Run-off" Transkripte, die bei der Transkription eine Steigerung der Ausbeute bewirken. In die Transkription für die Injektions-RNA, deren Durchführung sich an die Anleitung des Herstellers der mMessage machine Kits (SP6; T3; T7; Ambion, Austin, USA) hielt, werden 0,5-1,5 µg linearisierter DNA eingesetzt. Die Transkripte für die *in situ* Hybridisierung werden mit Hilfe der jeweils passenden DNA-abhängigen RNA-Polymerase unter Verwendung der DIG-RNA-Labeling Kits (SP6/T3/T7) der Firma Boehringer (Mannheim) synthetisiert. Bei der Herstellung der Sonden werden Digoxygenin oder Fluorescein markierte Nukleotide in die RNA eingebaut, wodurch eine Detektion der Transkripte über eine Antikörperfärbung gegen Digoxygenin oder Fluorescein und eine daran gekoppelte Farbreaktion (s. 2.7.5.9.1) möglich ist.

Die verwendeten Plasmide, die bei der Linearisierung der Plasmide eingesetzten Restriktionsenzyme sowie die jeweils verwendeten *in vitro* Transkriptionskits für die Herstellung der *sense* RNAs für Injektionsexperimente und *antisense* RNAs für Whole Mount *in situ* Hybridisierung können den Veröffentlichungen Cao et al. (2006), Cao et al. (2007), Cao et al. (2008) und Siegel et al. (2009) entnommen werden. Im Anschluss werden die DNA-Matrizen bei einer 15-minütigen Inkubation (37°C) mit DNase I abgebaut und die synthetisierten RNAs über der RNeasy Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Letztlich wird die RNA auf einem Agarosegel kontrolliert und die Konzentration photometrisch bestimmt.

2.7.2. Arbeiten mit Proteinen

2.7.2.1. *In vitro* Translation

Die Translation der Plasmide *in vitro* erfolgt mittels des TNT®T7/SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega; www.promega.com), deren Anweisungen exakt eingehalten werden. Die Bindungseffizienz eines Morpholinos d.h. dessen Fähigkeit die entsprechende Translation des Zielproteins zu unterdrücken, wurde unter Einsatz von 0,5 µg des Plasmids und 10 ng des Morpholinos kontrolliert. Die Proteine werden bei der Verwendung dieses Kits durch den Einbau von [^{35}S]-Methionin radioaktiv markiert und können nach der Auftrennung in einer SDS-PAGE mittels Autoradiographie oder einer Antikörperfärbung mit Hilfe eines Immunoblots sichtbar gemacht werden.

2.7.2.2 Induzierte Proteinexpression in Bakterien

Zuerst erfolgt die Klonierung des zu exprimierenden DNA-Bereichs. Für die EMSA-Analysen wurde das Fragment in einen die 6xHis-Markierung enthaltenden pRSET- und für die Pulldown-Untersuchungen in den eine GST(Glutathion S-Transferase)-Markierung enthaltenden pGEXT-1-Expressionsvektor integriert. Nach der Transformation des Plasmids in *E. coli* BL21 (DE3) (Stratagene) (Studier et al., 1990) werden 20 ml 2TY-Amp Vorkulturen bei 37°C und 260 U/min ü.N. herangezogen. Am nächsten Tag werden je 20 ml der Vorkultur in 2 x 200 ml frisches Nährmedium überführt und weiter kultiviert. Beim Erreichen einer OD_{600} (optischen Dichte) von 0,5 wird IPTG (Endkonzentration: 1mM) zugegeben, um die Proteinbiosynthese zu starten. Nach ca. 4 h wird die gesamte Kultur für 10 min bei 2600 U/min (5000 g) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment der Bakterien kann bis zur weiteren Aufreinigung bei -20°C gelagert werden.

2.7.2.3. Native Aufreinigung von His- und GST-markierten Fusionsproteinen

Das Bakteriensediment einer 400 ml Kultur wird in 10 ml Lysepuffer (50 mM NaH_2PO_4, pH 8,0; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol) resuspensiert. Es folgt eine 30-minütige Zentrifugation bei 10000 U/min (SS34-Rotor; 12 000 g) und 4°C und anschließend eine sechsmalige Ultraschallbehandlung für jeweils 10-15 s bei 40 W, sowie eine Zugabe von 1/10 10% Triton X-100 (Endkonzentration 1%).

Bei der Aufreinigung der His-markierten Proteine wird der Überstand nach der Zentrifugation in einem 15 ml Falcon-Gefäß mit 800 µl Nickel-Agarose (Qiagen, Hilden) gemischt und bei 4°C für 1,5 h vorsichtig geschwenkt. Die Nickel-Agarose wird mittels fünfminütiger Zentrifugation bei 6000 U/min und 4°C sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird die Agarose zweimal mit 10 ml Waschpuffer (50 mM NaH_2PO_4, pH 8,0; 500 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 0,1% (v/v) Triton X-100) durch erneutes Zentrifugieren und Abnehmen des Überstandes gewaschen. Das an der Nickel-Agarose gebundene Protein kann mit 500 µl Elutionspuffer I (50 mM NaH_2PO_4, pH 8,0; 300 mM NaCl; 100 mM Imidazol) und zweimal 500 µl Elutionspuffer II (50 mM NaH_2PO_4, pH 8,0; 300 mM NaCl; 500 mM Imidazol) eluiert werden.

Die im Zentrifugationsüberstand angereicherten GST-markierten Fusionsproteine wurden mit Hilfe der Glutathion-Sepharose (Amersham Bioscience) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Anschließend werden die drei dabei erhaltenen Fraktionen über Nacht in ca. 500 ml Dialysepuffer (50 mM Tris, pH 8,0; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 20% (v/v) Glycerin) bei 4°C dialysiert. Verunreinigungen werden auf einem SDS-Polyacrylamidgel überprüft und mittels

Bradford die Proteinmenge bestimmt. Die Aufbewahrung der Proteinlösung erfolgt in Aliquots bei -20°C.

2.7.2.4. Proteinbestimmung nach Bradford

Zuerst bedarf es der Herstellung der Farbreagenz, das generell dunkel gelagert werden sollte.

5x Bradfordlösung :
00,05 % Coomassie-Brillantblau G-250 (w/v)
25,00 % Ethanol
50,00 % konz. Phosphorsäure (H_3PO_4)

Das Gemisch wird mit Wasser aufgefüllt und filtriert. Unmittelbar vor Gebrauch wird die Farbreagenz fünffach verdünnt und erneut filtriert.
Bei der Bestimmung der Proteinkonzentration werden 10 µl Protein- bzw. Eichlösung (5-50 µg) mit 1 ml Bradfordreagenz gemischt. Nach 5 min wird bei 595 nm die Extinktion gegen eine Referenzprobe (10 µl bidest. H_2O oder je nach Versuchsdurchführung Puffer) gemessen. Anhand einer erstellten Eichkurve im Bereich von 5 bis 50 µg/ml kann die Konzentration des Proteins quantitativ ermittelt werden.

2.7.2.5 SDS-Polyacryamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können in Polyacrylamidgelen elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Diese Methode der diskontinuierlichen Gelelektrophorese, bei der die Proteine unter Zugabe des anionischen Detergenz SDS denaturiert und ihre Ladungen maskiert werden, wurde bereits 1970 (Laemmli et al., 1970) beschrieben. Die unpolaren Ketten des SDS interagieren über hydrophobe Wechselwirkungen mit den unpolaren Proteindomänen, wobei den Proteinen negative Ladungen entsprechend ihrer Größe angeheftet werden. Da die Eigenladung der Proteine somit vernachlässigbar gering und die Ladungsdichte aller Proteine gleich wird, ist die Strecke, die das Protein im Acrylamidnetzwerk des Trenngels während der Elektrophorese zurücklegt, proportional zu seinem Molekulargewicht. Über den Vergleich ihrer Laufstrecke mit der eines mitgeführten Molekulargewichtsstandards kann das Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins ermittelt werden.
Die Proteinproben werden mit dem Laemmli-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1% SDS) (5:1) versetzt, 5 min bei 98°C erhitzt, anschließend auf Eis inkubiert und abzentrifugiert. Das zu erwartende Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine ist ausschlaggebend für die Wahl der Acrylamidkonzentration der Trenngele, da diese ein Maß

für die Porengröße der PAGE ist (Tab. 8).

Acrylamidkonzentration in % (Verhältnis Bisacrylamid zu Acrylamid 1:29)	Linear Range der Auftrennung (in kDa)
15,0	**12 - 43**
10,0	**16 - 68**
7,5	**36 - 94**
5,0	**57 - 212**

Tabelle 8: Empfohlene Acrylamidkonzentration bei bekannter Proteingröße

Zur Erhöhung der Trennschärfe werden die Proteine in einem niedrig-vernetzten Sammelgel, das dem Trenngel vorgeschalten ist, bei saurem pH aufkonzentriert.

Zusammensetzung der Puffer:

4x Resolving Puffer:	1,5	M	Tris-HCl pH 8,8
4x Stacking Puffer:	1,0	M	Tris-HCl pH 6,8
SDS-Elektrophoresepuffer (10x):	250	mM	Tris pH 8,3
	1,92	M	Glycin
	1,00	%	SDS
5x SDS- Probenpuffer:	0,5	M	Tris-HCl pH 6,8
	5 x		SDS-Elektrophoresepuffer
	0,025	%	Bromphenolblau
	10 %	(w/v)	SDS auf 1 Liter auffüllen
	20 %	(v/v)	Glycerin
	25 %		β-Mercaptoethanol
Elektrophorese-Laufpuffer:	1 x		Elektrophorese-Stammpuffer
	0,1 %	(w/v)	SDS

Pipettierschema für Proteingele

Trenngele (für 10 ml)					**Sammelgel (5%)**		
Acrylamid-anteil	**8%**	**10%**	**15%**		**Volumen**	2,5 ml	5 ml
H_2O	4,6 ml	4,0 ml	2,3 ml		**H_2O**	1,43 ml	2,86 ml
4x Resolving Puffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml		**4x Stacking Puffer**	0,625 ml	1,25 ml
30% Acrylamid-Bisacrylamid (29:1)	2,7 ml	3,3 ml	5,0 ml		**30% Acrylamid-Bisacrylamid (29:1)**	0,415 ml	0,83 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml		**10% SDS**	0,025 ml	0,05 ml
10% APS	62,5 µl	62,5 µl	62,5 µl		**10% APS**	10 µl	20 µl
TEMED	6,25 µl	6,25 µl	6,25 µl		**TEMED**	4 µl	8 µl

Tabelle 9: Pipettierschema für Proteingele

TEMED und APS (Ammoniumpersulfat) werden erst kurz vor dem Gießen des Gels zugegeben, weil sie für die Einleitung der Polymerisation verantwortlich sind. Unmittelbar danach wird die Acrylamidlösung des Trenngels bis auf ¾ der Höhe zwischen die beiden in

die BioRad Gelgießapparatur für Minigele eingesetzten Glasplatten gegossen und mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wird das n-Butanol mit H_2O abgewaschen. Verbliebene Flüssigkeitsreste am oberen Gelrand können mit einem Filterpapier abgenommen werden. Das Sammelgel wird bis zur oberen Glaskante gegossen. Um Auftragstaschen für die Proteinlösungen zu formen wird luftblasenfrei ein Kamm eingesetzt. Nachdem das Sammelgel polymerisiert ist, wird der Kamm herausgezogen. Anschließend werden die Taschen mit Elektrophoreselaufpuffer gespült. Das Gel inklusive Glasplatten wird nun in die Elektrophoresekammer der Minigelapparaturen der Firma Biorad eingesetzt. Die Kammer wird mit Elektrophoreselaufpuffer aufgefüllt Nach dem Auftragen der Proteinproben wird eine Spannung von 60 V an die Elektrophoresekammer angelegt. Ab dem Zeitpunkt, bei dem die Proteine den Übergang zwischen Trenn- und Sammelgel erreicht haben, wird die Spannung auf 100-120 V erhöht. Die Elektrophorese wird beendet, wenn das im Probenpuffer enthaltene Pyronin vollständig aus dem Trenngel gewandert ist. Die Banden der Proteine können durch mindestens 30-minütige Inkubation des Polyacrylamidgels in einer Coomassie-Lösung (Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,2% (w/v), 10% (v/v) Eisessig, 45% Methanol) und anschließendem Entfärben (10% (v/v) Eisessig, 10% (v/v) Methanol) sichtbar gemacht werden.

2.7.2.6 Autoradiographie

Die Auswertung der EMSAs und von Gelen, bei denen die Proben mit dem radioaktiven Isotop ^{32}P und/oder ^{35}S markiert wurden, erfolgt im Bio-Imaging-System Fuji BAS 1000. Die Gele, in denen die ^{35}S markierten Proteine aufgetrennt wurden, werden vorher getrocknet. Zusammen mit einer Imaging-Plate Type BAS-III belichten die Proteingele in einer Metall-Kassette die Filme. Dabei kann die Expositionszeit je nach Strahlung zwischen 5 min und 24 h betragen.

2.7.2.7 Westernblot/Immunoblot

Der Westernblot oder auch Immunoblot (Towbin et al., 1979) erlaubt die Detektion einzelner Proteine aus komplexen Proteingemischen aufgrund der spezifischen Bindung eines Antikörpers mit seinem Antigen.

2.7.2.7.1 Herstellung von Proteinextrakten aus *Xenopus* Embryonen

Jeweils 20 animale Kappen wurden in 200 µl (10 µl pro Kappe oder Embryo) kaltem Lysepuffer (50 mM Tris-HCl at pH 7,5; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 10 mM Natrium-β-

glycerophosphat; 1 mM Na_3VO_4; 50 mM NaF; 1,0% NP-40; 0,5% Na-deoxycholat), dem Proteaseinhibitoren (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma) zugegeben worden waren, homogenisiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden per 15-minütiger Zentrifugation bei 14000 U/min sedimentiert. 50 µl des Überstandes wurden für die Durchführung von Immunoblots verwendet. Der verbleibende Überstand kann für den Einsatz in der Koimmunopräzipitation weiterverarbeitet werden (siehe 2.7.5.9.5). Zur Verringerung des Lipidgehalts wird der abgenommene Überstand mit dem gleichen Volumen eisgekühltem Freon ausgeschüttelt. Um eine Phasentrennung der Lösungen zu erhalten wird ein weiterer unter gleichen Bedingungen ablaufender Zentrifugationsschritt angeschlossen. Die wässrige, obere Phase wird anschließend abgenommen. Die Proben können bei -20°C gelagert werden. Die Proteinlösungen werden, wie bereits erwähnt, vor Verwendung 5 min mit 1/5 Volumen 5x Laemmli-Puffer gekocht und anschließend abzentrifugiert.

Proteaseinhibitoren-Stammlösungen 100x lagerfähig bei -20 °C, sofern kein Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) zur Verfügung stand:

0,1	M	Aprotinin
0,2	mM	Leupeptin
0,2	mM	Pepstatin
0,25	M	PMSF in absolutem Ethanol

2.7.2.7.2 Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran

Zunächst wird zum Auftrennen der Proteine mit den hergestellten Proteinlösungen der Embryonen eine Standard-SDS-Page (siehe 2.7.2.5) durchgeführt. Es folgt die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Dafür wird die Laufapparatur auseinandergebaut und das Gel entnommen. In einem Behältnis mit Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, pH 8,3) wird ein Blatt Nitrozellulose auf ein Filterpapier gelegt. Das Gel wird anschließend luftblasenfrei auf die Nitrozellulose gebracht und mit einem weiteren Filterpapier abgedeckt. Der Transfer erfolgt unter Eiskühlung in einer mit Transferpuffer gefüllten Mini-Protean II Tankblotkammer (Biorad) bei 100 V für 60 min (±10 min). Es muss darauf geachtet werden, dass das Gel der Kathodenseite und die Nitrozellulose der Anodenseite näher ist, da die negativ geladenen Proteine sich zur Anode bewegen und folglich an der Nitrozellulose hängen bleiben.

2.7.2.7.3. Immunologische Detektion

Der eigentliche Nachweis der Proteine wurde mit dem ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham) gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die verwendeten Antikörper und deren Verdünnungsfaktoren sind unter 2.3.1 Antikörper

aufgelistet. Die Filme (Hyperfilm^{TM}, Amersham) werden auf die mit ECL (Amersham) inkubierten Blots gelegt und somit belichtet.

10x TBS:	137	mM	NaCl
	200	mM	Tris pH 7,6
PBT:	1	x	PBS
	0.1	%	Tween 20 (v/v)
Blocking Solution:	2	%	Blocking Pulver in PBT (w/v)

2.7.2.8. Gel-Retardations Experimente/ EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Für die Durchführung der Gel-Shift Analysen wird zuerst der Bindungsansatz vorbereitet. In einem Ansatz von 30 µl werden 6 µl 5x Bindepuffer (z.B. 25 mM Tris (pH 8,0); 50 mM KCl; 6,25 mM $MgCl_2$; 0,5 mM EDTA; 10% Glycerin; 0,5 mM DTT; 0,25 µg poly-d[I-C]; 1,5 µl NP-40), der an die jeweils eingesetzten Proteine angepaßt wird, und 1 ng radioaktiv markierte und gereinigte DNA-Probe gemischt und 25 min auf Eis inkubiert. Es folgt die Zugabe von steigenden Mengen (0-500 ng) des bakteriell exprimierten Proteins und eine weitere Inkubation bei 4°C für 30 min. Im Anschluss werden je 10 µl der Reaktionsansätze auf ein 6- bis 11-prozentiges Acrylamidgel aufgetragen und die Elektrophorese bei 4°C durchgeführt. Das Gel wird mit einer Stromstärke von 250 mA gestartet, bis sich ein mitgeführter Marker (Bromphenolblau/Xylencyanol-Gemisch), der zur Kontrolle der Laufgeschwindigkeit dient, vollständig im Gel befindet. Nun wird die Stromstärke auf 50-60 mA eingestellt. Nachdem der Farbstoff ca. 3/4 des Gels durchlaufen hat, wird der Gellauf beendet. Die Auswertung des Gels erfolgt autoradiographisch.

1x TB-Laufpuffer: 89 mM Tris, pH 8,7; 89 mM Borsäure

2.7.2.9. GST-Pulldown Assays

Die Durchführung des GST (Glutathion S-Transferase)-Pulldown Assays erfolgte nach einer bereits veröffentlichten Beschreibung (Cao et al., 2006). Die benötigten Proteine, die radioaktiv markiert werden sollen, wurden zuvor unter Verwendung des TNT Sp6/T7 Coupled Reticulocyte Lysate System von Promega unter Zugabe von radioaktivem ^{35}S-Methionin hergestellt, anschließend markiert (siehe 2.7.2.1) und im Bindepuffer (Puffer A) aufgenommen. Das GST bzw. die GST-markierten Fusionsproteine wurden bakteriell exprimiert, aufgereinigt (siehe 2.7.2.2 und 2.7.2.3) und an die Glutathion-Sepharose gebunden. Im Anschluss folgte eine einstündige Inkubation mit den ^{35}S-markierten Proteinen

bei 4°C. Danach wurde die Gluthation-Sepharose viermal mit dem Bindepuffer und weitere viermal mit dem Puffer B gewaschen. Letztlich werden 20 µl Ladepuffer zugegeben, 5 min bei 95°C gekocht und abzentrifugiert. Der Überstand wird im Folgenden auf die SDS-Page aufgetragen und aufgetrennt. Nun wird das Gel fixiert und getrocknet. Nach Auflegen einer Imaging Plate erfolgt eine Auswertung mit Hilfe des Phospho-Imagers.

Weitere im Pulldown Assay zum Einsatz kommende Lösungen sind im Folgenden aufgelistet.

PBS: 37 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,5 mM Na_2HPO_4; 1,5 mM KH_2PO_4

Puffer A:	40,0	mM	HEPES pH 7,5
(Bindepuffer)	5,0	mM	$MgCl_2$
	0,2	mM	EDTA
	1,0	mM	DTT
	0,5	%	NP-40
	100,0	mM	KCl

Puffer B:	40,0	mM	HEPES pH 7,5
	5,0	mM	$MgCl_2$
	0,2	mM	EDTA
	1,0	mM	DTT
	0,5	%	NP-40
	300,0	mM	KCl

2.7.3. Arbeiten mit Organismen

2.7.3.1 Arbeiten mit Bakterien

2.7.3.1.1 Anzucht von Bakterien

Die Bakterien werden entweder in flüssigem Nährmedium oder z.B. auf Agarplatten des 2TY-Nährmediums kultiviert. Flüssigkulturen von Bakterien werden aus Einzelkolonien gezogen, die von einer Agarplatte mit Hilfe einer Pipettenspitze gepickt werden. Der Glaskolben enthält als Nährmedium LB-Medium (1% NaCl; 1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt) oder 2TY-Medium (0,5% NaCl; 1,6% Trypton; 1% Hefeextrakt) und wird über Nacht in einem Schüttler bei 270 U/min und 37°C inkubiert.

Durch die Zugabe von 15 g/l Agar (1,5% (w/v)) zu einem 2TY-Medium werden 2TY-Agarplatten hergestellt. Zur Animpfung dieser wird ein Aliquot einer Flüssigkultur oder eines Transformationsansatzes mit einem Glasspatel ausplattiert.

Die Bakterien werden selektiert, indem das entsprechende Antibiotikum dem Medium zugegeben wird. Falls es sich um ampicillinresistente Bakterien handelt, beträgt die Endkonzentration des Nährmediums 100 µg/ml Ampicillin.

2.7.3.1.2. Herstellung chemokompetenter Zellen nach der RbCl-Methode

Um Bakterien zu transformieren werden Zellen benötigt, welche die Fähigkeit zur Aufnahme von Plasmid-DNA besitzen. Eine Behandlung mit Rubidiumchlorid kann die Transformationseffizienz der Zellen erhöhen.

Hierbei wird zunächst von einer Bakterienkolonie des XL1-blue-Stammes, der auf einer Tetracyclin-Platte selektioniert wurde, eine gesättigte Vorkultur angelegt. Von dieser wird 1 ml auf 100 ml Kulturmedium überimpft und diese bis zu einer OD_{600} von 0,3 bis 0,5 bei 37°C kultiviert. Nach Abkühlen der Bakterienkultur auf Eis wird sie auf zwei 50 ml Falcons aufgeteilt und für 5 min bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Bakterienpellet in 20 ml Tbf1-Lösung (100 mM RbCl; 30 mM Kaliumacetat; 50 mM $MnCl_2$; 10 mM $CaCl_2$; 15% Glycerin; pH 5,8 mit Essigsäure einstellen) resuspensiert. Es folgt eine fünfminütige Inkubation auf Eis und eine Zentrifugation bei 2500 rpm und 4°C. Nach erneutem Verwerfen des Überstandes wird das Bakterienpellet in 2 ml Tfb2-Lösung (75 mM $CaCl_2$; 10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 15% Glycerin; pH 6,5 mit KOH einstellen) gelöst. Die Lösung wird 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden Aliquots á 100 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen können bei -80°C gelagert werden.

Die beiden Lösungen, Tfb1 und Tbf2, werden entweder aliquotiert bei -70°C gelagert, vor Gebrauch aufgetaut und steril filtriert oder im Kühlschrank aufbewahrt.

2.7.3.1.3 Transformation von Bakterien

Nachdem die RbCl-kompetenten Zellen 20 min auf Eis aufgetaut wurden, werden sie mit 5-10 µl Ligationsansatz oder für eine Retransformation mit 50-200 ng zirkulärer Plasmid-DNA vermischt. Im Anschluss an eine 30- bis 60-minütigen Inkubation auf Eis wird der Transformationsansatz einem Hitzeschock bei 42°C über eine Dauer von 45-90 s ausgesetzt. Nach einer erneuten Inkubation auf Eis über 2 bis 3 min, erfolgt eine Zugabe von 500 µl LB-Medium ohne Antibiotika und eine Inkubation bei 37°C im Schüttler über eine Zeitspanne von 30 bis 60 min. Anschließend werden in Abhängigkeit von der Anzahl der zu erwartenden Kolonienzahl 100-400 µl des Transformationsansatzes auf einer antibiotikahaltigen Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.7.3.1.4. Blau-Weiß Selektion von Bakterien

Die Blau-Weiß Selektion (Sambrook et al., 1989) ist eine Methode mit deren Hilfe Bakterienkolonien mit rekombinanten Plasmiden von denen mit nichtrekombinanten unterschieden werden können. Das Prinzip der Selektion beruht auf der α-Komplementation der β-Galaktosidase. Bei einem Einbau fremder DNA in die für das α-Peptid kodierende Plasmidsequenz wird die Gensequenz unterbrochen. Als Resultat sind weiße Bakerienkolonien auf der Agaroseplatte zu sehen. Eine Nichtaufnahme von rekombinanten Plasmiden durch die Bakterienkolonien ist an der blauen Färbung zu erkennen, da eine Synthese des α-Peptides stattfindet. Durch die Verwendung von antibiotikahaltigen Selektivplatten ist ein Wachstum von Zellen, die kein rekombinantes Plasmid aufgenommen haben, nicht möglich. Zur Durchführung einer Blau-Weiß Selektion müssen die Selektivplatten vor dem Ausplattieren der Bakterien mit 80 µl X-Gal (50 mg/ml) bestrichen und zum Einziehen der Substanz in den Agar eine halbe Stunde getrocknet werden. Den Bakterien wird vor dem Ausplattieren noch 4 µl IPTG (100 mM) zugegeben. Das Wachstum der Bakterien erfolgt während einer Inkubation über Nacht bei 37°C.

2.7.4. Arbeiten mit Zellkultur

2.7.4.1. Zellkultur und Herstellung von Zellextrakten

Die HEK293 Zellen (ATCC CRL 1573) oder die HeLa-Zellen (ATCC CCL2) werden bei 37°C unter 5% CO_2 in Dulbecco's modifiziertem Eagle´s Medium (DMEM, Gibco), dem 10% fötales Kälberserum (fetal calf serum-FCS) zugesetzt worden ist, herangezogen. Sie wurden in PBS gewaschen, in 600 µl eiskaltem M-PER© Lysis Reagent (PIERCE), dem Proteaseinhibitoren (Complete Mix, Roche) zugegeben worden sind, suspensiert und 20 min auf Eis inkubiert. Die Lysate werden einer 30-minütigen Zentrifugation bei 80000 g unterzogen. Anschließend werden die Extrakte in Immunoblots und Immunopräzipitationsexperimenten eingesetzt.

2.7.4.2. Darstellung von Zellen

Die Darstellung der transfizierten Zellen wurde wie in Siegel et al. (2009) beschrieben durchgeführt.

2.7.5. Arbeiten mit *Xenopus laevis*

Die Haltung der verwendeten adulten Frösche der Gattung *Xenopus laevis* erfolgt in auf 20°C

temperiertem und mit gefiltertem Wasser versorgten Glasbecken. Zur Vermeidung von Pilzinfektionen oder anderen Frosch-pathogenen Keimen ist Hygiene äußerst wichtig. Die Regenerationszeit der Weibchen zwischen den einzelnen durch humanes Choriongonadotropin (HCG) induzierten Ablaichprozessen beträgt mindestens drei Monate.

2.7.5.1. HCG-induziertes Ablaichen zur Gewinnung von Froschembryonen

Bei den Weibchen der Gattung *Xenopus laevis* kann durch Injektion des HCGs subkutan in den dorsalen Lymphsack eine Eiablage eingeleitet werden. Zuvor wurde das HCG, das in einer Endkonzentration von 330 U/100 µl vorliegen soll, in 0,5% (w/v) steriler Kochsalzlösung gelöst. In Abhängigkeit der Größe der einzelnen Frösche werden Volumina von 150 bis 300 µl gespritzt. Idealerweise erfolgt die Hormonbehandlung mit HCG am späteren Nachmittag des Vortages an dem Froschembryonen benötigt werden, da die Oocytenreife bzw. die Einleitung des Ablaichprozesses nach 12 bis 18 h erfolgt. Nach dieser Zeitspanne kann die Eiablage durch vorsichtige Massage des Weibchens stimuliert werden. Der Laich wird in einer Petrischale aufgefangen und umgehend befruchtet.

2.7.5.2. *In vitro* Fertilisation der *Xenopus laevis* Eier und Entfernen der Gallerthülle

Die mittels stimulierter Ablaichprozesse erhaltenen Froscheier werden künstlich befruchtet, um einen synchronen Ablauf von Entwicklungsprozessen zu gewährleisten.

Ein männlicher Frosch wird zur Betäubung mindestens 45 min auf Eis gelegt und anschließend dekaptiert. Der Hoden wird entnommen und in OCM (oocyte culture medium: 50% Leibowitz L15 (L-Glutamin minus); 15 mM HEPES; 1mM L-Glutamin; 0,4 µg/ml BSA; 50 m oder µg/ml Gentamycinsulfat; 50 U/ml Nystatin; 10% FBS (fetal bovine serum); pH 7,8; sterilfiltriert) bei 4°C gelagert. Im Normalfall sind unter diesen Bedingungen die Spermien über eine Zeitspanne von einer Woche vital. Unmittelbar vor der geplanten *in vitro* Befruchtung wird der Hoden kurz in 1x MBSH gespült. In einem geringem Volumen 1x MBSH wird ein kleines Stück Hodengewebe mazeriert. In Abhängigkeit von der Größe des Geleges und dem Alter des entnommenen Testis werden 100-300 µl Hodenhomogenates auf die Froschembryonen pipettiert und mit der entsprechenden Menge H_2O auf 0,1x MBSH verdünnt (d.h. zu 100 µl werden 900 µl H_2O zugefügt). Mit Hilfe des Verdünnungsschrittes erhalten die Spermien ihre natürlich-einsetzende Beweglichkeit durch Absinken der Salzkonzentration zurück. Die aktivierten Spermien werden unmittelbar im Anschluss mit den abgelaichten Froscheiern gemischt. Die Petrischale mit den Froschembryonen wird ca. 20-30 min nach der Befruchtung mit 0,1x MBSH aufgefüllt. Nach erfolgreicher *in vitro*

Befruchtung, die nach etwa 30 min an einem Ausrichten der pigmentierten Seite nach oben, aufgrund einer Rotation der Embryonen, erkennbar ist, muss die Gallerthülle der Froschembryonen für Injektionsexperimente entfernt werden. Dazu schwenkt man die Eier in zweiprozentigem Cysteinhydrochlorid (pH 8,2) in 0,1x MBSH, bis sie eng aneinander zum Liegen kommen und wäscht diese mehrmals mit 0,1x MBSH. Die Embryonen werden in 0,1×MBSH (1× MBSH: 88 mM NaCl; 2,4 mM $NaHCO_3$; 1 mM KCl; 0,82 mM $MgSO_4$; 0,41 mM $CaCl_2$; 0,33 mM $Ca(NO_3)_2$; 10 mM HEPES; pH 7,4) kultiviert, bis sie das gewünschte Teilungsstadium erreicht haben (Nieuwkoop und Faber, 1967) in dem die Mikroinjektion entsprechender Konstrukte durchgeführt, Explantate geschnitten oder wildtypische Embryonen abgesammelt werden sollen. Dabei ist die Inkubationstemperatur geschwindigkeitsbestimmend für die Entwicklung.

2.7.5.3. Injektionsexperimente mit *Xenopus laevis* Embryonen

Für Genstudien ist es möglich sowohl Nukleinsäure-(RNA, DNA und MO) als auch Protein-Lösungen bzw. Vitalfarbstoffe während der ersten Furchungsteilungen in das Zytoplasma der Embryonen einzuspritzen. Die Injektion erfolgt an einer Injektionsanlage, welche die zu injizierende Lösung mit einem Maximalvolumen von 10 nl pro Blastomere mittels Stickstoffdruck über eine Glasnadel in die Embryonen spritzt. Die Herstellung der Injektionsnadeln, die für die Injektion der Embryonen einen ausreichend feinen Kapillardurchmesser benötigen, erfolgt an einem Mikropipetten Puller.

Um den Wundschluss, der durch die Injektion hervorgerufenen Verletzung, zu ermöglichen und eine Ausbildung von Injektionsblasen zu vermeiden, werden die Embryonen vorher in 0,5x MBSH mit 4% Ficoll (w/v) überführt. Die injizierten Froschembryonen verbleiben für mindestens 3 h, idealerweise ü.N. bei 14°C, in diesem Medium. Anschließend werden sie wieder in 0,1x MBSH überführt und bis zum gewünschten Stadium kultiviert.

2.7.5.4. Genknockdown mittels Morpholino *antisense* Oligonukleotid-Injektion

In *Xenopus laevis* ist es nur bedingt möglich funktionelle Knockouts eines Gens zu erhalten. Transgene Frösche gibt es nur wenige und sind aufgrund des pseudotetraploiden Chromosomensatzes dieser Gattung schwierig zu erzeugen. Daher wird sich beim Modellorganismus Krallenfrosch mit der Methode des funktionellen Knockdowns eines Gens geholfen. In Zellkultur wird siRNA (*antisense*) verwendet, die nach Mikroinjektion mit der vorhandenen mRNA (*sense*) hybridisiert. Die Menge an Genprodukten wird reduziert, da im Organismus der Abbau doppelsträngiger RNA Moleküle stattfindet. Hier wird mit Hilfe einer

anderen Methode, den Morpholino *antisense* Oligonukleotiden (Morpholino: MO), gearbeitet. Die Morpholino *antisense* Oligonukleotide koppeln sich ebenfalls an die vorhandenen Transkriptionsprodukte des zu untersuchenden Gens und führen aufgrund der Tatsache, dass die Translationsmaschinerie nicht mehr an die mRNA binden kann, zu einer Unterdrückung der Proteintranslation.

Die Sequenz der 25 bp langen Oligonukleotide, die bei der Firma Gene Tools bestellt werden, erstreckt sich entweder über einen Bereich 5´ des Translationsstarts, diesen einschließend oder unmittelbar mit diesem beginnend. Ausgewählte Sequenzen, die im Inneren des offenen Leserahmens lokalisiert sind oder die aus dem 5´untranslatiertem Bereich des Gens mit einer großen Entfernung zum Transkriptionsstart liegen, haben eine sehr geringe bis fehlende Effizienz. Beim pseudotetraploiden *Xenopus laevis* muss darauf geachtet werden, dass das Morpholino mit beiden pseudoallelen RNA-Versionen des zu untersuchenden Gens hybridisieren kann, da es sonst zu einer ungestörten Proteintranslation des nicht hybridisierenden Gens kommt. Falls dies nicht möglich ist, werden zwei verschiedene Morpholinos, wie bei dem funktionellen Knockdown von Oct60, eingesetzt. Zur Kontrolle wird ein von der Firma Gene Tools angebotenes Morpholino *antisense* Oligonukleotid des humanen *β-globin* Gens benutzt (ctrlMO).

2.7.5.5. Animale Kappen und Explantate

Einige Experimente, wie z.B. Expressionsanalysen, Luziferase-Assays oder Koimmunopräzipitationen, wurden mit Explantaten (animal, äquatorial, vegetal) von Froschembryonen durchgeführt. Es ist bekannt, dass animale Gewebsstücke, auch animale Kappen genannt, von frühen Teilungsstadien des Frosches sich wie pluripotente Zellen verhalten und in unterschiedliche Gewebstypen ausdifferenzieren können. Durch die Zugabe verschiedener Transkriptionsfaktoren bzw. Morphogenen kann folglich eine Veränderung der Genexpression in pluripotenten ektodermalen Geweben untersucht werden. Die animale Kappe umfasst den dunkelpigmentierten und animal gelegenen Pol des Embryos und wird lateral von der marginalen Randzone begrenzt. Ein weiterer Vorteil der verschiedenen Explantate sind restriktivere Untersuchungen spezifischer Gewebe ohne störende Einflüsse oder sekundäre Effekte entfernt lokalisierter Transkriptionsfaktoren.

Für diese Untersuchungen wurden nichtinjizierte oder injizierte Embryonen in Stadium 4 in eine animale und eine vegetale Hälfte separiert oder den Embryonen vor Bildung der Keimblätter im Stadium 7 bis 8,5 unter Benutzung zweier Pinzetten die Vitellinmembran entfernt und ein Explantat am animalen bzw. vegetalen Pol der Embryonen herausgetrennt

oder der äquatoriale Ring aus Embryonen des Stadiums 9 präpariert. Die Explantate wurden sowohl zum Schneiden als auch anschließend in 0,5× MBSH mit den zugegebenen Antibiotika Penicillin und Streptomycin auf einer Agarplatte kultiviert, bis die nichtinjizierten Kontrollembryonen das Embryonalstadium erreicht haben, in denen eine Untersuchung durchgeführt werden soll. In einigen Experimenten wurden die animalen Kappen einer dreistündigen Inkubation mit Aktivin A oder bFGF (R&D systems) in einer Konzentration von 10 nl/ml bzw. 500 ng/ml unterzogen. Anschließend wurden diese ebenfalls in 0,5× MBSH überführt und bis zum gewünschten Stadium kultiviert.

2.7.5.6. Fixieren von Embryonen

Eine dauerhafte Fixierung von Froschembryonen ist Voraussetzung für die Lagerung oder für eine Vielzahl von histologischen Experimenten, wie *in situ* Hybridisierung, Gewebeschnitte, immunohistochemische oder histologische Färbungen. Dafür werden die Embryonen in MEM(P)FA (0,1 M MOPS; pH 7,4; 2 M EGTA; 1 mM $MgSO_4$; 4% (Para-)Formaldehyd) oder in 4% Paraformaldehyd/PBS Lösung mindestens 2 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln oder bei 4°C über Nacht fixiert. In Anschluss werden sie schrittweise in Ethanol überführt und bei -20°C aufbewahrt.

2.7.5.7. *In vivo* Transkription/Translation Assay

Die Effizienz eines Morpholinos *in vivo* bzw. seine Fähigkeit die Translation eines Gens im Embryo zu unterdrücken, wurde für folgende Morpholinos überprüft: Oct60MOa1 und XDppaMO.

Im Falle von Oct60 wurde Myc-markierte *Oct60* (*Oct60-MT)* RNA alleine, zusammen mit dem Oct60MOa1 oder mit dem ctrlMO injiziert. Beim Erreichen des Stadiums 8,5 wurden die animalen Kappen der Embryonen geschnitten.

Die Effizienz von XDppaMO wurde *in vivo* durch den Vergleich einer Koinjektion mit *XDppa2/4-EGFP* RNA, einer *XDppa2/4-EGFP* RNA Einzelinjektion und einer gemeinsamen Injektion der *EGFP* RNA und des ctrlMOs untersucht. Die injizierten Embryonen bzw. geschnittenen Kappen wurden im Stadium 11,5 abgesammelt. Jeweils 20 oder 30 Embryonen oder animale Kappen wurden in 200 bzw. 300 µl Lyse-Puffer (10 µl/Embryo oder Kappe: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1% NP-40; Protease Inhibitor Mix (Sigma)) homogenisiert. Die Lysate wurden bei 4°C präzipitiert und in 1×Laemmli-Puffer (62,5 mM Tris; pH 6,8; 10% Glycerin; 2,35% SDS; 0,001% Bromphenol Blau; 100 mM DTT; 1 mM EDTA) gekocht. Anschließend wurde mit den Proteinproben ein Westernblot

unter Standardbedingungen durchgeführt. Für die Detektion der Fusionsproteine Oct60-MT wurde der Maus (Mouse) anti Myc-tag (Santa Cruz) und für XDppa2/4-EGFP der Hase (Rabbit) anti-GFP (Santa Cruz) verwendet. Eingesetzte Verdünnungen und sekundäre Antikörper sind unter dem Kapitel: Antikörper (siehe 2.3.1) nachzulesen.

2.7.5.8. Luziferase Reporter Assay

Der Luziferase Assay ist ein etabliertes Reportergensystem zur quantitativen Aktivitätsanalyse eines Promotors. Für Untersuchungen wurden die betreffenden Promotorfragmente vor das Luziferase Gen des pGL3 bzw. des pGL4 Vektors (Luciferase Assay System von Promega) kloniert. Damit ist eine Regulation der Transkription des Luziferasereportergens möglich. Hierbei muss beachtet werden, dass die Vektoren entweder als basic Vektor, also ohne Minimalpromotor (pGL4.10; pGL3basic) oder als Vektoren mit einem solchen (pGL4.23) vorliegen. Im Unterschied zu pGL3 besitzt der pGL4 Vektor weniger putative Bindungsstellen. Die Plasmid-DNA der Promotorreporter (40 ng/E) und die entsprechenden mRNAs, beziehungsweise Morpholinos (ctrlMO oder Oct25MO/Oct60MO (45 ng/E)) wurden bei der Verwendung von Kappen in den animalen Pol und für den Einsatz ganzer Embryonen in die äquatoriale Region von 2-Zell- oder 4-Zell-Stadien injiziert. Normalerweise wurden 200 pg RNA pro Embryo injiziert, außer für *Oct25* und *Oct1*, bei denen 400 pg/Embryo zum Einsatz kamen. Die Embryonen bzw. Kappen wurden im Stadium 10,5 abgesammelt und entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C zwischengelagert oder unmittelbar in 10 µl 1x Lysepuffer (Promega) pro Embryo/Kappe homogenisiert. Um die nicht benötigten Zelltrümmer zu pelletieren, folgte nach 10-minütiger Inkubation auf Eis eine Zentrifugation bei 4°C und 13000 U/min über eine Dauer von 5 Minuten. Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte im Lumat LB 9507 Luminometer (Berthold) mit 20 µl des Lysates jeder Probe unter Zugabe von 100 µl Luziferasesubstrats (Promega). Dabei wird das zugeführte Luziferin durch die Luziferase enzymatisch umgesetzt, die entstehenden Lichtquanten werden im Luminometer gemessen und als RLU (relative Lichteinheit) angegeben. Die Aktivität wird in Diagrammen dargestellt. Angegeben sind die relativen Einheiten normiert auf die Aktivität der Injektion des Plasmids alleine. Jedes Experiment wurde dreimal durchgeführt.

2.7.5.9. Histologische und immunohistologische Methoden

2.7.5.9.1 Whole Mount *in situ* Hybridisierung

Mit Hilfe einer Whole Mount *in situ* Hybridisierung kann die räumliche Expression eines Gens im gesamten Embryo oder in Gewebeschnitten von Embryonen spezifisch dargestellt werden. Die viertägige Durchführung erfolgte bis auf vereinzelte Modifikationen nach Angaben der Standardprotokolle (Harland, 1991) unter RNase-freien Bedingungen über die ersten beiden Tage. Das Prinzip basiert auf einer genspezifischen RNA *antisense* Sonde, die mit Digoxygenin oder Fluorescein markiert und mit den fixierten Embryonen inkubiert wird (siehe 2.7.1.2.2). In den Expressionsdomänen des Gens findet eine Hybridisierungsreaktion der Sonde mit der komplementären RNA statt. Der Nachweis erfolgt über kovalent an Alkalische Phosphatase (AP) gebundene anti-Digoxygenin/Fluorescein-Fab-Fragmente bzw. über die zugegebenen Farbstoffe, die durch die AP umgesetzt werden. Abhängig vom zugegebenen Substrat (NBT/BCIP; BM Purple; INT/BCIP oder Fast Red) kann die Färbung zwischen türkisblau, violett oder orangerot gewählt werden. Unter Benutzung verschiedener Farbreaktionen können somit auch die räumliche Expression zweier Gene in einer Doppel-*in situ* Hybridisierung zu einem bestimmten Entwicklungsstadium nachgewiesen und direkt miteinander verglichen werden.

Tag 1:

Zuerst werden die nach Fixierung in Ethanol aufbewahrten Embryonen einer schrittweisen Rehydrierung mit PBS (37 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,5 mM Na_2HPO_4; 1,5 mM KH_2PO_4) und PBT (37 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,5 mM Na_2HPO_4; 1,5 mM KH_2PO_4; 0,1% Tween-20; mit 0,1% DMPC auffüllen; pH 7,3) unterzogen. Anschließend wird mittels Inkubation in Proteinase-K Lösung (0,2% Proteinase-K (10 µg/ml) in PBT) die Vitellinmenbran der Embryonen durchlässig gemacht. Ein weiterer Vorteil dieser Behandlung ist die Verringerung einer unspezifischen Färbung durch Wechselwirkung der markierten RNA mit Resten der Gallerthülle und Vitellinmembran. Die Behandlungsdauer variiert zwischen 8 bis 10 min und ist vom Entwicklungsstadium der Embryonen abhängig. Nach dem Waschen mit Triethanolamin (0,1 M pH 7,8; mit NaOH einstellen) erfolgt eine schrittweise Zugabe von Essigsäureanhydrid (5 µl/ml) zu den Embryonen. Es folgen zwei Waschschritte mit PBT, eine 20-minütige Refixierung der Embryonen in MEMFA (0,1 M MOPS; pH 7,4; 2 mM EGTA; 1 mM $MgSO_4$; 4% PFA) oder 4% PFA und erneutes fünfmaliges Waschen mit PBT. Vor der eigentlichen Hybridisierung am zweiten Tag findet über Nacht eine Vorhybridisierung in Hybridisierungspuffer (50% (v/v) Formamid deionisiert, 5x SSC (Sodium Chlorid Sodium

Citrate), 1-2 mg Yeast-RNA, 100 µg/ml Heparin, 1x Denhart´s (0,02% Ficoll 400; 0,02% Polyvinylpyrrolidon; 0,02% BSA); 1% Tween-20; 0,1% Chaps; 10 mM EDTA mit DMPC angesetzt, und als 5-10 ml Aliquots bei -20°C aufbewahren) unter Schwenken bei 63-65°C im Wasserbad statt.

Tag 2:

Ebenfalls müssen vor der Hybridisierung 20 µl der DIG- bzw. Fluorescein markierten *antisense* RNA-Sonden mit 20 µl deionisiertem Formamid vermischt werden. Einer Inkubation bei 96°C für 30 s folgt unmittelbar eine Inkubation auf Eis, welche die Bildung von störenden Sekundär- und Tertiärstrukturen minimiert. Das Gemisch wird mit Hybridisierungspuffer auf 500 µl aufgefüllt. Bei einer bereits einmal verwendeten, recycelten Sonde wird die Inkubation bei 96°C auf 45 s erhöht. Zur Hybridisierung werden die Embryonen im Wasserbad bei 63-65°C ü.N. mit der Sonde inkubiert.

Tag 3:

Nach Abnahme der Sonde, die wieder verwendet werden kann (bei -20°C lagern), werden die Embryonen mit 2x SSC (0,3 M NaCl; 0,03 M Natriumcitrat) und dreimal mit 0,2x SSC gewaschen, um überschüssige markierte RNA zu entfernen und um die Embryonen für die Antikörperreaktion vorzubereiten. Dazu werden diese mit MAB-Puffer (100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; pH 7,5), Blocking Reagenz (Roche) und Lammserum (Fa. Gibko, Invitrogen) inkubiert. Die eigentliche Bindung erfolgt während einer vierstündigen Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper (anti-Digoxigenin-AP FAB-Fragment bzw. anti-Flourescein-AP FAB-Fragment; Roche) bei RT. Drei Waschschritte mit MAB-Puffer über eine Dauer von 10 min und einer ü.N. dient der Entfernung ungebundener Antikörper.

Tag 4:

Nach vier- bis sechsmaligem Waschen mit MAB-Puffer werden die Embryonen zweimal mit AP-Puffer (100 mM Tris pH 9,5; 50 mM $MgCl_2$; 100 mM NaCl; 0,1% Tween-20; auf 10 ml mit H_2O auffüllen) gespült. Durch Zugabe des AP-Substrates (BM Purple AP Substrat, Fast Red oder NBT (4-Nitro blue tetrazolium chloride), BCIP (X-Phosphat/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate; Roche)) wird die Färbung eingeleitet. Wenn die gewünschte Färbeintensität erreicht ist, werden die Embryonen mit PBT gewaschen, erneut für mindestens 2 h in MEMFA fixiert und in Ethanol gelagert. Abschließend kann mit 30% H_2O_2 eine Depigmentierung der Embryonen durchgeführt werden, um die *in situ* Färbung vor allem in normalerweise pigmentierten Bereichen hervorzuheben.

2.7.5.9.2. Galaktosidase-Färbung

Zum Nachweis der β-Galaktosidase werden die mit der korrespondierenden mRNA injizierten Embryonen für eine Stunde mit MEMPFA oder PFA fixiert. Anschließend erfolgen zwei Waschschritte mit PBS, das 1 mM $MgCl_2$ enthält, und zwei weitere mit Färbe-Puffer (Staining-Buffer: 10 mM $K_3Fe(CN)_6$; 10 mM $K_4Fe(CN)_6$; 1 mM $MgCl_2$; in PBS) jeweils über eine Dauer von 5-10 min. Für die Färbereaktion werden die Embryonen 1-2 h bzw. bis zum Erreichen der gewünschten Farbintensität bei 37 °C in Staining-Buffer, dem unmittelbar zuvor 1,5 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-J-D-galactopyranoside (X-gal; Sigma) hinzugefügt wurden, inkubiert. Letztlich werden die Embryonen erneut zweimal in PBS gewaschen und für 30 min in PFA fixiert. Bei -20°C sind die gefärbten und in 100% Ethanol überführten Embryonen lagerungsfähig.

2.7.5.9.3. Nachweis von Apoptose

2.7.5.9.3.1. TUNEL

Diese Methode dient der Detektion von Zellen, bei denen ein programmierter Zelltod (Apoptose) eingeleitet wurde (Hensey und Gautier, 1998). Charakteristisch hierbei ist eine Fragmentierung des DNA-Stranges durch Endonukleasen, wobei an den Enden freie Hydroxylgruppen (3´-OH-Enden) übrig bleiben. Exakt an dieser Stelle greift der TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) ein. An die freien 3´-OH-Enden werden unter Benutzung des Enzyms TdT (Terminale deoxynucleotidyl Transferase) markierte Nukleotide angehängt, die mittels Fluoreszenz oder Farbstoffkopplung nachgewiesen werden können. Die Untersuchung der auftretenden Apoptose in Embryonen mittels TUNEL wurde nach einem bereits veröffentlichten Protokoll durchgeführt (Schuff et al., 2007).

2.7.5.9.3.2. Kaspase Assay

Es ist hinreichend bekannt, dass Apoptose durch unterschiedliche Kaspasen induziert werden kann. Unter Verwendung der Kaspase 3/7, Kaspase 8 und Kaspase 9 Glo Assay Kits (Promega), die auf einer Lumineszenz basierenden Methode für spezifische Substrate beruhen, wurde die Aktivität der Effektorkaspasen 3/7, der Kaspase 8, für die extrinsische rezeptorvermittelte Apoptose, und der Kaspase 9 für die stressinduzierte intrinsische Apoptose ermittelt.

Zur Durchführung dieser Assays wurden jeweils 10 Embryonen, die mit den zu

untersuchenden Konstrukten in beide Zellen des 2-Zell-Stadiums injiziert worden waren, im Stadium 11,5 und 17 abgesammelt. Die weitere Durchführung orientierte sich am Protokoll des Herstellers bzw. an bereits beschriebenen Modifikationen nach Boorse et al. (2006). Für die Untersuchungen wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten jeweils 10 Embryonen des Stadiums 11,5 bzw. 17, in 200 µl PBS homogenisiert und vermessen.

2.7.5.9.4. Anfertigen von histologischen Schnitten von *Xenopus laevis* Embryonen

Um detailliertere Untersuchungen von Expressionsdomänen nach einer Whole Mount *in situ* Hybridisierung durchzuführen wurden im Verlauf dieser Arbeit histologische Schnitte von *Xenopus laevis* Embryonen angefertigt. Um die Embryonen mit Hilfe des Vibratoms zu schneiden, müssen sie zuerst für mehrere Stunden in eine Gelatinelösung gelegt und anschließend eingebettet werden. Dazu wird in eine Gussform eine zuvor auf Eis durchmischte Gelatine-Glutaraldehydlösungen (1 ml Gelatinelösung + 140 µl Glutaraldehyd) bodendeckend gegossen. Nachdem sich die Lösung verfestigt hat, wird der Embryo auf diesem Gusssockel ausgerichtet und mit Gelatine-Glutaraldehydlösung übergossen. Im Folgenden kann die Gussform vom ausgehärteten Block entfernt werden. Der Block wird nun mittels Sekundenkleber auf einen Metallträger geklebt, in das Vibratom eingespannt und in einer Schichtdicke von 30-80 µm geschnitten. Abschließend werden die Vibratomschnitte mit Glycerin eingedeckelt.

Gelatinelösung:

Für die Herstellung der Gelatinelösung werden 2,2 g Gelatine in 450 ml Wasser vorsichtig unter Rühren bis zur vollständigen Lösung erwärmt. Anschließend werden 135 g BSA und 90 g Saccharose zugeben. Nach vollständigem Auflösen wird die Mischung aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.7.5.9.5. Koimmunopräzipitation (KoIP)

Für die Koimmunopräzipitation wurden animale Kappenexplantate des Stadiums 10,5 von Embryonen, welche die gewünschte RNA in den animalen Pol injiziert bekommen haben, oder Kontrollkappen nichtinjizierter Embryonen eingesetzt. Nach Zentrifugation der Zelllysate wurde der verbliebene Überstand mit Protein-G gekoppelter Sepharose (Amersham) vorgereinigt um Hintergrundsignale zu reduzieren. Zur Präzipitation der Proteinkomplexe wurden 2 µl des M2 anti-Flag Antikörpers (Sigma) zugegeben und bei 4°C eine Stunde inkubiert. Um endogenes Oct25 mit Tcf3-MT oder VegT-MT zu präzipitieren wurde der an Agarose konjugierte anti-Myc Antikörper (Sigma) benutzt. Eine weitere

Inkubation über eine Stunde bei 4°C erfolgte nach der Zugabe von 40 µl Protein G-Sepharose. Anschließend wurde die Sepharose bzw. Agarose mittels Zentrifugation pelletiert und dreimal mit Lysepuffer gewaschen. Nachdem die Immunopräzipitate in 1x Laemmlipuffer gekocht und somit eluiert wurden, konnten sie in Immunoblots verwendet werden.
Für die KoIP von Zellkulturen wurden 24 Stunden nach der Kotransfektion von HEK-293 Zellen mit verschiedenen Plasmiden (hier: pCS2+Flag-Oct25 alleine oder zusammen mit pCS2+Smad2-HA, pCS2+XWBSCR11-HA bzw. pCS2+FAST1-HA), Zellextrakte hergestellt. Die HA-markierten Proteine wurden nach den Angaben des Herstellers mit Hilfe des Profound™ HA-Tag-IP/KoIP-System (PIERCE) präzipitiert.

2.7.5.9.6. Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Die Durchführung der ChIPs hielt sich an das bereits veröffentlichte Protokoll (Cao et al., 2004). Nichtinjizierte, mit 20 ng ctrlMO oder Oct25MO injizierte Embryonen wurden im Stadium 10,5 abgesammelt und für die ChIP aufgearbeitet. Zur Präzipitation der Chromatin-Protein-Komplexe kam der bereits beschriebene anti-Oct25 Peptidantikörper zur Anwendung (Cao et al., 2006). Die Amplifikation der Promotorregionen von *Xnr1*, *Siamois*, *Gsc (Gsc-A*: Promotorregion inklusive Oct-Bindungsstelle*, Gsc-B*: Fragment enthält DE und PE) und *Mix2* erfolgte mit den in Tabelle 7 aufgeführten Primerpaaren.

2.7.5.9.7. TSA-Behandlung von Embryonen

Die nichtinjizierten oder injizierten Embryonen wurden in 250 nM Trichostatin A (TSA; Sigma) bis zum gewünschten Stadium, in dem eine Untersuchung der Genexpression durchgeführt werden soll, inkubiert. Anschließend werden die Embryonen bzw. deren RNA, wie bereits beschrieben, aufgearbeitet.

3. Ergebnisse

3.1. Analyse der *POU-V* Gene in *Xenopus laevis*

3.1.1. Ektopische Expression von *Oct25*, *Oct60* oder *Oct91* in vegetalen Zellen inhibiert die Ausbildung des Mesendoderms

Um den Einfluss der POU-V Faktoren von *Xenopus* auf die Ausbildung des Mesendoderms zu untersuchen und um herauszufinden, ob sie sich ähnlich wie mammales Oct3/4 (mOct3/4) verhalten, wurden *Oct25*, *Oct60*, *Oct91* und murines *Oct3/4* in der vegetalen Hälfte des Embryos ektopisch exprimiert. Nach Injektion von 400 pg *Oct25* (n=33; Abb. 1A, obere Reihe) oder *Oct60* RNA (n=41; Abb. 1A, obere Reihe) in die vier vegetalen Blastomeren eines Embryos im 8-Zell-Stadium zeigte sich im Gegensatz zu nichtinjizierten Embryonen (Abb. 1A, obere Reihe), die eine normale Gastrulation durchlaufen, bei 100% der RNA injizierten Embryonen eine fehlende Blastoporusbildung. In 74% der mit 800 pg *Oct91* (n=39; Abb. 1A, obere Reihe) und in 70% der mit 400 pg *mOct3/4* RNA injizierten Fälle (n=37; Abb. 1A, obere Reihe) konnte der gleiche Phänotyp beobachtet werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine ektopische Expression von *Oct25*, *Oct60*, *Oct91* oder *mOct3/4* eine fehlerhafte Gastrulation während der Entwicklung verursacht.

Da bereits über Whole Mount *in situ* Hybridisierungen eine Anreicherung der *Oct25* Transkripte auf der animalen Hälfte nachgewiesen werden konnte, wurde zunächst die Ausbildung der mesodermalen und endodermalen Gewebe untersucht (Cao et al., 2004). Dafür wurden die Veränderungen der Expressionsdomänen des pan-mesodermalen Markers *Xbra* (Abb. 1A, mittlere Reihe) und des endodermalen Markers *XSox17α* (Abb. 1A, untere Reihe) im Stadium 11 analysiert. Während in den nichtinjizierten Kontrollembryonen das wildtypische Expressionsmuster für *Xbra* und *XSox17α* zu beobachten war, zeigten Embryonen nach Injektion von *Oct25*, *Oct60*, *Oct91* oder *mOct3/4* RNA eine starke Reduktion beider Expressionsdomänen. Diese Beobachtung weist auf eine Unterdrückung der Mesoderm- und Endodermbildung hin. Zusätzlich wurden einige Gene, deren Expression typisch für die mesendodermale Entwicklung sind, auf ihre Expression hin untersucht. Dafür wurde der Embryo mit 400 pg *Oct25*, *Oct60* oder 600 pg *mOct3/4* RNA in die vier vegetalen Blastomeren des 8-Zell-Stadiums injiziert und in Stadium 10 einer real time RT-PCR Analyse unterzogen (Abb. 1B). Es zeigte sich eine verminderte Transkriptmenge des pan-mesodermalen Markers *Xbra*, des ventral mesodermal exprimierten *Xwnt8* und der dorsal

mesodermalen Marker *Chordin* und *Goosecoid* (*Gsc*). Darüber hinaus waren auch die Transkripte von Genen, die in die Ausbildung des Mesoderms involviert sind, wie *derriere, FGF3* und *FGF8,* verringert. Auch bei zwei in die Ausbildung des Endoderms einbezogenen Genen, *Mixer* und *XSox17α*, ließ sich eine starke Repression der Transkription erkennen. Generell kann gefolgert werden, dass durch ektopische Expression von Oct25, Oct60, Oct91 oder mOct3/4 die Entstehung mesendodermaler Strukturen während der Entwicklung in *Xenopus* unterdrückt wird.

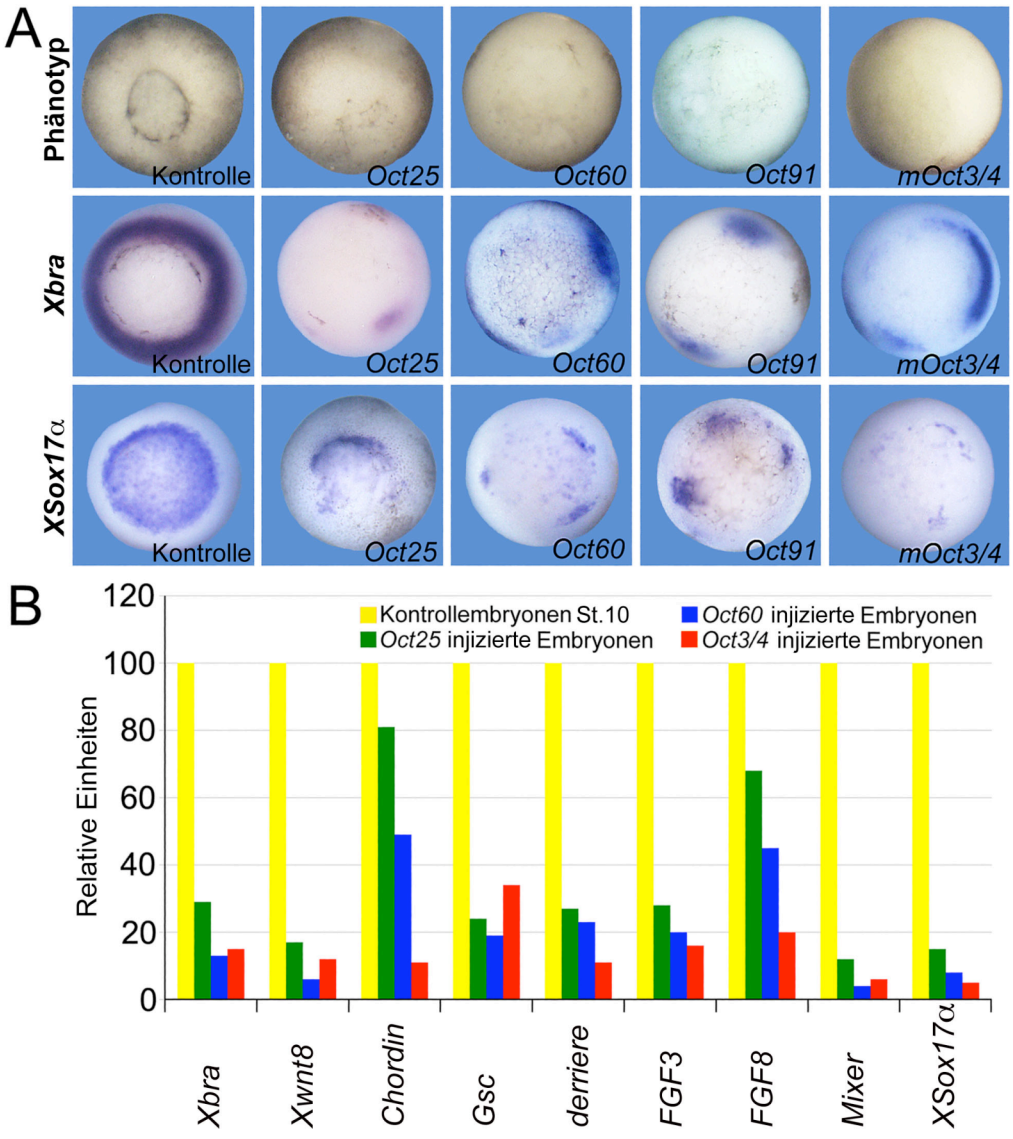


Abb. 1: Überexpression von Oct25, Oct60, Oct91 oder mOct3/4 in der vegetalen Zone unterdrückt die Bildung des Mesendoderms. (A, obere Reihe) Ein nichtinjizierter Kontrollembryo des Stadiums 11,5 zeigt den normalen Verlauf der Gastrulation. Hingegen werden bei Embryonen, die vegetal mit *Oct25*, *Oct60*, *Oct91* oder *mOct3/4* RNA injiziert wurden, eine fehlgeleitete Blastoporusbildung und ein Verlust der Gastrulation beobachtet. Die Expression von *Xbra* (A, mittlere Reihe) und die Expression von *XSox17α* (A, untere Reihe) in *Oct25*, *Oct60*, *Oct91* und *mOct3/4* injizierten Embryonen ist im Stadium 10,5 im Vergleich zu nichtinjizierten Kontrollembryonen sehr stark reduziert oder fast vollständig verschwunden. Alle Embryonen sind von der vegetalen Seite abgebildet. (B) Real time RT-PCR zeigt die durch Injektion von *Oct25*, *Oct60* oder *mOct3/4* RNA verursachte massive Inhibition der Transkription mesendodermaler Gene.

3.1.2. Oct25 steigert die Transkription früher neuroektodermaler Gene

Als nächstes wurde untersucht, wie sich eine Überexpression von Oct25 auf das Ektoderm auswirkt. Dazu wurden 400 pg *Oct25* RNA nahe dem animalen Pol in alle vier Blastomeren eines Embryos im 4-Zell-Stadium injiziert. Im Stadium 8,5 wurden animale Explantate der Embryonen präpariert und zu dem Entwicklungszeitpunkt, an dem die nichtinjizierten Kontrollembryonen das Stadium 10 erreicht hatten, abgesammelt und für die Herstellung der cDNA aufgearbeitet. Anschließend wurde die Expression von ausgewählten ektodermalen Genen analysiert.

Für die neuroektodermalen Gene *XSox2*, *XSox3*, *Geminin H* und *Zic1* konnte in animalen Kappen nach ektopischer Expression von Oct25 im Vergleich zu Kontrollembryonen eine Erhöhung der Transkriptmenge nachgewiesen werden (Abb. 2). Da bekannt ist, dass Sox2, Sox3, Geminin H und Zic1 die neurale Differenzierung fördern, aber die neuronale Differenzierung in *Xenopus* und anderen Vertebraten inhibieren (Mizuseki et al., 1998; Kishi et al., 2000; Aruga et al., 2002; Bylund et al., 2003; Graham et al., 2003; Seo et al., 2005), deuten die Ergebnisse nach Untersuchung der animalen Explantate auf eine durch Oct25 geförderte Ausbildung des neuralen Zellschicksals. Diese Vermutung wird von der Tatsache unterstützt, dass im Stadium 26, im Gegensatz zu Kappen nichtinjizierter Embryonen keine Expression des für differenzierte primäre Neuronen spezifischen Markers, *N-tubulin*, zu verzeichnen war (Ergebnisse sind hier nicht gezeigt). Dies ist in Übereinstimmung mit der Rolle der frühen neuroektodermalen Gene, die neuronale Vorläuferzellen daran hindern, sich in Neuronen zu differenzieren.

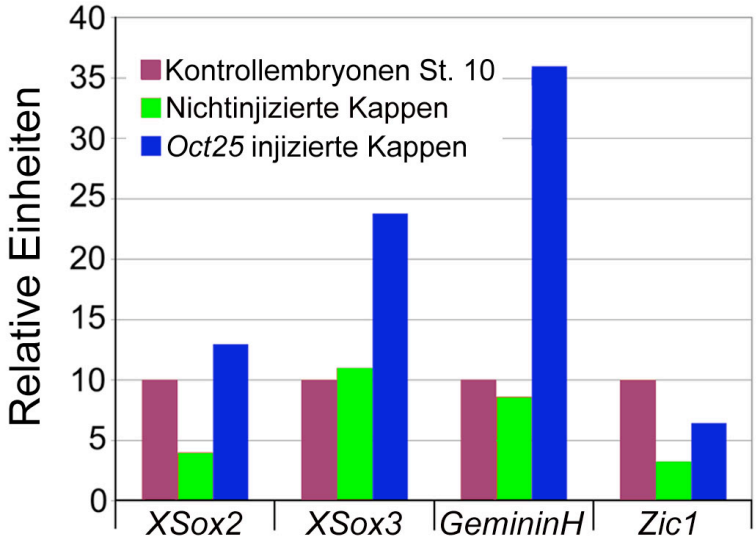


Abb. 2: Eine *Oct25*-Überexpression fördert die Expression frühzeitiger Gene des Neuroektoderms. Mittels real time RT-PCR wird die gesteigerte Transkription von *XSox2*, *XSox3*, *Geminin H* und *Zic1* in *Oct25* RNA injizierten Embryonen im Stadium 10,5 gezeigt.

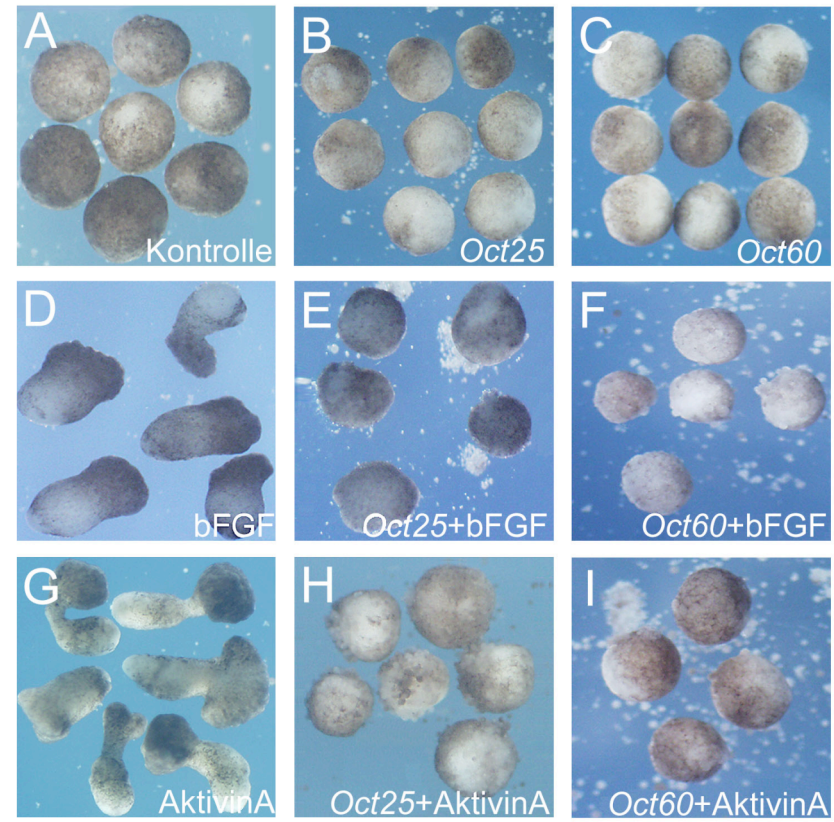
3.1.3. Oct25 Überexpression inhibiert die Aktivität von Aktivin A und bFGF in animalen *Xenopus* Explantaten

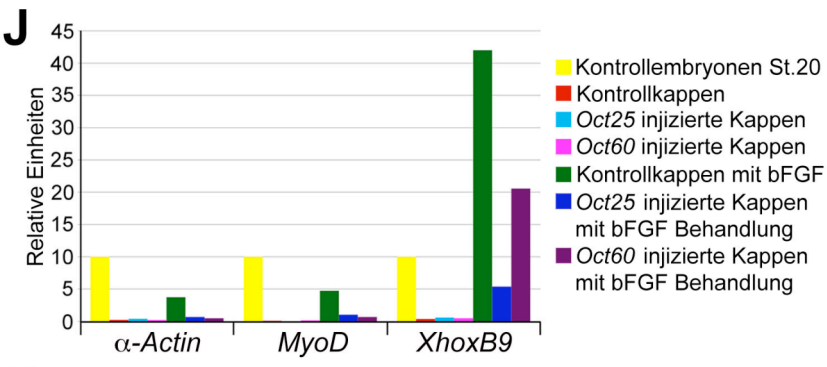
Induktoren der Keimblattbildung und der Differenzierung von Geweben (Gurdon et al., 1994; Bottcher und Niehrs, 2005) sind z.B. die maternal exprimierten FGFs und Aktivin A (Kimelman et al., 1988; Asashima et al., 1991). Im Folgenden wurde der Einfluss der Oct25- und Oct60 Überexpression auf die Aktivität von Aktivin A oder bFGF untersucht. Zuerst wurden im Stadium 8,5 die animalen Explantate von nichtinjizierten und mit 600 pg *Oct25* oder *Oct60* RNA injizierten Embryonen präpariert und mit bFGF behandelt. Als Negativkontrolle dienten hierbei nichtinjizierte und unbehandelte animale Kappen, deren Zellen sich normalerweise zu atypischer Epidermis entwickeln (Fig. 3A). Ein Vergleich der animalen Explantate von *Oct25* (Abb. 3B) bzw. *Oct60* (Abb. 3C) RNA injizierten Embryonen mit nichtinjizierten Kappen, zeigte keinerlei morphologische Unterschiede. Eine Inkubation nichtinjizierter Explantate mit 500 ng/ml bFGF-Protein führte aufgrund der Einleitung der Mesodermentwicklung zu Elongationen (Abb. 3D). Im Gegensatz dazu elongierten Kappen nach *Oct25* (Abb. 3E) oder *Oct60* (Abb. 3F) RNA Injektion nicht mehr. Die Ursache ist möglicherweise darin zu finden, dass eine Überexpression sowohl von Oct25 als auch von Oct60 den Mesoderm induzierenden Effekt von bFGF verhindert oder sogar vollständig unterdrücken kann.

Als nächstes wurden die nichtinjizierten, die 600 pg *Oct25* RNA und die 600 pg *Oct60* RNA injizierten Embryonen einer Behandlung mit Aktivin A (10 ng/ml) unterzogen. Aktivin A behandelte animale Explantate nichtinjizierter Embryonen wiesen die für die Mesodermbildung charakteristischen Elongationen auf (Abb. 3G). Analog der bFGF Behandlung konnten nach Injektion von *Oct25* bzw. *Oct60* RNA keine elongierenden Kappen beobachtet werden (Abb. 3H und I), was wiederum auf eine Unterdrückung der Mesoderm induzierenden Aktivität von Aktivin A deutet.

Im Folgenden wurde der inhibierende Effekt von Oct25 und Oct60 auf die induzierende Aktivität von bFGF und Aktivin A mittels real time RT-PCR ausgewählter Markergene untersucht. Animale Kappen nichtinjizierter oder *POU-V* RNA injizierter Embryonen zeigten ohne bFGF bzw. ohne Aktivin A Inkubation keine nennenswerte Induktion sowohl mesodermaler als auch endodermaler Gene (Abb. 3J und K). Mittels bFGF Behandlung kam es in nichtinjizierten Kappen im Stadium 20 zu einer starken Erhöhung der mesodermalen Gene des Rumpfes *MyoD* und *α-Actin*, und des posterioren neuralen Markers *XhoxB9* (Abb. 3J). Der inhibierende Einfluss von Oct25 und Oct60 auf die Aktivität von bFGF wurde in Kappen *Oct25* oder *Oct60* RNA injizierter Embryonen durch die dramatische Unterdrückung

der aktivierten Marker sichtbar (Abb. 3J). Von einer fehlenden Mesoderminduktion trotz bFGF Behandlung wurde bereits nach Überexpression von Oct91 berichtet (Henig et al., 1998).





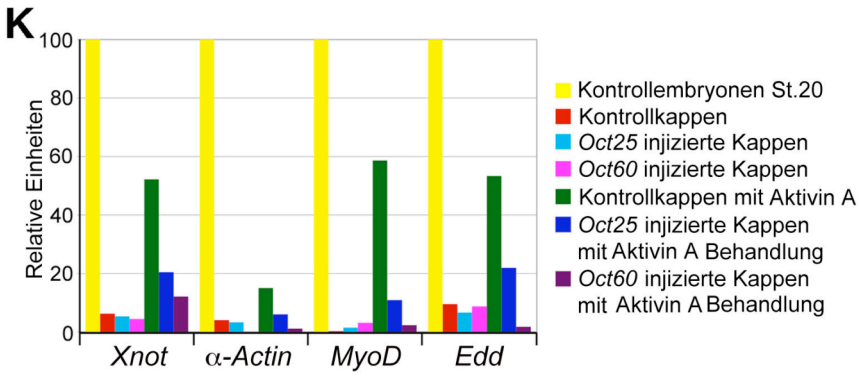


Abb. 3: Oct25 und Oct60 unterdrücken die Mesendoderm-induzierenden Eigenschaften von bFGF und Aktivin A in animalen Kappen. (A) Naïve animale Kappen im Stadium 20 entwickeln sich zu einer atypischen Epidermis. Animale Kappen von *Oct25* (B) oder *Oct60* (C) injizierten Embryonen sind phänotypisch unauffällig. (D) Nach einer Behandlung mit 500 ng/ml bFGF zeigen animale Kappen leichte Elongationen, die in Kappen von Oct25 (E) oder Oct60 (F) überexprimierten Embryonen nicht ausgebildet werden. (G) Die mit 10 ng/ml Aktivin A behandelten Kappen von Kontrollembryonen weisen die charakteristischen Elongationen auf. Hingegen zeigen die Kappen von *Oct25* (H) oder *Oct60* (I) RNA injizierten Embryonen bei identischer Behandlung mit Aktivin A keinerlei Elongation. Über real time RT-PCR wurde der inhibierende Einfluss einer *Oct25*- oder *Oct60*-Überexpression auf die Differenzierung der durch bFGF (J) oder Aktivin A (K) induzierten Gewebe verdeutlicht.

Eine Inkubation der animalen Kappen mit Aktivin A führte zu einer stark erhöhten Expression der dorsal/mesodermalen Gene des Rumpfes *Xnot*, *α-Actin* und *MyoD* (Abb. 3K).

Ebenso war eine erhöhte Transkriptmenge des endodermalen Gens *Endodermin* (*Edd*) zu detektieren. Hingegen zeigen die mit Aktivin A behandelten animalen Kappen *Oct25* bzw. *Oct60* RNA injizierter Embryonen eine deutliche Unterdrückung dieser Gene (Abb. 3K). Ausgehend von diesen Beobachtungen kann postuliert werden, dass Oct25 und Oct60 die Aktivitäten von Aktivin A und bFGF in animalen Kappen inhibieren.

3.1.4. Oct25 inhibiert die Aktivität der *Xnrs* in *X. laevis* Embryonen

Bei der Entstehung des Mesendoderms spielt der Nodal Signalweg eine wichtige Rolle. Es stellt sich die Frage, ob Oct25 auch einen inhibierenden Einfluss auf die Aktivität des Nodal Signalwegs hat.

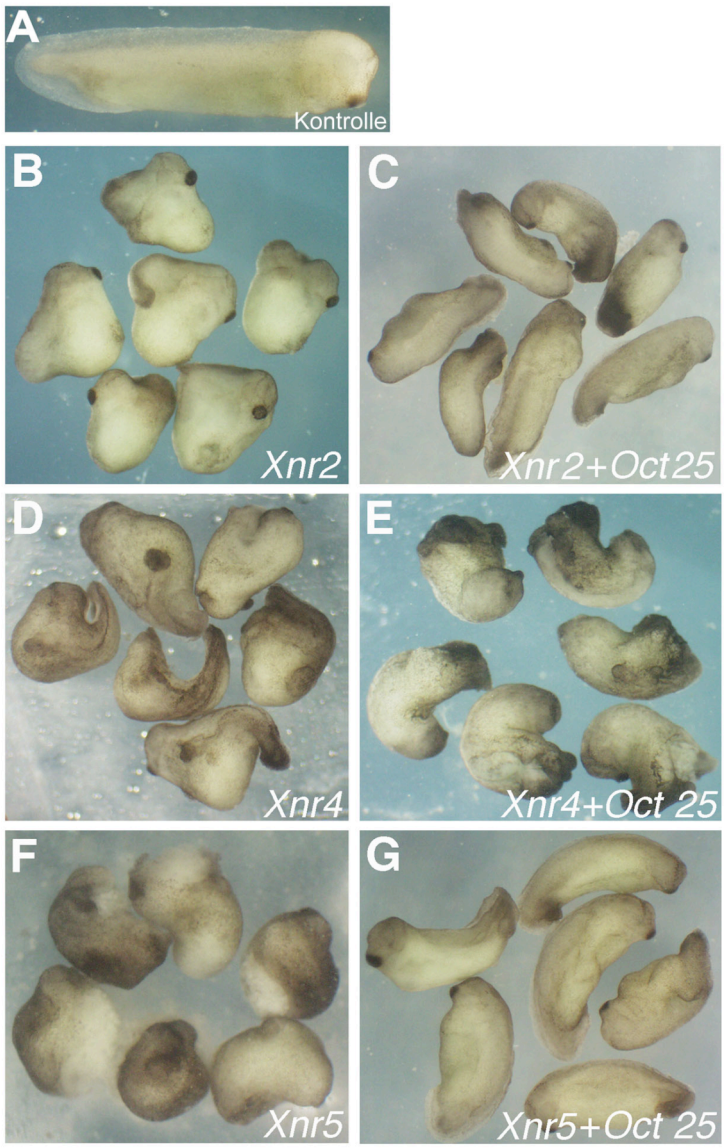


Abb. 4: Oct25 blockiert die Aktivität der Nodals im Embryo. Im Vergleich zu einem nichtinjizierten Kontrollembryo im Stadium 32 (A) führt die Injektion von *Xnr2* (B), *Xnr4* (D) oder *Xnr5* (F) RNA in die beiden ventral-vegetalen Zellen im 8-Zell-Stadium zu einer Dorsalisierung des Embryos. Eine Koinjektion von *Oct25* mit *Xnr2* (C), *Xnr4* (E) oder *Xnr5* (G) unterdrückt den dorsalisierenden Effekt der Nodals.

Die bilaterale Injektion von jeweils 10 pg *Xnr2* (Abb. 4B), *Xnr4* (Abb. 4D) oder *Xnr5* RNA (Abb. 4F) in die ventral-vegetalen Blastomeren von Achtzellern führte aufgrund ihres bereits

beschrieben dorsalisierenden Einflusses (Jones et al., 1995; Joseph und Melton, 1997) zu einer mehr oder minder ausgeprägten Doppelachse in 92% (n=36), 83% (n=36) bzw. 100% (n=31). Nach Koinjektion von 300 pg *Oct25* RNA mit 10 pg *Xnr2* RNA wurden in 54% der Embryonen (n=52) keine Doppelachsen mehr ausgebildet (Abb. 4C). Bei einer gemeinsamen Injektion von 300 pg *Oct25* und *Xnr4* RNA unterblieb die Ausbildung der Doppelachse in 64% (n=44) der injizierten Embryonen (Abb. 4E). Allerdings zeigten die revertierten Embryonen eine Reduktion ihrer posterioren Strukturen. In 79% der Embryonen (n=56) schien eine Koinjektion mit 300 pg *Oct25* RNA den dorsalisierenden Einfluss von Xnr5 (Abb. 4F) zu blockieren und zu einer fast normalen Entwicklung zu führen (Abb. 4G). Es konnte somit belegt werden, dass Oct25 die Aktivitäten der Mesendoderm-induzierenden Nodals inhibiert.

3.1.5. Funktioneller Knockdown von *Oct25* und *Oct60* führen zu einer verstärkten Ausbildung mesendodermaler Gewebe

Als nächstes wurden die Auswirkungen des funktionellen Knockdowns des endogenen *Oct25* und *Oct60* nach Injektion von Morpholino *antisense* Oligonukleotiden (MO) untersucht. Dafür wurde ein Morpholino (Oct25MO) gewählt, das einen Knockdown beider pseudoalleler Versionen des *Oct25* Gens (GenBank Acc. No.: AJ699165 und BC079821) bewirkt. Für *Oct60* wurden zwei MOs ausgesucht (Oct60MOa1 und Oct60MOb1), um die Translation beider Pseudoallele (Acc. No.: X86377 und CA972414) separat zu blockieren.

Vor der eigentlichen Knockdown-Studie wurde die Effizienz der Morpholinos auf *in vivo* durchgeführte Proteinexpression getestet. Mittels Immunoblots konnte gezeigt werden, dass Oct25MO die Proteinexpression des endogenen Oct25 effizient blockiert (Abb. 5A) und dass auch Oct60a1 die Translation eines Oct60MT Fusionsproteins (Abb. 5B) verhindern kann. Die Effizienz des Oct60MOb1 konnte *in vitro* nicht bewiesen werden, da für die Sequenz des *Oct60* Pseudoallels nur ESTs zu finden sind (Acc. No.: CA972414) und der komplette ORF noch nicht bekannt ist. Daher wurde mit einem Gemisch beider Oct60MOs gearbeitet, um die gleiche Quantität beider Morpholinos zu erhalten. Es wurden Injektionen von 20 ng Oct25MO, 50 ng Oct60MOs oder einem Gemisch von 15 ng Oct25MO und 40 ng Oct60MOs in alle Blastomeren eines 4-Zell-Embryos durchgeführt. Die Kontrollembryonen, die mit 50 ng ctrlMO injiziert waren, bildeten einen normalen Blastoporus, der zum Ende der Gastrulation komplett geschlossen ist (Abb. 5C). Dagegen zeigten 100% der Oct25MO- (Abb. 5D; n=41), 95% der Oct60MOs- (Abb. 5E; n=39) bzw. 100% der Oct25MO und Oct60MOs-

(Abb. 5F; n=43) injizierten Embryonen einen Blastoporus, der weit offen blieb und sich bis zum Ende der Gastrulation nicht schließen konnte.

Aufgrund der Tatsache, dass eine Überexpression von Oct25 oder Oct60 in Embryonen zu einer Unterdrückung des Mesendoderms führt (Abb. 1A, 1B und 3), liegt die Vermutung nahe, dass in Embryonen mit Oct25- und/oder Oct60-Funktionsverlust eine verstärkte Mesendodermbildung hervorgerufen wird. Eine Whole Mount *in situ* Hybridisierung Morpholino injizierter Embryonen zeigte gegenüber den ctrlMO injizierten Embryonen (Abb. 5G und I) eine Ausbreitung der Expressionsdomänen von *Xbra* und *XSox17α* in Richtung des animalen Poles (Abb. 5H und J). Bei einer Betrachtung der Embryonen von der lateralen Seite oder der dazugehörenden Schnitte konnte eine Verbreiterung der Expressionsdomäne beobachtet werden. Das lässt vermuten, dass mehr Mesendoderm gebildet wird, das sich zum animalen Pol der Embryonen ausbreitet.

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden Explantate der äquatorialen Region im Stadium 9 geschnitten und bis Stadium 11 kultiviert. Anschließend wurde die Expression mesendodermaler Gene unter Benutzung der real time RT-PCR Technik analysiert. Sowohl für die mesodermalen Marker *Xbra*, *Xwnt8* und *Goosecoid*, als auch für die endodermalen Gene *XSox17α*, *Mixer*, *Cerberus* und *Xhex* konnte nach Oct25MO und Oct60MOs Injektion im Vergleich zu ctrlMO-Explantaten eine gesteigerte Expression festgestellt werden (Abb. 5K). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es nach funktionellem Knockdown der POU-V Faktoren in *Xenopus* zu einer verstärkten Mesodermbildung im animalen Bereich kommt und dass das Endoderm ektopisch in der äquatorialen Region eines gastrulierenden Embryos induziert wird.

Des Weiteren wurde in animalen Kappen von Embryonen mit Oct25-Funktionsverlust nach Veränderung der neuroektodermalen Genexpression gesucht. Die animalen Explantate wurden im Stadium 8,5 von Embryonen geschnitten, die nahe dem animalen Pol in alle Blastomeren des 4-Zell-Stadiums mit 20 ng ctrlMO oder Oct25MO injiziert worden waren. Die Kappen wurden bis Stadium 10,5 kultiviert und für die real time RT-PCR verwendet (Abb. 5L). Im Unterschied zur POU-V Überexpression (Abb. 2) konnte eine deutlich verminderte Expression für *XSox2* detektiert werden. Die Menge der Transkripte der neuroektodermalen Gene *XSox3*, *Zic1* und *Geminin H* wurde allerdings nicht beeinflusst. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Oct25 für die Regulation von *XSox2*, das für die Aufrechthaltung der Identität neuraler Vorläuferzellen verantwortlich ist, essentiell ist.

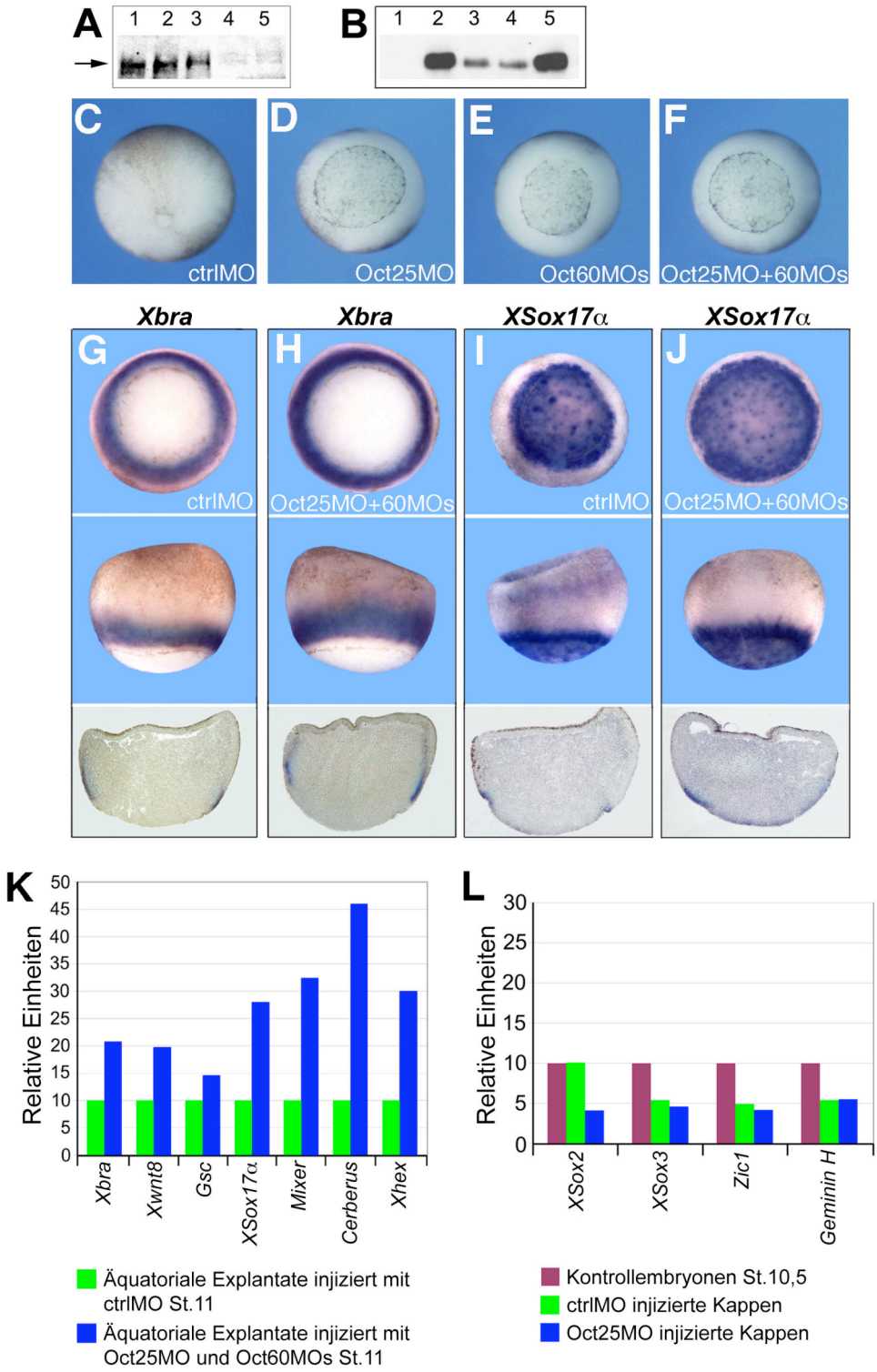


Abb. 5: Der funktionelle Knockdown von Oct25 oder Oct60 führt zu einer Expansion des Mesendoderms in Richtung des animalen Poles. (A) Ein unter Benutzung eines Oct25-Peptidantikörpers durchgeführter Immunoblot zeigt die spezifische Inhibierung der Proteinexpression von Oct25 (Bande markiert durch Pfeil) durch Oct25MO in Embryonen. Spur 1: Nichtinjizierte Kontrollembryonen, St. 10; Spur 2 und 3: Mit 10 und 15 ng ctrlMO injizierte Embryonen; Spur 4 und 5: mit 10 und 15 ng Oct25MO injizierte Embryonen. (B) Der Immunoblot zeigt die spezifische Inhibition der Oct60MT-Proteinexpression durch Oct60MOa1 mit Hilfe eines gegen die Myc-Markierung gerichteten Antikörpers. Spur 1: Animale Kappen nichtinjizierter Kontrollembryonen, St. 10; Spur 2: Kappen von mit 400 pg *Oct60MT* RNA injizierten Embryonen. Spur 3 und 4: Kappen von *Oct60MT* RNA mit 20 oder 40 ng Oct60MOa1 koinjizierten Embryonen; Spur 5: Kappen von *Oct60MT* RNA mit 40 ng ctrlMO koinjizierten Embryonen. (C) Ein ctrlMO injizierter Embryo in der posterioren Ansicht spiegelt eine normal verlaufende Entwicklung mit am Ende der Gastrulation geschlosse-

nem Blastoporus wider. Die mit Oct25MO (D), Oct60MOs (E) oder einem Gemisch beider (F) injizierten Embryonen lassen einen fehlenden Blastoporusschluss erkennen. Mittels Whole Mount *in situ* Hybridisierungen (obere Reihe: Vegetale Ansicht; mittlere Reihe: Laterale Ansicht; untere Reihe: Gewebsschnitt) werden die normalen Expressionsmuster von *Xbra* (G) und *XSox17α* in ctrlMO injizierten Embryonen verdeutlicht. (H) In Oct25MO und Oct60MOs koinjizierten Embryonen zeigt sich eine Verbreiterung der *Xbra* Expressionsdomäne (H) in Richtung des animalen Poles und eine Verstärkung der Expressionsdomäne von *XSox17α* (J) sowie eine Ausdehnung in die äquatoriale Region. (K) Real time RT-PCR Analysen lassen eine deutlich erhöhte Expression mesodermaler Gene und ektopische Expression von endodermalen Genen in äquatorialen Explantaten von Oct25MO und Oct60MOs koinjizierten Embryonen erkennen. (L) Für das neuroektodermale Gen *XSox2* wird mit Hilfe von real time RT-PCR Untersuchungen nach Oct25MO Injektion eine verringerte Expression deutlich.

3.1.6. mOct3/4 kann den Funktionsverlust von Oct25 und Oct60 ersetzen

Bereits in einer vorangegangenen Studie wurde die maternale Expression von *Xenopus Oct60* und *Oct25* beschrieben (Hinkley et al., 1992). Da darüber hinaus nach Überexpression von Oct25, Oct60 oder Oct3/4 die Ausbildung ähnlicher Phänotypen gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob der Phänotyp des Oct25- oder Oct60-Knockdowns durch Oct25, Oct60 oder mOct3/4 aufgehoben werden kann. Während ctrlMO injizierte Embryonen im Schwanzknospenstadium eine normale Entwicklung aufwiesen (Abb. 6A), waren bei den Oct25MO bzw. den Oct60MOs injizierten Embryonen schwere Entwicklungsdefekte im Bezug auf die Achsenbildung, Kopfstrukturen und den Schluss der Neuralfurchen zu finden (Abb. 6B und C). Im Gegensatz zur kombinierten Injektion beider Morpholinos, die einen verstärkten Phänotyp ohne jegliche Anzeichen einer Achsenentwicklung zeigte (Abb. 6D), war in den Einzelinjektionen der Morpholinos der anteriore Teil des Embryos etwas vergrößert. Nach Koinjektion des Oct25MOs mit 400 pg der *Oct25* RNA (Abb. 6E) bzw. nach Koinjektion der Oct60MOs mit 350 pg *Oct60* RNA (Abb. 6F) konnte bei 75% (n=40) bzw. 66% (n=38) der injizierten Embryonen eine beinahe normale wildtypische Entwicklung beobachtet werden. Daraus kann gefolgert werden, dass der mittels Knockdown erzeugte Phänotyp spezifisch ist. Experimente, in denen 200 pg *Oct25* RNA gemeinsam mit Oct60MOs (Abb. 6G) oder 200 pg *Oct60* RNA mit Oct25MO (Abb. 6H) injiziert wurden, zeigten eine Aufhebung des Phänotyps und eine Bildung der Körperachse in 74% (n=35) bzw. 82% (n=45) der Embryonen. Ebenso zeigten sich ein normaler ungehinderter Schluss der Neuralfurche sowie Kopf- und Schwanzstrukturen. Darüber hinaus konnte bei 90% (n=21) der Embryonen nach Koinjektion mit 300 pg *mOct3/4* ein revertierender Einfluss auf den Morpholino-Effekt von Oct25 (Abb. 6I) detektiert werden. In 78% (n=41) der Embryonen wurde nach Koinjektion mit 200 pg *mOct3/4* RNA der Effekt der Oct60MOs aufgehoben (Abb. 6J). Der mit Hilfe von mOct3/4 revertierte Phänotyp weist darauf hin, dass mOct3/4 und die maternal exprimierten POU-V Faktoren aus *Xenopus* während der frühen Embryogenese offensichtlich funktionell identisch sind.

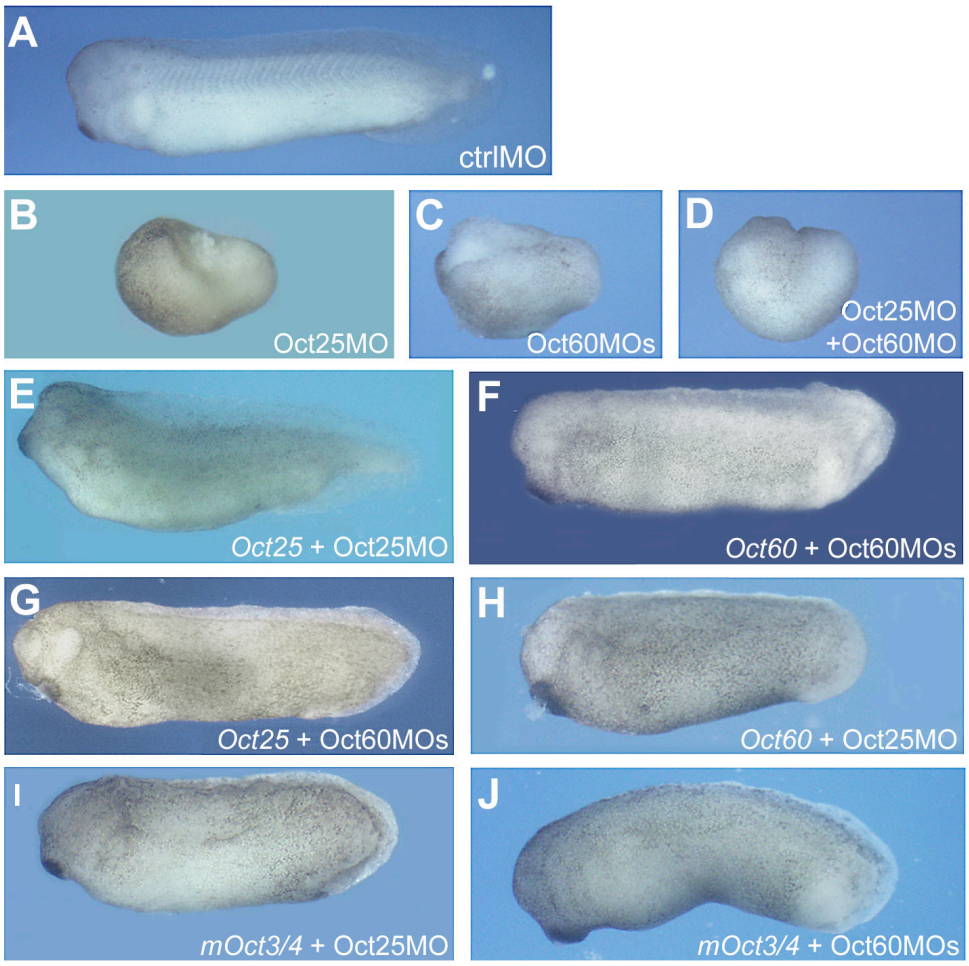


Abb. 6: Funktioneller Knockdown von Oct25 und von Oct60 kann durch mOct3/4 aufgehoben werden. (A) Ein mit ctrlMO injizierter Embryo im Schwanzknospenstadium zeigt eine normale Entwicklung. Im Vergleich dazu sind bei Embryonen, die mit Oct25MO (B) oder Oct60MOs (C) injiziert wurden, signifikante phänotypische Defekte zu beobachten. Eine Koinjektion von Oct25MO und Oct60MOs (D) verstärkt den durch Einzelinjektion erhaltenen Phänotyp. Durch Koinjektion mit *Oct25* RNA (E, G) oder *Oct60* RNA (F, H) werden die Phänotypen von Oct25MO (E, H) und Oct60MOs (F, G) revertiert. Auch koinjizierte *mOct3/4* RNA hebt den durch Oct25MO (I) oder Oct60MOs (J) verursachten Defekt auf.

3.1.7. Die maternal exprimierten POU-V Faktoren inhibieren die für die Keimblatt- und Musterbildung essentiellen Gene

In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass die POU-V Faktoren den Nodal Signalweg und folglich auch die Bildung des Mesendoderms inhibieren. Um den möglichen Einfluss der *POU-V* Gene bei der Entstehung der Keimblätter und die von ihnen übernommene Funktion zu klären, wurde in Überexpressions- und Funktionsverluststudien der *POU-V* Gene *Oct25, Oct60* und *Oct91* die Expression mesodermaler und endodermaler Induktoren untersucht.

Während der *Xenopus* Entwicklung werden die drei Mitglieder der POU-V Klasse differentiell exprimiert. *Oct60* wird lediglich maternal, *Oct25* wird sowohl maternal als auch

zygotisch und *Oct91* hingegen wird ausschließlich zygotisch transkribiert (Hinkley et al., 1992).

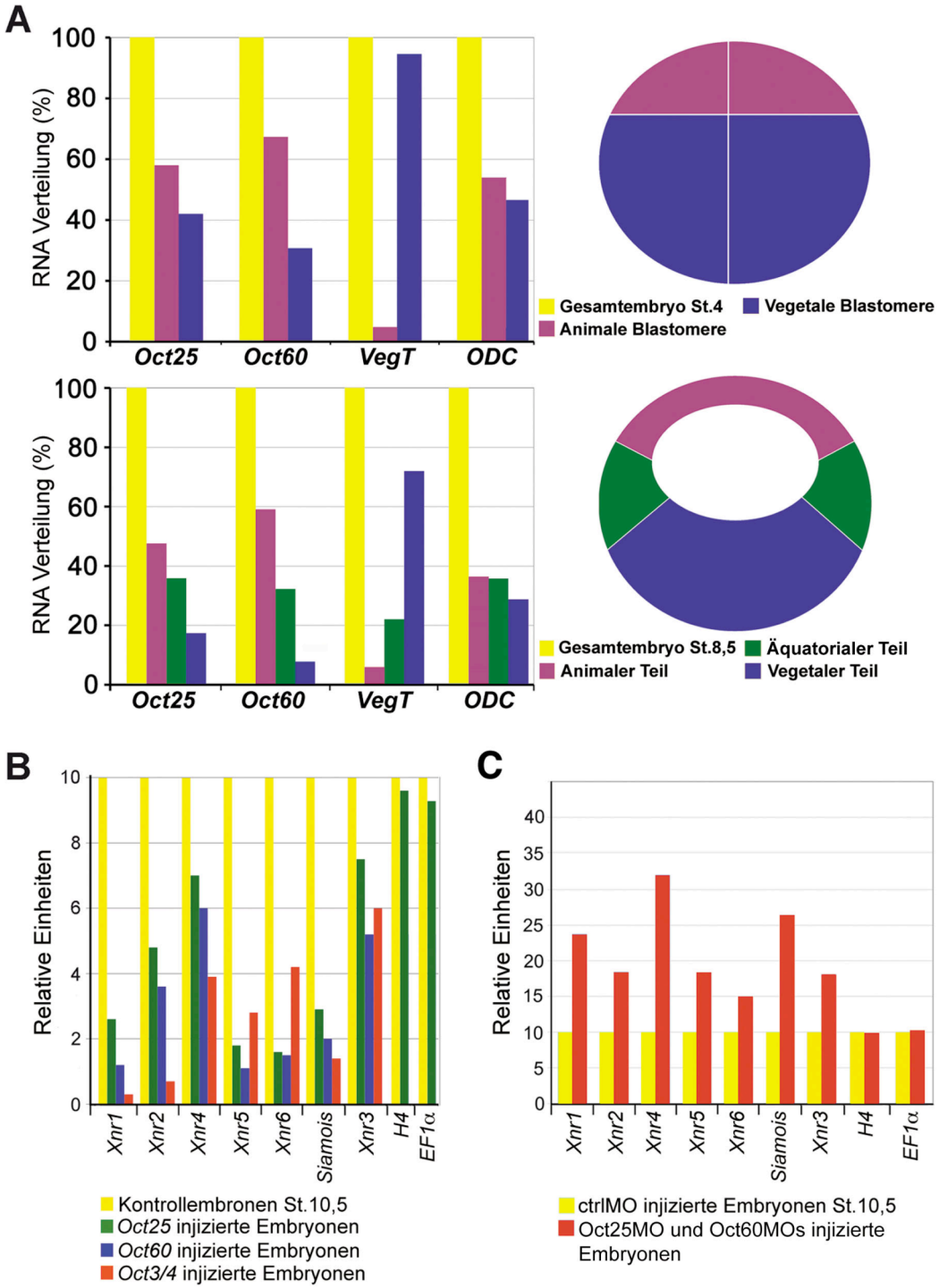


Abb. 7: Maternale POU-V Faktoren regulieren die Transkription der *Xnrs* und von *Siamois*. (A) Verteilung von *Oct25*, *Oct60* und *VegT* in 8-Zell- und Blastula-Embryonen. Die animalen und vegetalen Blastomeren von Embryonen im Stadium 4 und die animalen, äquatorialen und vegetalen Teile von Embryonen im Stadium 8,5 wurden voneinander getrennt und per real time RT-PCR untersucht. Die Quantifizierung und Normalisierung der Expressionsmengen erfolgt zur Gesamtmenge an RNA und zum Expressionsspiegel in ganzen Embryonen. Eine Gesamtmenge von jeweils 400 pg *Oct25*, *Oct60* oder *mOct3/4* RNA wurde in die vegetalen Blastomeren eines 8-Zell-Embryos (B) bzw. ein Gemisch von 15 ng Oct25MO und 40 ng Oct60MOs in die äquatoriale Region der 4 Blastomeren im 4-Zell-Stadium (C) injiziert. Die Kontrollen und injizierten Embryonen wurden im Stadium 10,5 abgesammelt und über real time RT-PCR analysiert.

Oct60 Transkripte wurden zum größten Teil in der animalen Hälfte und zu einem geringeren Anteil in der vegetalen Hälfte der reifen Oozyten detektiert (Hinkley et al., 1992).
Die vegetale Hälfte ist eine Quelle primärer Keimblattinduktoren, wie z.B. VegT. Obwohl in frühen Teilungsstadien weniger Transkripte von *Oct25* als von *Oct60* vorhanden sind, konnte mit Hilfe von Immunoblots gezeigt werden, dass auch Oct25 Protein im Embryo vorliegt (Daten sind hier nicht gezeigt). Wie die Transkripte von *Oct25* und *Oct60* in frühen Teilungsstadien regional verteilt sind, wurde mit Hilfe der real time RT-PCR-Technik in 8-Zell-(Stadium 4) und Blastula-Embryonen (Stadium 8,5) untersucht. In Stadium 4 ist die RNA von *Oct25* bzw. *Oct60* vermehrt in den animalen Blastomeren zu finden (Abb. 7A). Im Stadium 8,5 sind die meisten Transkripte ebenfalls animal angereichert, allerdings können auch in den äquatorialen und vegetalen Regionen Transkripte nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu wurde die Lokalisation der *VegT* RNA abgebildet, deren Hauptanteil am vegetalen Pol vorliegt. Obwohl *Oct25* und *Oct60* eine zu *VegT* gegensätzliche Verteilung zeigten, überlappten sie mit diesem in der vegetalen-äquatorialen Region des Embryos, in der das Mesoderm und das Endoderm gebildet werden.
Eine ektopische Expression von *Oct25*, *Oct60* und ihres Orthologen *Oct3/4* aus Maus (*mOct3/4*) in den vegetalen Bereichen der Embryonen, in denen normalerweise nur eine geringe Menge *POU-V* RNA detektiert werden konnte, zeigte im Stadium 10,5 eine starke Repression der *Nodals* (*Xnr1-6*) und des *Siamois* Gens (Abb. 7B). Sowohl von den *Nodals* als auch von *Siamois* ist bekannt, dass sie für die Keimblattentstehung und Musterbildung verantwortlich sind. Im Gegensatz dazu führte der funktionelle Knockdown von Oct25 und Oct60 nach Injektion des Morpholinogemischs in die äquatoriale Region der Embryonen zu einer gesteigerten Expression von *Xnrs* und *Siamois* (Abb. 7C). Weder bei der Überexpression noch bei den Funktionsverlustanalysen konnte eine veränderte *H4* und *EF1a* Transkription beobachtet werden. Dies wäre der Fall gewesen, wenn POU-V Proteine einen generellen Effekt auf die Transkription ausüben würden. Folglich zeigen die Experimente, dass die Expression von *Xnrs* und *Siamois* während der Gastrulation spezifisch durch die POU-V Proteine inhibiert werden kann.

3.1.8. Die Überexpression von Oct25 oder Oct60 inhibiert in animalen Kappen die Transkription der Zielgene von VegT und β-Catenin

POU-V Proteine inhibieren offensichtlich die Expression von Faktoren, die für die Mesendodermbildung benötigt werden. Da diese Faktoren in erster Linie durch maternales VegT und β-Catenin aktiviert werden, stellt sich die Frage, ob Oct25 bereits einen

inhibierenden Einfluss auf die induzierende Aktivität von überexprimiertem VegT und β-Catenin in animalen Kappen ausübt.

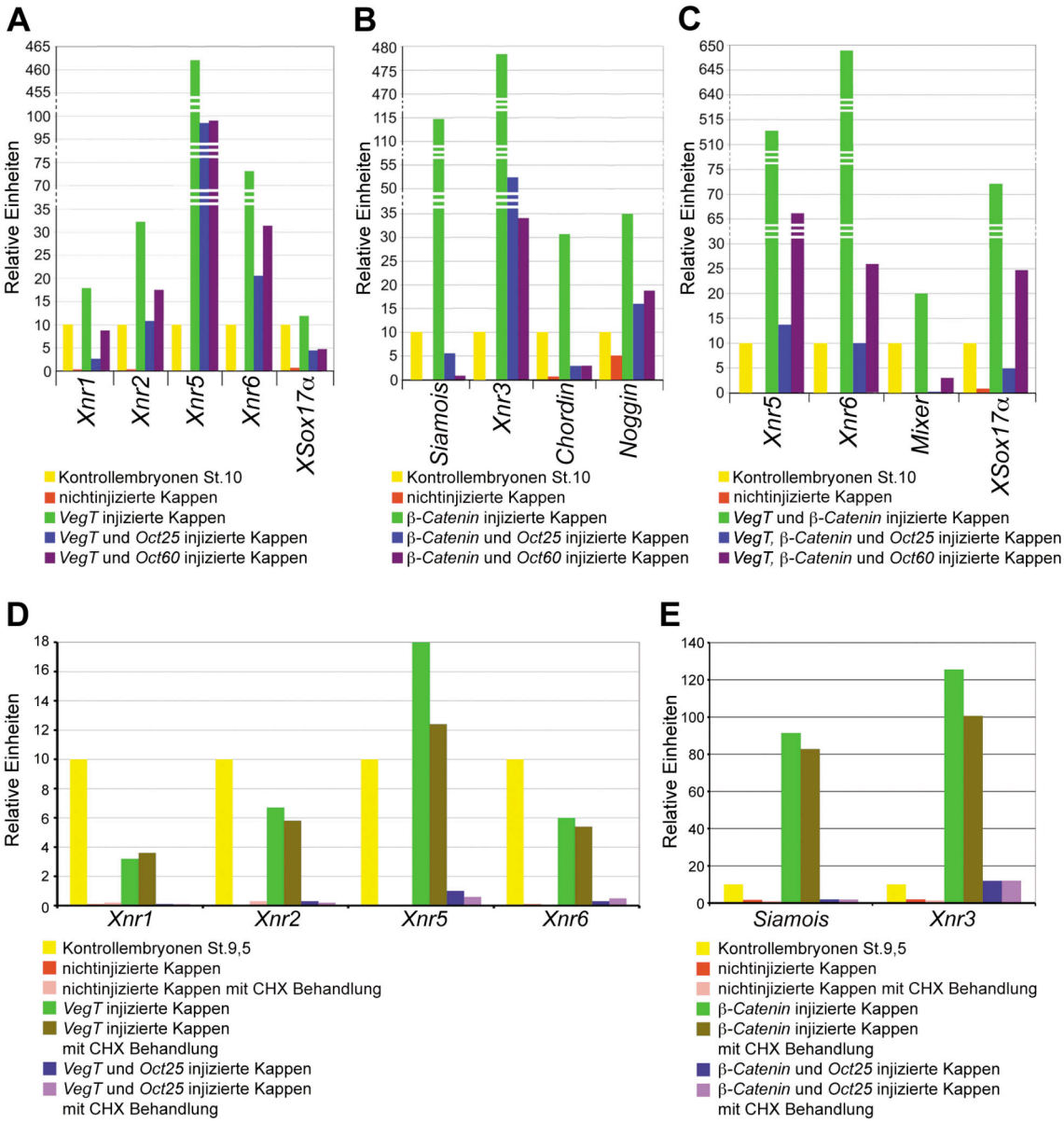


Abb. 8: Oct25 und Oct60 antagonisieren die induzierenden Aktivitäten von VegT und β-Catenin. (A-C) Mit Hilfe von real time RT-PCR Analysen wird gezeigt, dass eine Injektion von 600 pg *Oct25* oder *Oct60* RNA in die animale Region eines Embryos im 4-Zell-Stadium die Gene, die durch 500 pg *VegT* allein (A), 500 pg *β-Catenin* allein (B) und ebenfalls durch einen synergistischen Effekt von 200 pg *VegT* und 200 pg *β-Catenin* RNA (C) in animalen Kappen aktiviert werden, inhibiert. Die durch Oct25 vermittelte Repression ist ein direktes Ereignis, da die von VegT (D) und β-Catenin (E) positiv stimulierten Zielgene auch nach einer Behandlung mit Cycloheximid (CHX) durch überexprimiertes Oct25 inhibiert werden.

Mittels real time RT-PCR konnte gezeigt werden, dass die nach Überexpression von VegT erzielte Stimulation der *Xnrs*, *Mixer* und *XSox17α* Transkription durch eine Koinjektion mit *Oct25* oder *Oct60* RNA drastisch reduziert wurde (Abb. 8A). Als nächstes wurde der Einfluss von Oct25 auf die Aktivierung von β-Catenin Zielgenen untersucht. Auch hier zeigte sich,

dass ein Koinjektion von *β-Catenin* mit *Oct25* oder *Oct60* RNA zu einer reduzierten Aktivierung von *Xnr3*, *Siamois*, *Chordin* und *Noggin* gegenüber der alleinigen Injektion von *β-Catenin* RNA führte (Abb. 8B). In *Xenopus* wurde zusätzlich eine synergistische Wirkung von VegT und β-Catenin beschrieben (Takahashi et al., 2000). Dieser Synergismus resultiert während der Blastula-Stadien in einer Erhöhung der mesendodermalen Transkription im dorsalen Endoderm, einer Region, die auch als Nieuwkoop Center bekannt ist. Nachdem geringe Mengen von *VegT* und *β-Catenin* RNA koinjiziert wurden, zeigte sich in animalen Kappen eine wesentlich stärkere Induktion von *Xnr5*, *Xnr6*, *Mixer* und *XSox17α*, als nach Injektion einer größeren Menge *VegT* RNA alleine (Abb. 8A und C). Eine zusätzliche *Oct25* bzw. *Oct60* RNA Koinjektion führte zu einer deutlich verminderten Expression dieser Zielgene (Abb. 8C). Folglich wirken sowohl Oct25 als auch Oct60 nicht nur auf die individuelle sondern auch auf die synergistische Funktion von VegT und β-Catenin supprimierend. Diese Ergebnisse könnten entweder durch eine direkte Interaktion von Oct25 mit VegT oder β-Catenin oder aber indirekt durch andere neusynthetisierte Faktoren vermittelt werden. Letzteres kann allerdings aufgrund der Tatsache, dass die Koinjektion der RNA von *VegT* oder *β-Catenin* mit *Oct25* in Gegenwart des Proteinbiosyntheseinhibitors Cycloheximid (CHX) immer noch zu einer Unterdrückung der Aktivierung der Zielgene führt, ausgeschlossen werden (Abb. 8D und E).

VegT als Aktivator von Genen für die Mesendoderminduktion verhält sich als Antagonist von Oct25 und entspricht in seiner Wirkung einem Oct25-Knockdown. Daher wurde mit einer VegT Überexpression versucht, den durch Injektion von *Oct25* bzw. *Oct60* RNA in Embryonen verursachten Gastrulationsphänotyp aufzuheben (Abb. 9). Im Gegensatz zu den nichtinjizierten Kontrollembryonen (Abb. 9A und B), resultierte eine vegetal injizierte *Oct25* (Abb. 9C und D) oder *Oct60* RNA (Abb. 9G und H) in einem fehlenden Blastoporus während der Gastrulation und später in einer deutlichen Reduktion der Körperachse. Hingegen führte eine Koinjektion von *VegT* RNA mit *Oct25* (Abb. 9E und F) oder *Oct60* RNA (Abb. 9I und J) zu einer fast normalen Entwicklung des Blastoporus und einer deutlich erkennbaren Körperachse bei den meisten Embryonen. Folglich kann VegT den phänotypischen Effekt von Oct25 und Oct60 unterdrücken.

Da β-Catenin an sich keine Mesoderm-induzierende Aktivität aufweist und die Entstehung des Blastoporus nicht beeinflusst, wurde nicht versucht, die durch Oct25 oder Oct60 Überexpression hervorgerufenen Gastrulationsphänotypen mit β-Catenin zu revertieren. Jedoch wurde bei einem gegenläufigen Experiment versucht, die durch Injektion der *β-*

Catenin RNA in die ventral-vegetalen Blastomeren induzierten Doppelachsen (Abb. 9K) durch Koinjektion mit *Oct25* oder *Oct60* RNA zu unterdrücken. In der Tat zeigte sich, dass die Entstehung der zweiten Körperachse sowohl durch Oct25 als auch durch Oct60 unterdrückt wurde (Abb. 9L und M). Somit inhibieren die maternalen POU-V Faktoren auch die Aktivität von β-Catenin, eine Doppelachse zu induzieren.

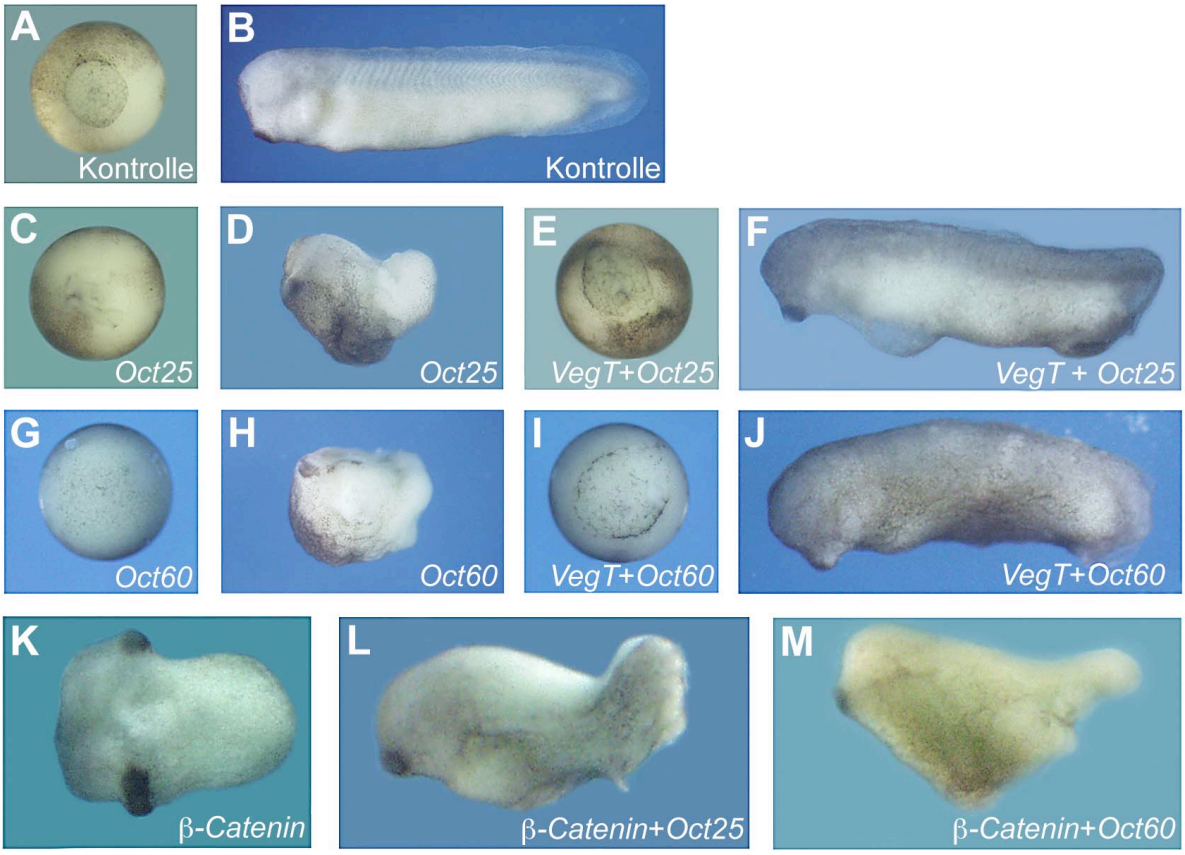


Abb. 9: Der Überexpressionsphänotyp von Oct25 sowie von Oct60 wird mit VegT revertiert. Nichtinjizierte Kontrollembryonen in der Gastrulation (A) und dem Schwanzknospenstadium (B) zeigen eine normal verlaufende Entwicklung. Die mit 400 pg *Oct25* (C, D) oder *Oct60* (G, H) RNA vegetal injizierten Embryonen zeigen Entwicklungsdefekte während der Gastrulation (C, G) und der Körperachsenbildung (D, H). Sowohl die phänotypischen Auswirkungen von Oct25 (C, D) als auch von Oct60 (G, H) können durch eine Koinjektion mit 700 pg *VegT* RNA aufgehoben werden. Die revertierten Embryonen zeigen eine Bildung des Blastoporus (E, I) und eine fast normale Körperachsenbildung im Schwanzknospenstadium (F, J). (N-P) Die POU-V Faktoren unterdrücken die durch β-Catenin induzierte Bildung einer sekundären Achse. (N) Die ventral-vegetale Injektion von 400 pg *β-Catenin* RNA führt zu einer Duplikation der Körperachse. 400 pg koinjizierte *Oct25* (L) bzw. *Oct60* RNA (M) unterdrücken die Induktion der zweiten Achse.

3.1.9. Interaktionen zwischen Oct25, VegT und Tcf3

Zur Aufklärung des Mechanismus, über den die POU-V Faktoren die durch VegT und β-Catenin induzierte Zielgenaktivierung unterdrücken, wurde eine direkte Interaktion von Oct25 mit VegT und/oder mit Komponenten des β-Catenin Signalwegs überprüft. Zuerst konnte mit Hilfe von GST-Pulldown Analysen, bei denen radioaktiv markiertes VegT und GST-markiertes Oct25 Fusionsprotein sowie radioaktiv markiertes Oct25 und GST-markiertes

VegT Fusionsprotein eingesetzt wurde, eine Komplexbildung zwischen Oct25 und VegT (Abb. 10A) dargestellt werden. Hingegen war es nicht möglich, eine direkte Interaktion zwischen Oct25 und β-Catenin nachzuweisen. Unter Einbeziehen der Komponenten des β-Catenin Signalwegs konnte jedoch eine Interaktion zwischen Oct25 und Tcf3 aufgedeckt werden. Bei Tcf3 handelt es sich um einen Signalüberträger, der für die Etablierung der dorsalen Körperachse zuständig ist (Molenaar et al., 1996; Roel et al., 2002). Durch eine Oct25/Tcf3-Komplexbildung scheint die Interaktion zwischen β-Catenin und Tcf3 nicht beeinflusst zu werden, denn radioaktiv markiertes β-Catenin konnte mittels des Fusionsproteins GST/Oct25 über unmarkiertes Tcf3 präzipitiert werden (Abb. 10A, Bild rechts). Das würde bedeuten, dass Oct25, Tcf3 und β-Catenin miteinander zu einem ternären Komplex reagieren können. Es besteht nicht nur eine Interaktion zwischen Oct25 und VegT oder Oct25 und Tcf3, sondern auch zwischen VegT und Oct60 bzw. Oct91, respektive Tcf3 und Oct60 bzw. Oct91 (Abb. 10B). Darüber hinaus wurde auch das Orthologe in Säugern, Oct3/4, als Interaktionspartner der beiden *Xenopus* Proteine VegT und Tcf3 identifiziert (Abb. 10B). Anhand dieser Ergebnisse kann gefolgert werden, dass die Inhibition der primären Keimblattbildung durch die POU-V Faktoren auf einem während der Evolution konservierten Mechanismus beruht und wahrscheinlich auch in Säugetieren existiert.

Des Weiteren wurde auch in diesem Zusammenhang und aufgrund des existierenden Synergismus zwischen VegT und β-Catenin (siehe 3.1.8) überprüft, ob VegT an β-Catenin oder Tcf3 binden kann. Dabei wurde eine Bindung zwischen VegT und Tcf3, aber nicht zwischen VegT und β-Catenin nachgewiesen (Abb. 10C).

Der nächste Schritt war die Identifikation der innerhalb von VegT und Tcf3 gelegenen Regionen, die für die Interaktionen verantwortlich sind (Abb. 10D). Eine Komplexbildung zwischen VegT und Tcf3 scheint nicht auf den N-terminalen Teil von Tcf3 (1-190AS) angewiesen zu sein, sondern zeigte eine Bindung mit den verbleibenden Regionen von Aminosäure 191-397 und 398-551. Innerhalb dieser zur Bindung notwendigen Region wurden bereits die Bindungsdomänen für Groucho und für die HMG-Box identifiziert (Hurlstone und Clevers, 2002). Dagegen bindet Tcf3 an den N-Terminus (AS 1-230) von VegT, der die DNA-Bindungsdomäne enthält. Eine Interaktion mit dem C-terminalen Ende von VegT (AS 231-456), die für die Transaktivierung essentiell ist (Conlon et al., 2001), wurde nicht beobachtet.

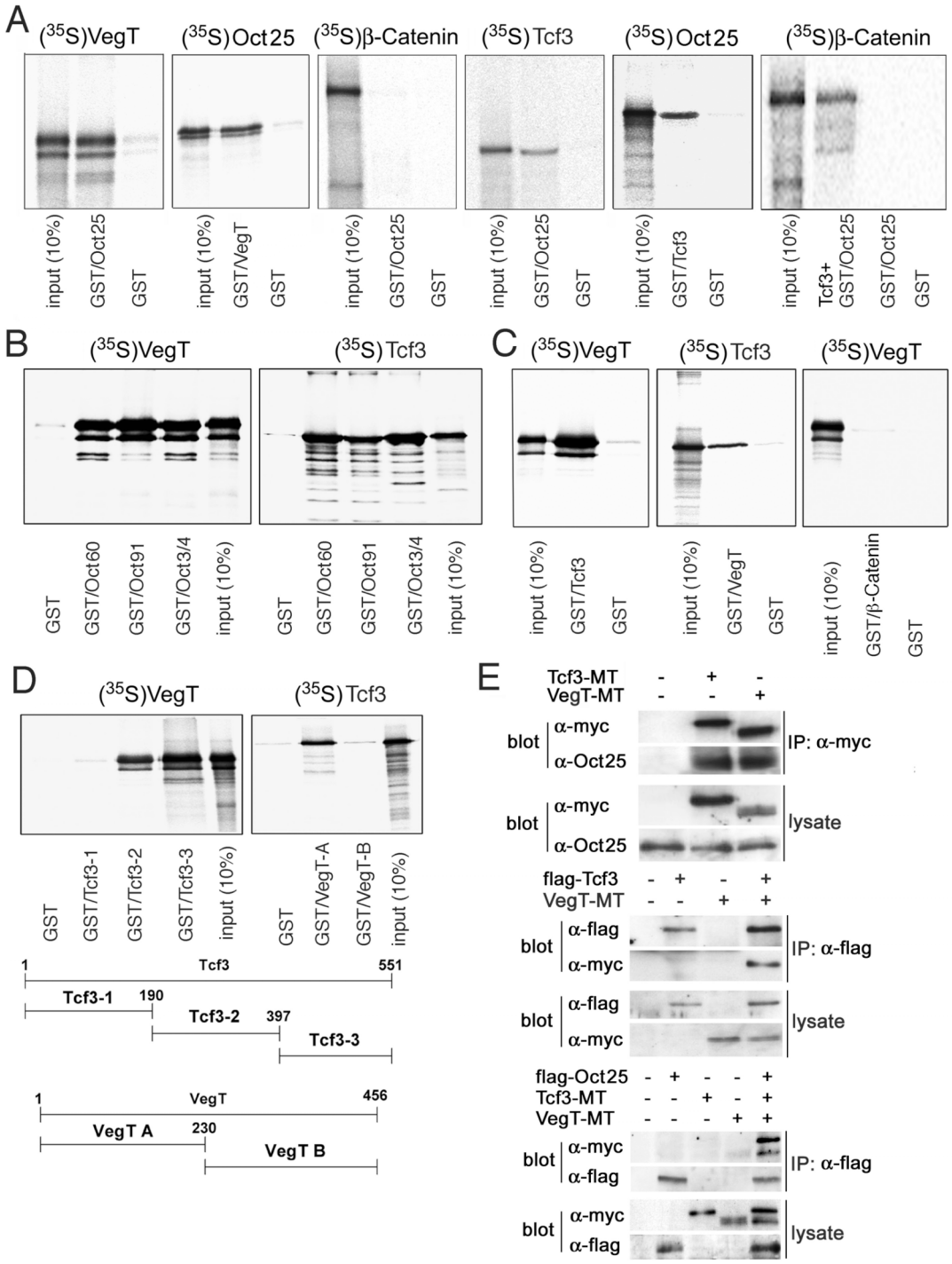


Abb. 10: GST-Pulldown und Immunopräzipitation belegen Interaktionen zwischen Oct25, VegT und Tcf3. (A) Radioaktiv markiertes VegT bindet GST/Oct25-Fusionsprotein und umgekehrt. β-Catenin kann keine Interaktion mit GST/Oct25 eingehen. Radioaktiv markiertes Tcf3 bildet einen Komplex mit GST/Oct25 und umgekehrt. Unter Zugabe von *in vitro* translatiertem, nicht markiertem Tcf3 präzipitiert markiertes β-Catenin mit GST/Oct25. (B) Sowohl VegT als auch Tcf3 binden ebenfalls an Oct60, Oct91 und Oct3/4. (C) Eine Interaktion wird auch zwischen radioaktiv markiertem Tcf3 und dem GST/VegT-Fusionsprotein und umgekehrt, aber nicht zwischen VegT und GST/β-Catenin beobachtet. (D) VegT kann nicht mit der Aminosäureregion von 1-190, aber sowohl mit der Region von 191-397, als auch mit der Region von 398-551 interagieren. Dagegen geht Tcf3 einen Komplex mit dem N-Terminus (1-120 AS), aber nicht mit dem C-Terminus (121-456 AS) von VegT ein. (E) In Koimmunopräzipitationen wird mittels eines Antikörpers gegen Myc (IP: α-myc) endogenes Oct25 sowohl mit Myc-markiertem Tcf3 (Tcf3-MT) als auch mit VegT (VegT-MT) präzipitiert. Unter Verwendung eines Antikörpers gegen die Flag-Markierung (IP: α-flag) wurde ein Komplex von Flag-markiertem Tcf3 (flag-Tcf3) und VegT-MT sowie ein ternärer Komplex zwischen Flag-markiertem Oct25 (flag-Oct25), Tcf3-MT und VegT-MT präzipitiert.

Mittels Koimmunopräzipitationen konnten unter Verwendung von Fusionsproteinen die *in vitro* erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden. Es wurde gezeigt, dass sowohl VegT als auch Tcf3 endogenes Oct25 präzipitieren und dass Tcf3 eine Präzipitation von VegT hervorruft (Abb. 10E). Ebenfalls wurde zwischen Oct25, VegT und Tcf3 die Bildung eines ternären Komplexes nachgewiesen (Abb. 10E). Zusammenfassend konnte eine direkte Interaktion der drei maternalen Faktoren Oct25, VegT und Tcf3 *in vitro* und *in vivo* dargestellt werden.

3.1.10. Oct25, VegT und Tcf3 bilden Komplexe auf den Promotoren von *Xnr1* und *Siamois*

Als nächstes wurde untersucht, wie die Promotoren der VegT aktivierten Gene durch Oct25 reguliert werden. Daher wurde der Promotor des VegT Zielgens *Xnr1* in der Region zwischen -907/-5 isoliert (Hyde und Old, 2000) und EMSAs durchgeführt. Der *Xnr1* Promotor enthält die T-Box-Bindungsstellen, die für die Aktivierung durch VegT (Hyde und Old, 2000) benötigt werden. Hierbei bindet VegT an die erste Hälfte der T-Box-Bindungsstelle. Zusätzlich enthält der Promotor eine putative TCF/LEF- und eine Oct-Bindungsstelle (Abb. 11A). Mit Hilfe der EMSAs wurde eine Bindung von Oct25, das entweder bakteriell exprimiert oder aus embryonalen Proteinextrakten gewonnen wurde, an DNA-Fragmenten (-103/-182) mit den spezifischen Oct-Bindungsstellen des *Xnr1* Promotors analysiert (Abb. 11B und C). Die schmale Bande, die in Proteinextrakten nichtinjizierter Embryonen zu erkennen war, wurde durch die Injektion von *Oct25* RNA deutlich verstärkt. Dagegen konnte in Extrakten von Morpholino injizierten Embryonen und unter Verwendung einer mutierten Oct-Bindungsstelle keine Bande mehr detektiert werden (Abb. 11C). Dass neben der Bindung von Oct25 auch GST-Fusionsproteine von Oct60 und Oct3/4 an das die Oct-Bindungsstelle enthaltene Promotorfragment binden konnten (Abb. 11D), unterstützt erneut die Theorie, dass der gleiche Mechanismus zur Regulation der Genexpression benutzt wird. Ebenfalls konnte die Bindung von Tcf3 an ein DNA-Fragment, das die TCF/LEF-Bindungsstelle enthielt, bestätigt werden (Abb. 11E). Die Mutationen der jeweiligen Bindungsstellen im *Xnr1* Promotor unterdrückten die Bindung von Oct25, VegT und Tcf3 Proteinen (Daten hier nicht gezeigt).

Im Folgenden wurde die Bildung von Komplexen auf den genannten Bindungsstellen des *Xnr1* Promotors untersucht. Als erstes zeigten die Analysen, dass zwar Oct25, aber weder VegT noch Tcf3 alleine eine Bindung mit der Oct-Bindungsstelle eingehen können (Abb. 11F und H). Jedoch kam es nach Zugabe steigender VegT- bzw. Tcf3-Mengen zu einem Supershift der Bande, die den Komplex zwischen Oct25 und dem Promotor widerspiegelt.

Die deutliche Reduktion der Komplexmobilität deutet auf die Bildung von Komplexen zwischen Oct25 und VegT bzw. Tcf3 auf der Oct-Bindungsstelle.

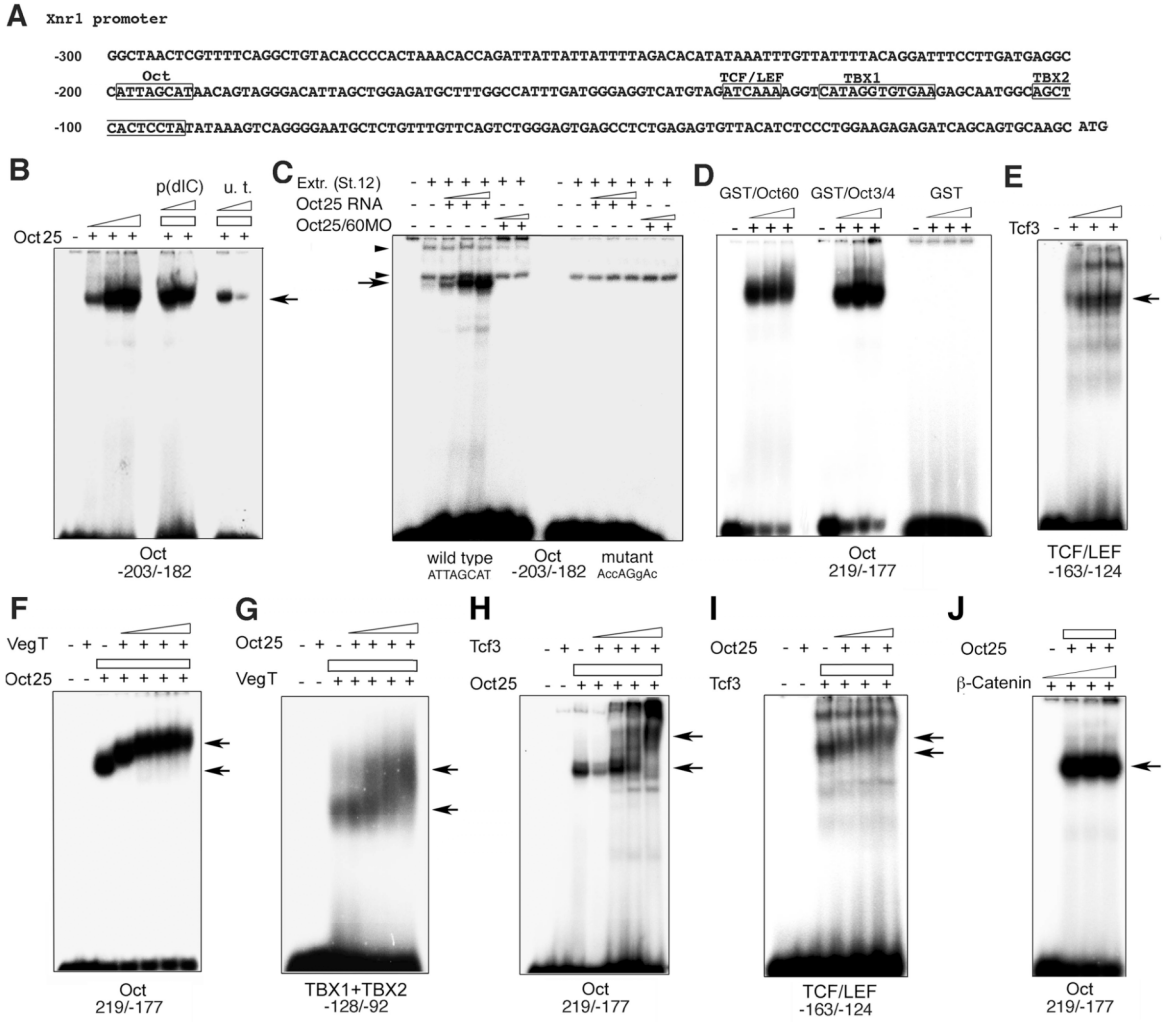


Abb. 11: Analyse des *Xnr1* Promotors mittels EMSAs. (A) Sequenz des *Xnr1* Promotors. Das erste Nukleotid vor dem Startcodon ATG wurde als -1 definiert. Die Bindungsstellen für Oct und TCF/LEF als auch beide halben T-Box-Stellen, TBX1 und TBX2, sind eingerahmt und beschriftet. Die für die EMSA-Analysen eingesetzten Promotorfragmente wurden in jeder Teilabbildung aufgelistet. (B) Oct25 bindet spezifisch an ein Oktamer-Motiv enthaltenes Promotorfragment. Die Zugabe der unspezifisch kompetitiven Probe (p(dIC)) dagegen hat keinen Einfluss auf die Bindung, allerdings kompetitiert die unmarkierte spezifische Promotorprobe (u.t.) mit der markierten Probe um die Bindung mit Oct25. (C) Auch ein EMSA mit embryonalen Proteinextrakten (Stadium 12) zeigt eine Komplexbildung zwischen einer Probe mit einer Oct-Bindungsstelle und Oct25. Der Pfeil markiert die spezifischen Protein/DNA-Komplexe, wohingegen die Dreiecke die unspezifischen Komplexe kennzeichnen. Der spezifische Komplex wird durch Extrakte von Embryonen, in denen ansteigende *Oct25*-Mengen injiziert wurden, deutlicher. Die Injektion ansteigender Mengen von Oct25MO, Oct60MOs oder die Verwendung einer Probe in der die Bindungsstelle für Oct mutiert wurde, zeigt keine Komplexbildung zwischen Protein und DNA. (D) Auch für die Fusionsproteine GST/Oct60 und GST/Oct3/4 wird eine Bindung an das Promotorfragment mit der Oct-Bindungsstelle beobachtet. GST bildet alleine keinen Komplex mit dem Fragment. (E) Ansteigende Mengen von eingesetztem Tcf3 zeigen eine Interaktion mit einem Promotorfragment, das die TCF/LEF-Bindungsstelle enthält. (F) Oct25 und VegT bilden gemeinsam einen Komplex auf der Bindungsstelle für Oct. Allerdings kann lediglich Oct25, aber nicht VegT, alleine einen Komplex mit dem Oct-Bindungsstellen enthaltenden Fragment eingehen. Bei der Inkubation mit Oct25 führt eine kontinuierliche Steigerung der VegT-Menge zu einer verringerten Mobilität des Oct25/ DNA-Komplexes. (G) Oct25 und VegT zeigen gemeinsam eine Komplexbildung auf der T-Box-Stelle, was durch die Reduktion der Mobilität des VegT/DNA-Komplexes detektierbar ist. (H, I) Auch Oct25 und Tcf3 formen sowohl auf einem Promotorfragment mit einer Oct-Bindungsstelle (H) als auch auf einem mit einer TCF/LEF-Bindungsstelle (I) einen gemeinsamen Komplex. (J) Im Vergleich haben ansteigende Mengen an β-Catenin keinen Einfluss auf die Mobilität des Komplexes zwischen Oct25 und einem Promotorfragment mit Oct-Bindungsstelle.

Im Gegenzug wurde gezeigt, dass Oct25 nicht alleine aber zusammen mit VegT auf der Promotorsequenz, die die T-Box-Bindungsstelle enthält, eine Bindung eingeht (Abb. 11G). Ebenso führte die Zugabe steigender Mengen an Oct25 zu einer verminderten Mobilität des VegT/DNA-Komplexes. Die gleichen Ergebnisse wurden auch durch Zugabe von Oct25 Protein auf den TCF/LEF-Bindungsstellen erhalten (Abb. 11I). Demzufolge kann Oct25 mit Tcf3 an den Bindungsstellen für TCF/LEF einen Komplex bilden. Da kein Supershift des Oct25/DNA-Komplexes nach β-Catenin-Zugabe zu verzeichnen war (Abb. 11J), konnten die Ergebnisse der GST-Pulldown Untersuchungen (Abb. 10A) bestätigt werden.

Es wurde auch untersucht, ob Oct25, Tcf3 und VegT auf dem hauptsächlich vom β-Catenin Signalweg über TCF/LEF-Bindungsstellen aktivierten *Siamois* Promotor (Brannon et al., 1997; Fan et al., 1998) Komplexe bilden können. Hierfür wurde ein die Region -802/+9 umspannendes *Siamois* Promotor Fragment (Brannon et al., 1997) isoliert.

Neben den vier möglichen TCF/LEF-Bindungsstellen (Brannon et al., 1997) wurde auf dem Promotorfragment von -300 bis +9 eine putative Oct-Bindungsstelle gefunden (Abb. 12A), deren Bindung mit Oct25 mittels EMSA gezeigt werden konnte (Abb. 12B). In früheren Studien wurde festgestellt, dass für die Stimulation des *Siamois* Promotors über Wnt unter den vier TCF/LEF-Bindungsstellen (S1-S4) S1 und S3 essentiell, aber S2 und S4 nicht notwendig sind (Brannon et al., 1997). Die Analysen bestätigten eine effiziente Bindung von Tcf3 an die Bindungsstellen S1 und S3 (Abb.12C und F). Die Spezifität sowohl der Oct25- als auch der Tcf3-Bindungsstellen wurde durch eine Mutation der entsprechenden Stellen belegt. An dem mutierten DNA-Fragment war keine Bindung von Oct25 bzw. Tcf3 zu erkennen (Daten hier nicht gezeigt).

Da gezeigt werden konnte, dass Oct25, Tcf3 und VegT miteinander interagieren (siehe 3.1.9), wurde auch eine Bildung von Komplexen auf dem *Siamois* Promotor vermutet. Zunächst konnte weder eine Bindung von Oct25 an die S1-Stelle noch eine Bindung von VegT an die S1- oder S3-Stelle beobachtet werden. Allerdings führten steigende Mengen an Oct25 zu einer verzögerten Mobilität eines vorhandenen Tcf3-Promotor-Komplexes (Abb. 12D). Auch die steigende Zugabe von VegT zu vorhandenen Tcf3-Promotor-Komplexen auf den Bindungsstellen S1 und S3 resultierte in einer Verringerung der Wanderungsgeschwindigkeit (Abb. 12E und F). Daraus leitet sich eine mögliche Regulation der Transkription des *Siamois* Promotors ab, indem Oct25 und VegT Proteinkomplexe mit Tcf3 auf den TCF/LEF-Bindungsstellen bilden. Neben den *in vitro* Analysen wurden auch *in vivo* Untersuchungen mit Hilfe von Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIP) durchgeführt (Abb. 12G).

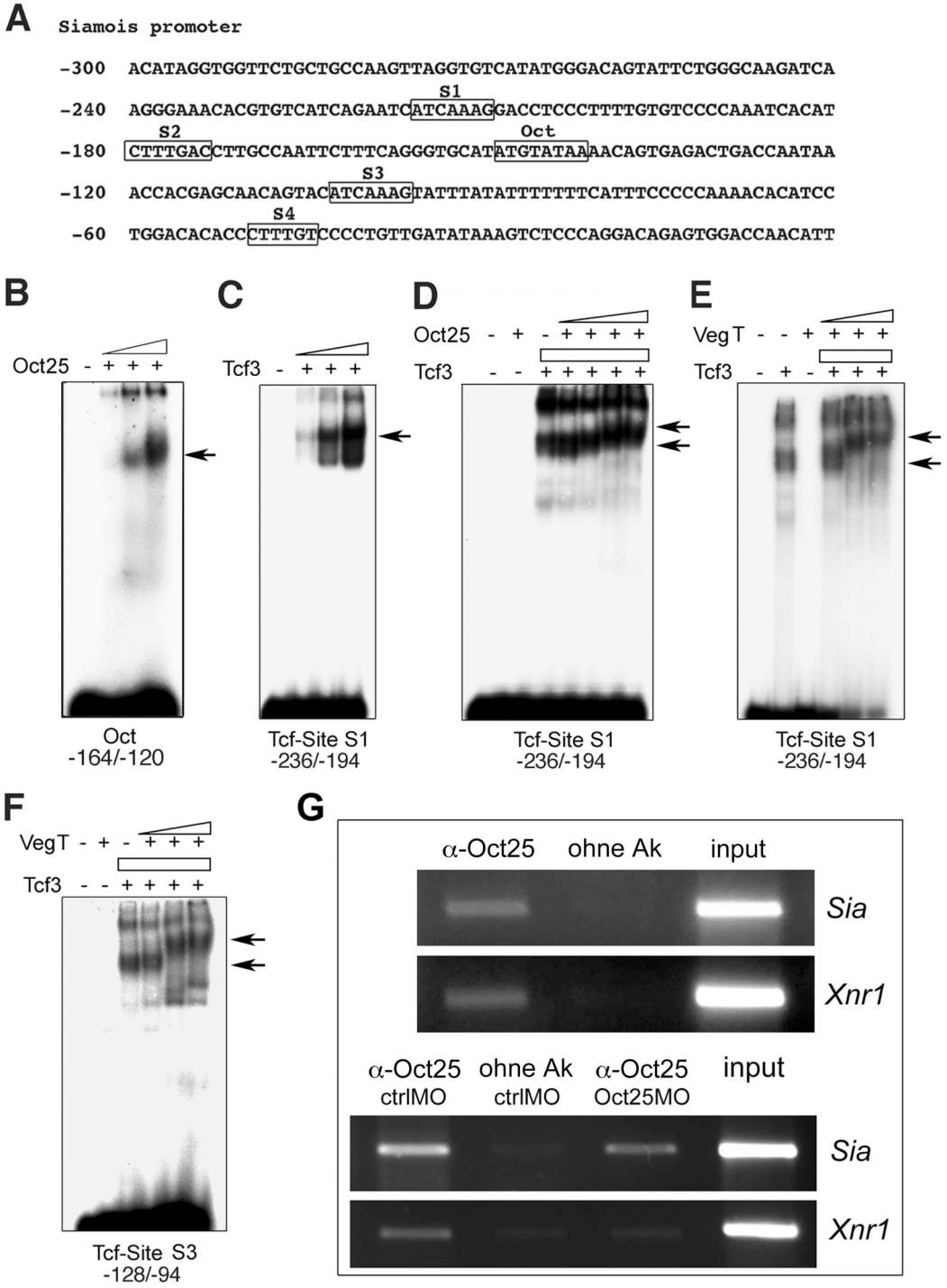


Abb. 12: EMSA-Untersuchungen des *Siamois* Promotors und ChIP. (A) Sequenz des *Siamois* Promotors. Das erste Nukleotid vor dem Startcodon ATG wurde als -1 festgelegt. Die Bindungsstelle für Oct und die vier TCF/LEF-Bindungsstellen (S1, S2, S3, S4) sind eingerahmt und gekennzeichnet. Die für die EMSA-Analysen eingesetzten *Siamois* Promotorfragmente wurden unter jeder Teilabbildung angegeben. (B) Oct25 bindet an ein *Siamois* Promotorfragment, das die Oct-Bindungsstelle enthält. (C) Tcf3 kann mit einem die S1 TCF/LEF-Bindungsstelle enthaltenden Promotorfragment interagieren. (D) Oct25 bildet gemeinsam mit Tcf3 einen Komplex auf der S1 TCF/LEF-Bindungsstelle. (E, F) VegT kann mit Tcf3 sowohl auf der S1 (E), als auch auf der S3 (F) TCF/LEF-Stelle des Promotors komplexieren. (G) In ChIP Analysen konnte nach Präzipitation mit dem Antikörper gegen Oct25 (α-Oct25) die *Siamois* Promotorregion, die die Oct- und die TCF/LEF-Bindungsstellen enthält, und die *Xnr1* Promotorregion, die die Oct-, TCF/LEF- und die T-Box-Stellen enthält, vom Chromatin amplifiziert werden. Ohne Antikörper ist keine Amplifikation möglich. Unter Einsatz des Oct25MOs, das die Translation von Oct25 unterdrückt, können im Vergleich zur ctrlMO Injektion lediglich reduzierte Mengen an *Siamois* und *Xnr1* PCR-Produkten detektiert werden.

Unter Verwendung des Antikörpers gegen Oct25 (α-Oct25, siehe 3.1.10) war es möglich, sowohl Oct25-*Xnr1* als auch Oct25-*Siamois* Promotorkomplexe zu präzipitieren. In Proteinextrakten Oct25MO injizierter Embryonen waren die Banden, welche die präzipitierten Komplexe zwischen Oct25 und den Promotoren von *Siamois* bzw. *Xnr1* widerspiegeln, wesentlich schwächer zu detektieren als nach ctrlMO Injektion, da das Morpholino gegen Oct25 dessen Translation unterdrückte. Folglich kann Oct25 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit den Promotoren von *Siamois* und *Xnr1* Interaktionen eingehen.

3.1.11. Oct25 reprimiert die Promotoraktivitäten von *Xnr1* und *Siamois*

Ausgehend von den erzielten Resultaten stellte sich die Frage, welchen Einfluss die jeweiligen Proteinkomplexe und Bindungsstellen auf die Aktivität der Promotoren haben. Für die Analyse der *Xnr1* Promotoraktivität wurde ein Fragment von -907/-5 und eine Reihe von Mutanten des *Xnr1* Promotors in einen Luziferase Reporter Vektor integriert (Abb. 13A). Die jeweiligen Promotorkonstrukte wurden entweder alleine oder zusammen mit RNA von *VegT*, *Xwnt8*, *β-Catenin* oder *Oct25* injiziert. Für den wildtypischen Promotor Xnr1Luc(-907) konnte eine Stimulation nicht nur durch VegT, sondern auch durch Xwnt8 und das im Signalweg weiter unten gelegene β-Catenin erreicht werden (Abb. 13B). Bei einer Koinjektion der *VegT* und *β-Catenin* RNA wurde eine deutliche Erhöhung der Luziferaseaktivität für Xnr1Luc(-907) detektiert. Die zusätzliche Koinjektion der RNA von *Oct25* resultierte in allen Fällen in einer deutlichen Inhibition der Luziferaseaktivität (Abb. 13B). Im Gegensatz dazu führten die injizierten Oct25MO und Oct60MOs zu einer signifikanten Stimulation des *Xnr1* Promotors (Abb. 13C). Dies verdeutlicht, dass die POU-V Faktoren die Transkription des *Xnr1* Gens unterdrücken.

Als nächstes wurden die beschriebenen Bindungsstellen (Abb. 11A) auf dem *Xnr1* Promotor mutiert und untersucht, wie die Reporteraktivität *in vivo* durch die Oct25, VegT und Tcf3 Proteinkomplexe reguliert wird. Die eingeführten Mutationen betreffen die Oct-Bindungsstelle (-Oct), die TCF/LEF-Bindungsstelle (-TCF) und die VegT-Bindungsstelle (-Tbox) (Abb. 13A). Die Tatsache, dass Oct25, VegT oder Tcf3 ohne ihre spezifischen Bindungsstellen keine direkte Bindung mehr mit dem Promotor eingehen können (Daten hier nicht gezeigt), spiegelt sich auch darin wider, dass ein Promotor mit fehlender T-Box nicht auf eine *VegT* und ein Promotor ohne TCF/LEF-Bindungsstelle nicht mehr auf eine *β-Catenin* Injektion reagieren konnte (Abb. 13D und E). Das bedeutet auch, dass weder VegT noch Tcf3/β-Catenin den *Xnr1* Promotor aktivieren können indem sie die Bindungsmotive ihrer Interaktionspartner benutzen. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Oct25 auf die

Aktivierung via VegT (Abb. 13F-I) oder β-Catenin (Abb. 13J-M) unter Verwendung von Mutanten des *Xnr1* Promotors analysiert, die die T-Box- bzw. die TCF/LEF-Bindungsstelle enthalten. Da Tcf3 für die Unterdrückung der zygotischen Nodal Expression benötigt wird (Houston et al., 2002; Hilton et al., 2003), wurde neben *Oct25* auch RNA von dominant-negativem *Tcf3* (dnTcf3), einer konstitutiv reprimierenden Form von Tcf3 (Molenaar et al., 1996), injiziert. Nach Injektion der *VegT* RNA wurde die Luziferaseaktivität des wildtypischen Promotors Xnr1/Luc(-279) (Abb. 13F) und die der Mutanten, denen die Oct-Bindungsstelle Xnr1Luc(-279-Oct) (Abb. 13G), die TCF/LEF-Bindungsstelle Xnr1Luc(-279-TCF) (Abb. 13H) oder beide Bindungsstellen (-279-Oct-TCF) (Abb. 13I) fehlen, massiv stimuliert. Koinjektion mit *dnTcf3* oder *Oct25* RNA (Abb. 13F-I) führten jeweils zu einer Unterdrückung der Aktivierung aller Promotorkonstrukte. Eine Koinjektion von *Oct25* und *dnTcf3* führte zu einer gesteigerten Reprimierung (Abb. 13F-I). Folglich üben Oct25 und Tcf3 einen inhibitorischen Effekt auf die *Xnr1* Transkription aus, der durch die Zusammenarbeit von beiden noch verstärkt wird. Interessanterweise hängt die Reprimierung durch Oct25 oder Tcf3 nicht von ihren jeweiligen Bindungsstellen auf dem *Xnr1* Promotor ab. Es liegt die Vermutung nahe, dass Oct25 und Tcf3 Komplexe mit VegT bilden und so die durch VegT aktivierte Transkription der Zielgene unterdrücken.

Als nächstes wurde der Einfluss von Oct25 auf die β-Catenin-Aktivierung der Promotormutanten untersucht, die die TCF/LEF-Bindungsstellen enthalten (Abb. 13J-M). So ließ sich bei einer β-Catenin Überexpression sowohl eine gesteigerte Aktivität des wildtypischen Promotors Xnr1Luc(-279), als auch der Mutanten detektieren, denen die Oct-Bindungsstelle Xnr1Luc(-279-Oct), die T-Box-Bindungsstelle Xnr1Luc(-279-Tbox) oder beide Stellen Xnr1Luc(-279-Oct-Tbox) (Abb. 13J-M) fehlen. Demgegenüber wurden die β-Catenin stimulierten Promotoraktivitäten durch koinjizierte *Oct25* RNA inhibiert (Abb. 13J-M). Nach einer Koinjektion von *β-Catenin* und *Tcf3* wurde eine gesteigerte Stimulation im Vergleich zur alleinigen Injektion der *β-Catenin* RNA erreicht. Allerdings wird auch diese verstärkte Aktivierung durch gleichzeitig injiziertes *Oct25* deutlich unterdrückt (Abb. 13J-M). Ausgehend von der Beobachtung, dass Oct25 die Bildung des β-Catenin/Tcf3-Komplexes nicht unterbindet, sondern stattdessen einen ternären Komplex mit beiden bildet (Abb. 10A), wird der β-Catenin/Tcf3-Komplex mit aktivierender Funktion durch Oct25 zu einem Repressorkomplex. Der inhibitorische Einfluss von Oct25 scheint nicht durch seine direkte Bindung an den Promotor vermittelt zu werden, da die Aktivität der Promotormutanten ohne Oct-Bindungsstelle nach Oct25 Überexpression dennoch reprimiert wurde.

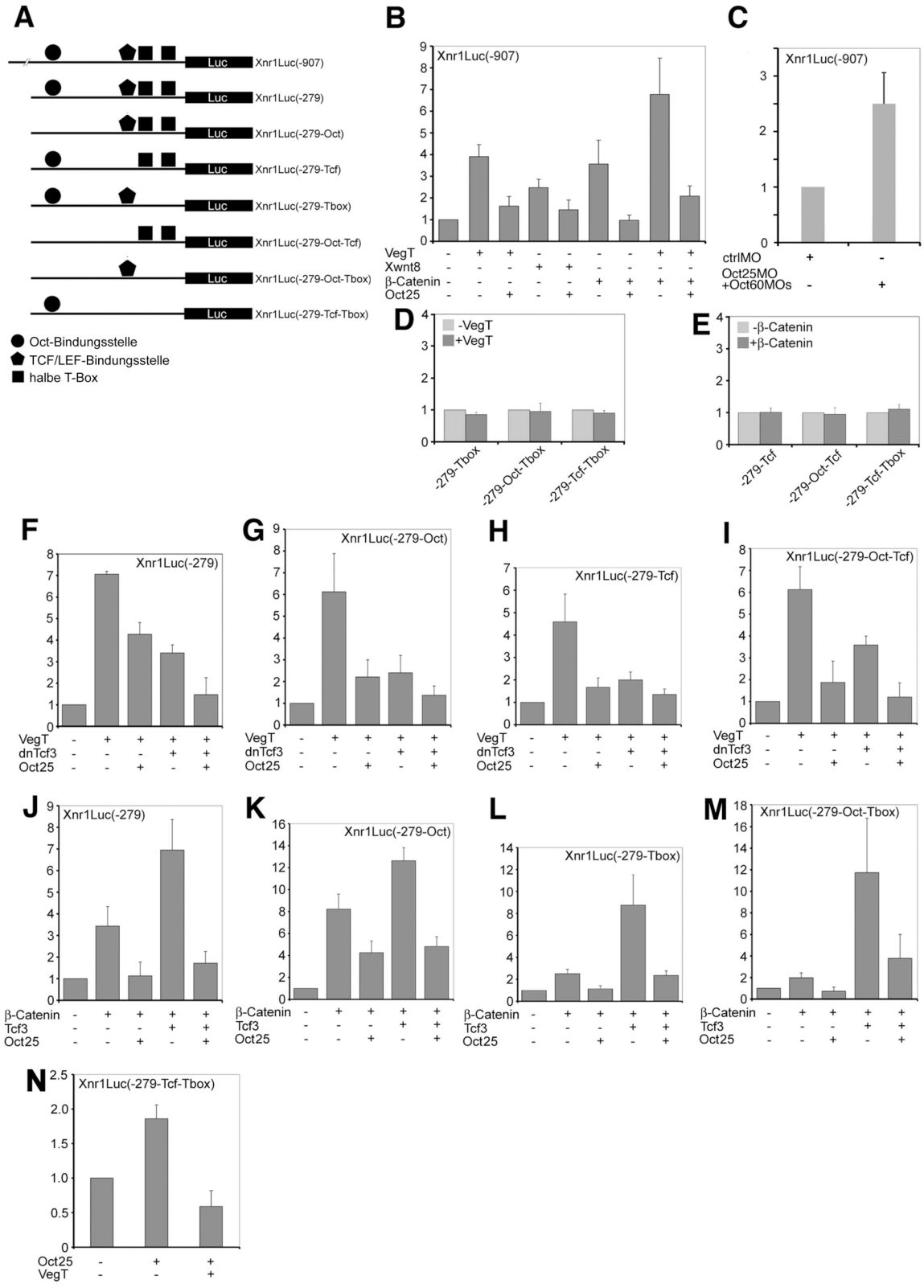


Abb. 13: Regulation der Aktivität des *Xnr1* Promotors durch VegT, β-Catenin und Oct25. (A) Auflistung der wildtypischen und mutierten *Xnr1* Promotorkonstrukte, die in Luziferase Assays zum Einsatz kamen. (B) Der wildtypische *Xnr1* Promotor (-907) wird durch eine Überexpression von *VegT*, *Xwnt8* bzw. *β-Catenin* stimuliert. Eine Koinjektion von *VegT* und *β-Catenin* führt zu einer verstärkten Promotoraktivität. Eine zusätzliche Überexpression von *Oct25* führt in allen Fällen zu einer Reprimierung. (C) In Embryonen wird der wildtypische Promotorvektor durch einen Oct25/Oct60-Knockdown stimuliert. (D, E) Die Mutanten des Promotors ohne die T-Box-Stelle können nicht durch injiziertes *VegT* (D) und die ohne TCF/LEF-Bindungsstelle nicht durch *β-Ca-*

tenin (E) stimuliert werden. (F-I) Der wildtypische -279 Promotorreporter (F) sowie die Mutanten ohne die Bindungsstellen für Oct (G), TCF/LEF (H) und für beide (I) zeigen nach *VegT*-Überexpression eine erhöhte Luziferaseaktivität. Diese wird durch eine Überexpression von *Oct25* oder *dnTcf3* und, wesentlich stärker, durch eine Koinjektion von *Oct25* und *dnTcf3* reprimiert. (J-M) Der wildtypische -279 Promotor (J) sowie die Mutante ohne die Oct- (K) bzw. die T-Box-Bindungsstelle (L) und die Mutante, in der beide Seiten fehlen (M), zeigen nach Überexpression von *β-Catenin* eine Steigerung der Luziferaseaktivität, die durch Koinjektion von *Tcf3* zusätzlich verstärkt wird. Auch hier führt eine Überexpression von *Oct25* zu einer deutlichen Reprimierung. (N) Eine Mutante des Promotors, in der lediglich die Bindungsstelle für Oct vorhanden ist, zeigt nach Injektion von *Oct25* eine Stimulation der Luziferaseaktivität, die durch koinjiziertes *VegT* unterdrückt wurde.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Oct25 die aktivierenden Eigenschaften von VegT und β-Catenin auf die *Xnr1* Transkription durch die Bildung von repressorischen Komplexen mit VegT und Tcf3 blockiert.

Zusätzlich wurde der Einfluss von Oct25 auf die Transkription von *Siamois* unter zu Hilfenahme eines -802/+9 *Siamois* Promotorfragments und einiger davon abgeleiteter Mutanten (Abb. 14A) in einem Luziferase Reporter untersucht. Übereinstimmend mit den Resultaten aus den EMSAs, wonach Oct25 bzw. Tcf3 den Promotor mit fehlenden Oct- bzw. TCF/LEF-Bindungsstellen nicht komplexieren kann, wurde nach β-Catenin Überexpression bei den Promotormutanten ohne TCF/LEF-Bindungsstellen keine Aktivierung verzeichnet (Abb. 14B). Folglich wurden für die Analysen Mutanten des *Siamois* Promotors verwendet, in denen die TCF/LEF-Bindungsstellen vorhanden sind. Die beiden wildtypischen Promotorkonstrukte –802/+9 und –250/+9 wurden durch eine RNA Injektion von *Xwnt8* oder *β-Catenin* stimuliert. Eine weitaus stärkere Aktivierung wurde nach gleichzeitiger Injektion von *β-Catenin* und *Tcf3* RNA festgestellt. Die beobachteten Stimulationen beider *Siamois* Promotorkonstrukte wurden durch überexprimiertes Oct25 reprimiert (Abb. 14C und E). Da ebenfalls eine Verstärkung der Luziferaseaktivität des wildtypischen Promotors nach dem Knockdown von Oct25 und Oct60 detektiert wurde (Abb. 14D), kann von einem inhibitorischen Einfluss von Oct25 auf die *Siamois* Transkription ausgegangen werden. Als nächstes stellte sich die Frage, ob in Abwesenheit der Oct-Bindungsstelle auch der *Siamois* Promotor weiterhin durch die *Oct25* RNA Injektion reprimiert wird. Sowohl eine Überexpression von β-Catenin als auch eine gemeinsame Injektion von *β-Catenin* und *Tcf3* RNA resultierte in einer Stimulation des *Siamois* Promotorkonstrukts mit mutierter Oct-Bindungsstelle (Abb. 14F), die durch die Oct25 Überexpression einer deutlichen Inhibition unterlag. Daraus kann gefolgert werden, dass die reprimierende Aktivität von Oct25 nicht von dessen direkter Bindung an den Promotor, sondern von einer Interaktion mit Tcf3 auf der TCF/LEF-Bindungsstelle abhängt.

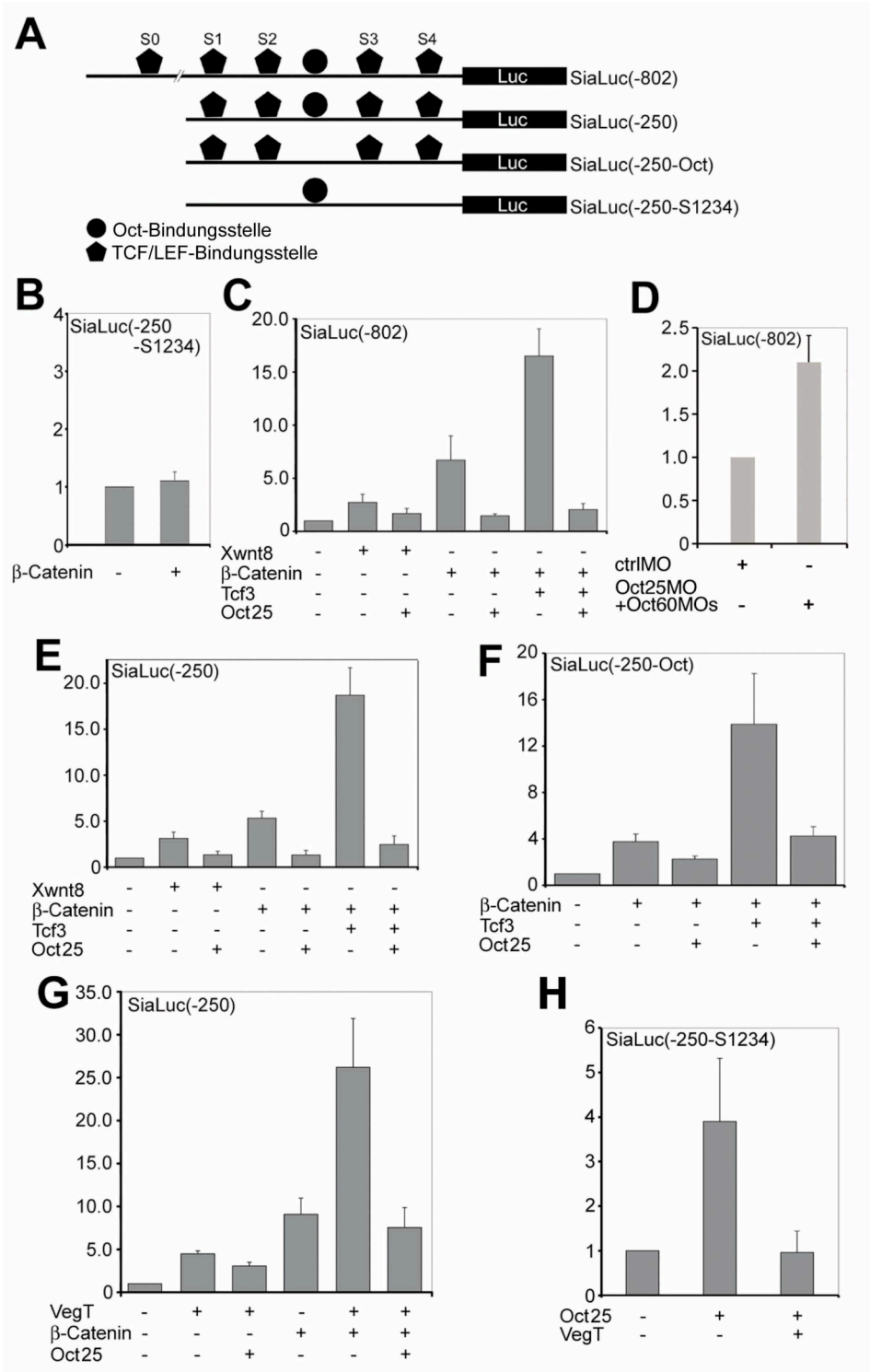


Abb. 14: Regulation der Aktivität des *Siamois* Promotors durch VegT, β-Catenin und Oct25. (A) Übersicht der in Luziferaseanalysen verwendeten wildtypischen und mutierten Reporterkonstrukte des *Siamois* Promotors. (B) Der die TCF/LEF-Bindungsstellen nicht enthaltende Promotor kann durch eine *β-Catenin*-Überexpression nicht stimuliert werden. (C, E) Sowohl die Aktivität des wildtypischen -802 (C) als auch des -250 (E) Promotors werden durch eine Injektion von *Xwnt8* oder *β-Catenin* und, noch stärker, durch eine Koinjektion deutlich gesteigert. Zusätzlich injizierte *Oct25* RNA resultiert in einer Repression der Aktivität. (D) Bei Knockdown von Oct25 und Oct60 kommt es zu einer Stimulation des *Siamois* Promotors. (F) Die Aktivität des Promotors ohne Oct-Bindungsstelle wird durch Überexpression von *β-Catenin* oder durch Koinjektion von *β-Catenin* und *Tcf3* erhöht. Dagegen zeigt die Injektion von *Oct25* eine Repression. (G) Der -250 Promotor wird auch durch eine Überexpression von *VegT* aktiviert. Nach gemeinsamer Injektion von *VegT* und *β-Catenin* wurde die Aktivierung deutlich verstärkt. In beiden Fällen führte eine Überexpression von *Oct25* zu einer Verminderung. (H) Dagegen wird für den Reporter des *Siamois* Promotors, der lediglich die Oct-Bindungsstellen enthält, nach *Oct25* Injektion eine Stimulation beobachtet. Koinjiziertes VegT führt zu einer Repression.

Obwohl auf dem analysierten *Siamois* Promotor keine Bindungsstellen für VegT detektierbar sind, haben die GST-Pulldown und EMSA-Analysen eine wahrscheinliche Komplexbildung zwischen VegT und Tcf3 auf der TCF/LEF-Bindungsstelle des *Siamois* Promotors ergeben. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob auch VegT einen positiven Einfluss auf die *Siamois* Transkription hat. Bereits die alleinige Injektion der *VegT* RNA war für einen Anstieg der Luziferaseaktivität des *Siamois* Promotors ausreichend (Abb. 14G). Jedoch zeigte sich eine gegenüber der β-Catenin Überexpression geringere Stimulation.

Interessanterweise führte die Koinjektion von *VegT* und *β-Catenin* zu einer stärkeren Stimulation, als sie aufgrund des additiven Effektes zu erwarten gewesen wäre. Folglich verstärkt VegT tatsächlich die Transkription von *Siamois*. Auch in diesem Fall kam es nach Überexpression von Oct25 zu einer Unterdrückung des stimulierenden Effektes von VegT und auch der von VegT und β-Catenin gemeinsam verursachten Stimulation (Abb. 14G).

Da Oct25 auf den Promotoren von *Xnr1* und *Siamois* sowohl für den Signalweg von VegT als auch von β-Catenin inhibitorisch wirkt, wurde im Folgenden untersucht, wie die Aktivität durch eine Überexpression von Oct25 in Promotoren, bei denen lediglich die Oct-Bindungsstelle vorhanden ist, reguliert wird. Die Luziferaseaktivität nach Koinjektion von *Oct25* mit einem *Xnr1* Promotor, der lediglich die intakte Oct-Bindungsstelle und weder TCF/LEF- noch T-Box-Bindungsstellen aufweist (Xnr1Luc(-279-TCF-Tbox)), wurde um den Faktor 2 stimuliert (Abb. 13N). Eine weitaus höhere Stimulation wurde durch injizierte *Oct25* RNA unter Einsatz des *Siamois* Promotors, der nur die Oct-Bindungsstelle aufweist (SiaLuc(-250-S1234), detektiert (Abb. 14H). Scheinbar hat Oct25 einen aktivierenden Einfluss, wenn es direkt mit seiner Bindungsstelle interagiert. Jedoch resultierte eine *VegT* Koinjektion in einer blockierten Oct25-Stimulation beider Promotormutanten (Abb. 13N und 14H). Diese Beobachtung bestätigt die frühere Schlussfolgerung, dass Oct25 gemeinsam mit VegT sogar in Abwesenheit der T-Box-Bindungsstellen repressorische Komplexe bildet.

3.1.12. Oct25 reguliert die Transkription der *Gsc* und *Mix2* Gene

Der inhibitorische Einfluss von Oct25 auf den Nodal/Aktivin Signalweg während der Gastrulation wurde bereits nachgewiesen (siehe 3.1.3-3.1.5). Zur Bestätigung dieser Beobachtungen und zur Aufklärung des zugrunde liegenden Mechanismus wurde die Veränderung der Expression von *Mix2* und *Gsc*, zweier direkter Zielgene des Nodal/Aktivin Signalwegs, nach Überexpression und Knockdown von Oct25 analysiert. Nach der Injektion von *Oct25* RNA zeigten Whole Mount *in situ* Hybridisierungen eine starke Reprimierung der Transkription beider Gene (Abb. 15A). Im Gegensatz dazu resultierte der Funktionsverlust

des endogenen Oct25 in einer deutlich verstärkten *Mix2* Expression und in einer in Richtung der lateralen marginalen Zone verbreiterten Expressionsdomäne von *Gsc* (Abb. 15A). Die Inhibition der *Mix2* und *Gsc* Transkription nach Überexpression von Oct25 (Abb. 15B) und eine Steigerung der Transkription beider Gene nach Oct25MO Injektion (Abb. 15C) konnte mit Hilfe der real time RT-PCR Technik bestätigt werden.

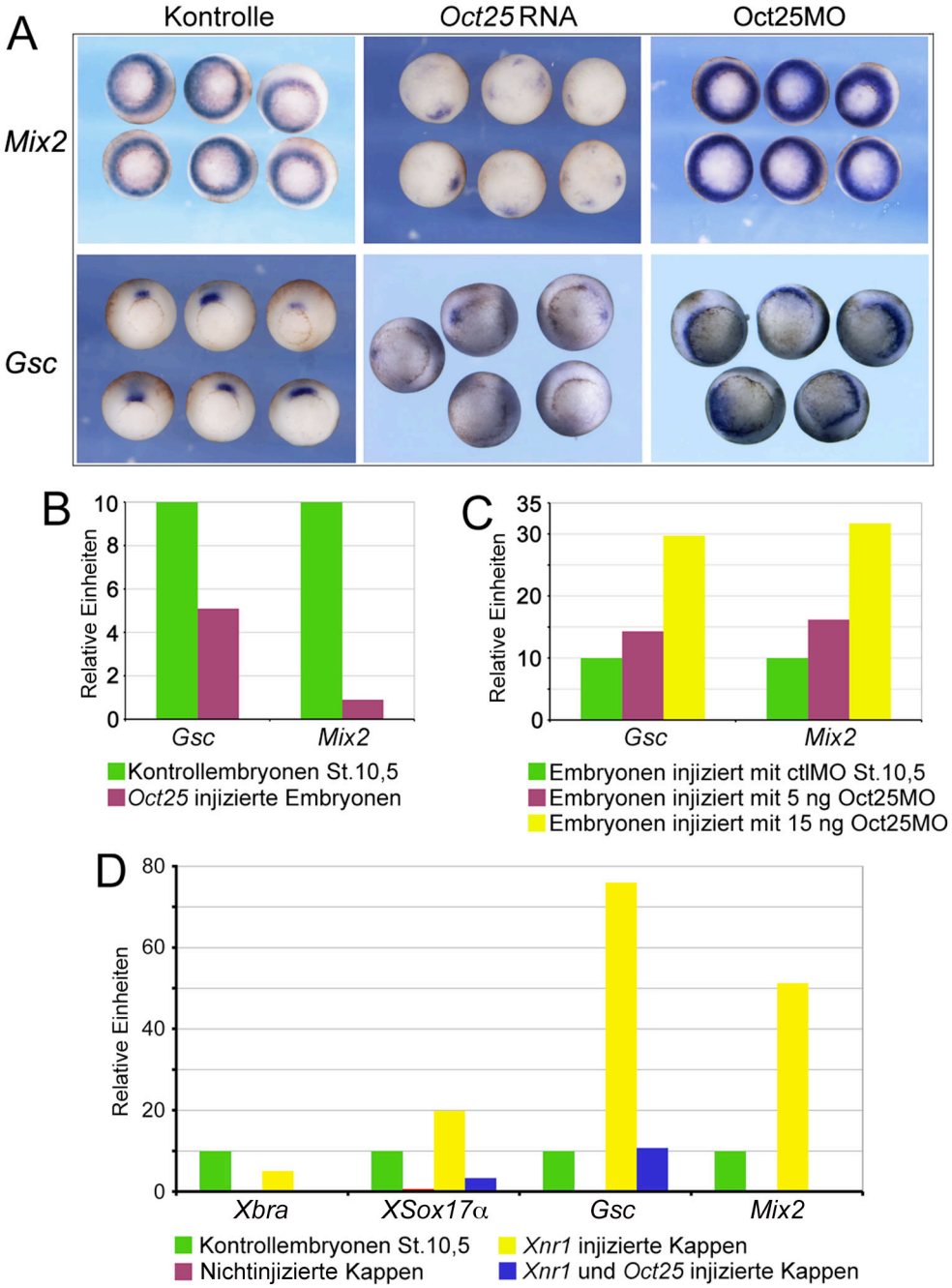


Abb. 15: Analyse der Transkription von *Gsc* und *Mix2* nach Überexpression oder Knockdown von Oct25. (A-C) Über Whole Mount *in situ* Hybridisierung (A) und real time RT-PCR von Embryonen (B, C) kann für die *Oct25*-Überexpression eine Inhibition und für den Oct25-Knockdown eine Dosis-abhängige Erhöhung der *Gsc* und *Mix2* Transkription detektiert werden. (D) In real time RT-PCR Analysen zeigt sich, dass die Transkription der mesodermalen und endodermalen Marker *Xbra*, *Gsc, XSox17α* und *Mix2* in animalen Kappen von mit *Xnr1* RNA injizierten Embryonen deutlich erhöht, aber durch eine Koinjektion mit *Oct25* RNA stark inhibiert wird.

Angesichts der Tatsache, dass Oct25 die Aktivitäten des maternalen VegT und β-Catenin, die für die Expression der *Nodals* essentiell sind (Cao et al., 2006), inhibiert und da der β-Catenin Signalweg ebenso in die Regulation der *Gsc* Transkription integriert ist (Steinbeisser et al., 1993; Watabe et al., 1995; Laurent et al., 1997), könnte es sich bei der unterdrückten Expression von *Gsc* und *Mix2* auch um einen indirekten Effekt handeln. Ein solcher kann durch Überexpression der Nodals, hier Xnr1, in animalen Kappen umgangen werden, wobei die Inhibition der VegT und β-Catenin Aktivitäten im Gesamtembryo ausgeschlossen wird. Die Injektion der *Xnr1* RNA in animalen Explantaten führte zu einer verstärkten Bildung des Mesendoderms, wie sie durch die Aktivierung der *Xbra* und *XSox17α* Expression verdeutlicht wurde, und zu einer signifikanten Induktion von direkten Zielgenen des Nodal/Aktivin Signalwegs, wie *Gsc* und *Mix2* (Abb. 15D). Koinjektion mit *Oct25* RNA resultierte in einer massiven Unterdrückung dieser Gene in animalen Kappen. Somit kann gefolgert werden, dass die Auswirkungen von Oct25 auf den Nodal/Aktivin Signalweg nicht auf einen Nebeneffekt der inhibierten VegT- und β-Catenin-Aktivitäten zurückzuführen sind.

3.1.13. Oct25 interagiert mit Komponenten des Nodal/Aktivin Signalwegs

Zur Aufklärung des molekularen Mechanismus, über den Oct25 die Expression der Nodal/Aktivin Zielgene reguliert, wurden GST-Pulldowns durchgeführt. Auf diese Weise sollten mögliche Interaktionen zwischen Oct25 und Komponenten des Signalwegs detektiert werden. Dabei wurde eine Komplexbildung zwischen GST-markiertem Oct25 und radioaktiv markiertem FAST1 (FoxH1) bzw., bei dem gegensätzlichen Versuchsaufbau, eine Interaktion zwischen GST-markiertem FAST1 und radioaktiv markiertem Oct25 (Abb. 16A) beobachtet. Es konnte ebenfalls eine direkte Interaktion zwischen Oct25 und XWBSCR11 auf beiden experimentellen Wegen gezeigt werden. Eine Komplexbildung mit einer weiteren Komponente des Nodal/Aktivin Signalweges, dem Signaltransducer Smad2, konnte mit radioaktiv markiertem Oct25 und GST-markiertem Smad2 nachgewiesen werden (Abb. 16A). Da sich keine Bindung zwischen dem GST und einem der getesteten Proteine zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass die Interaktionen zwischen den Proteinen spezifisch sind (Abb. 16A). Zum Beweis, dass die beobachteten Interaktionen auch *in vivo* existieren, wurden Koimmunopräzipitationen durchgeführt. In kotransfizierten Zellen wurden unter Benutzung eines HA-Antikörpers die zwischen N-terminal Flag-markiertem Oct25 und C-terminal HA-markiertem Smad2, XWBSCR11 oder FAST1 gebildeten Komplexe präzipitiert (Abb. 16B). Zusammenfassend konnte *in vitro* und *in vivo* eine Komplexbildung von Oct25 mit den wichtigsten Komponenten des Nodal/Aktivin Signalweges dargestellt werden

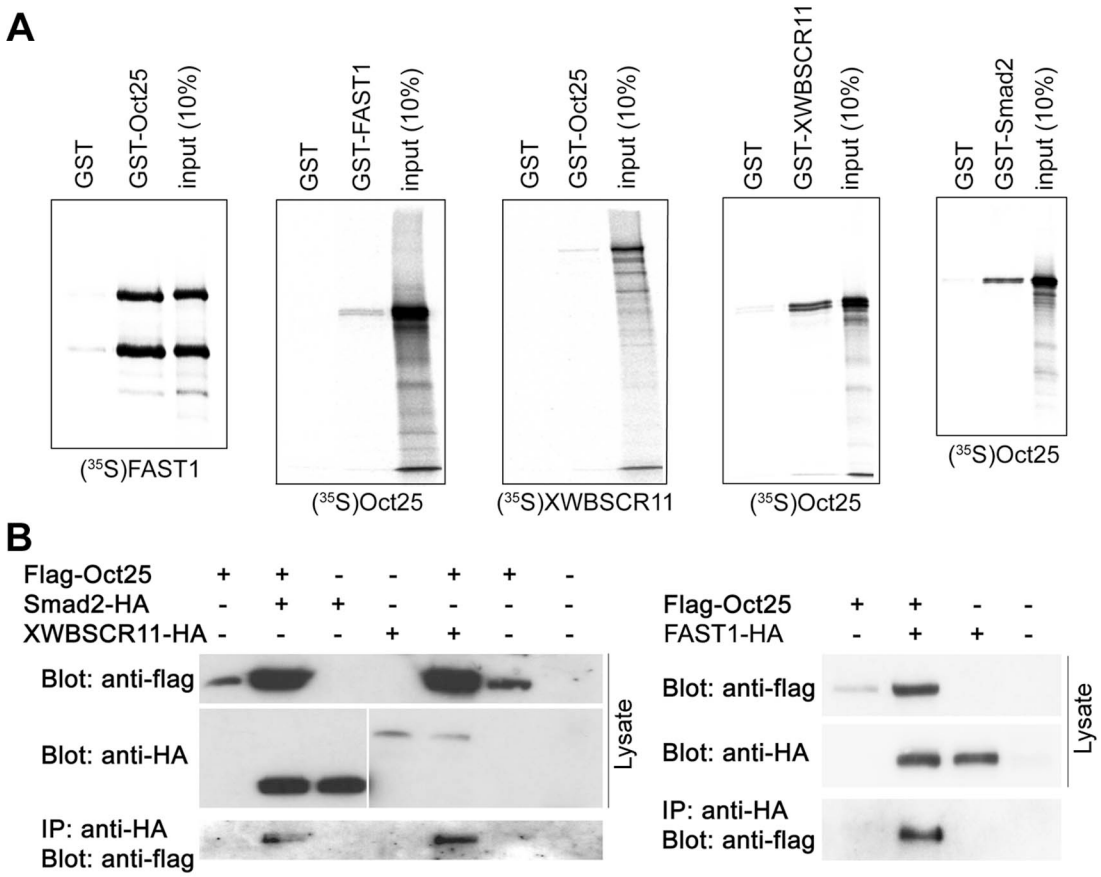


Abb. 16: Interaktionen zwischen Oct25 und FAST1, Smad2 oder XWBSCR11. (A) Eine Komplexbildung für Oct25 mit FAST1 (und umgekehrt), XWBSCR11 und Smad2 kann über GST-Pulldowns nachgewiesen werden. (B) In transfizierten Zellen bildet Flag-markiertes Oct25 Komplexe mit HA-markiertem Smad2, XWBSCR11 und FAST1, wenn eine Präzipitation mit einem Antikörper gegen HA durchgeführt wird.

3.1.14. Oct25 bindet an die Promotoren von *Gsc* und *Mix2*

Mit Hilfe von EMSA-Analysen wurde kontrolliert, ob Oct25 mit den Promotoren von *Gsc* und *Mix2* interagieren kann. Bereits frühere Studien haben eine Bindung von XWBSCR11 zum Aktivin-responsiven distalen Element (DE) (Abb. 17A) und von FAST1 zum Wnt-responsiven proximalen Element (PE) des *Gsc* Promotors gezeigt (Ring et al., 2002). Diese Interaktion zwischen den jeweils spezifischen Bindungsstellen des Promotors und GST-markiertem XWBSCR11 (Abb. 17A) und FAST1 konnte hier bestätigt werden (Abb. 17C), wohingegen keine Bindung mit GST alleine stattfand. Aufgrund der Beobachtung, dass Oct25 mit XWBSCR11 bzw. FAST1 interagieren kann (siehe 3.1.13), wurde getestet, ob auch eine Komplexbildung dieser Proteine auf dem *Gsc* Promotor erfolgt. Durch Supershift-Analysen konnte dabei sowohl eine Interaktion zwischen Oct25 und XWBSCR11 auf dem DE als auch zwischen Oct25 und FAST1 auf dem PE (Abb. 17B) gezeigt werden, indem eine verzögerte elektrophoretische Mobilität der XWBSCR11-DNA- (Fig. 17B) bzw. FAST1-DNA-

Komplexe (Fig. 17D) nach Zugabe von Oct25 zu erkennen war. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Oct25 die Expression des *Gsc* Promotors reguliert, indem es mit XWBSCR11 oder FAST1 Interaktionen eingeht. Bei der Analyse, ob Oct25 direkt mit dem *Gsc* Promotor interagiert, wurden zwei kanonische Oktamermotive, ATGCAAAT (-1007/-1000) und TTTAGCAT (-486/-479), als putative Bindungsstellen identifiziert. Allerdings konnte mittels EMSA lediglich zwischen Oct25 und dem ersten Oktamermotiv eine Bindung beobachtet werde (Abb. 17E). Da die Zugabe steigender FAST1-Mengen in einem Supershift resultierte, scheint FAST1 mit Oct25 auf der Oct-Bindungsstelle einen Komplex zu bilden (Abb. 17F).
In weiteren Untersuchungen wurde die Bindung von Oct25 auf dem *Mix2* Promotor untersucht, der sowohl ein ARE (Vize, 1996) als auch Bindungsmotive für FAST1, TGTGTATT (-196/189), und Smad, GTCT (-178/-175), enthält. EMSAs zeigten, dass zwischen GST-markiertem FAST1 und einem DNA-Fragment, das das ARE enthält, eine Interaktion möglich ist (Abb. 17G). Auch hier wurde nach Zugabe steigender Oct25-Mengen unter Verzögerung der elektrophoretischen Mobilität des FAST1/DNA-Komplexes ein größerer Komplex zwischen Oct25 und FAST1 auf dem ARE gebildet (Abb. 17H). Auch auf dem *Mix2* Promotor existieren zwei Oktamer-ähnliche Sequenzen, ATGTATTA (-623/-616) und AATAACAT (-457/-450), für die allerdings keine Interaktion mit Oct25 vorzuliegen scheint (Daten sind hier nicht gezeigt).
Eine Bestätigung der *in vitro* festgestellten Interaktionen zwischen Oct25 und den Promotoren von *Gsc* und *Mix2* erfolgte *in vivo* mit Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP). Präzipitationen konnten nach Zugabe des Antikörpers gegen Oct25 für zwei verschiedene Promotorregionen von *Gsc*, *Gsc*-A und *Gsc*-B, beobachtet werden. Die Region A beinhaltet das Oktamermotiv und die Region B umfasst das distale und proximale Element des *Gsc* Promotors (Abb. 17I). Darüber hinaus wurde eine das ARE enthaltende Region des *Mix2* Promotors mit Hilfe des Antikörpers präzipitiert (Abb. 17I). Die Spezifität der gefundenen Protein/Promotor Interaktionen wurde mittels Funktionsverlustanalysen von endogenem Oct25 bewiesen, da gegenüber einer ctrlMO Injektion wesentlich weniger Fragmente der *Gsc* und *Mix2* Promotoren präzipitiert werden konnten (Abb. 17J). Die Resultate der durchgeführten Experimente zeigen, dass das Oct25 Protein sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit den Promotoren von *Gsc* und *Mix2* komplexiert. Dabei bleibt unklar, ob eine *in vivo* Bindung indirekter Natur über Interaktionen mit XWBSCR11 und FAST1 oder direkt ist, z.B. über das Oktamermotiv des *Gsc* Promotors (-1007).

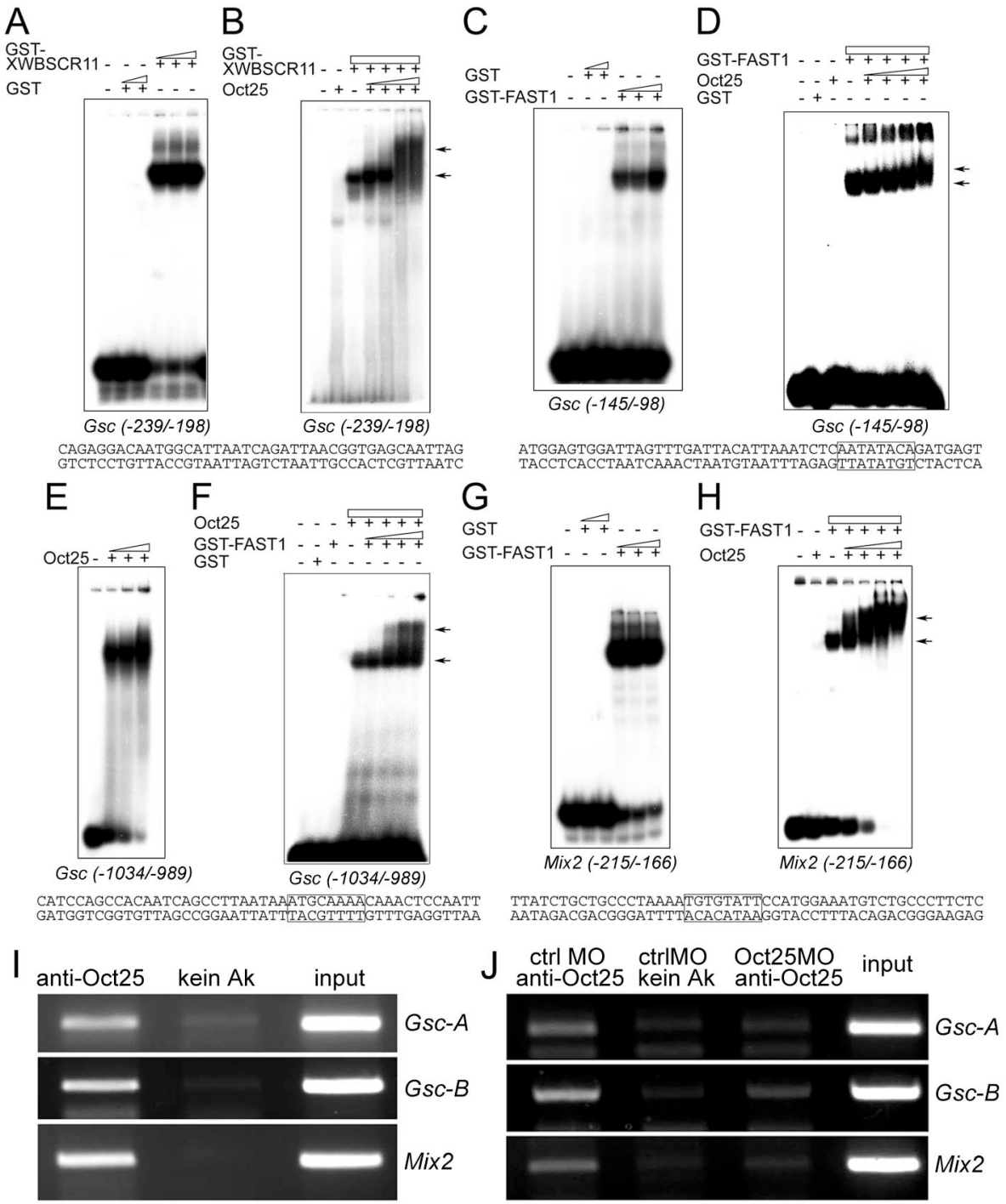


Abb. 17: Oct25 bindet *in vitro* und *in vivo* an die Promotoren von *Gsc* und *Mix2*. (A) Steigende Mengen des Fusionsproteins GST/XWBSCR11 binden an ein Oligonukleotid, welches das distale Element (DE) *des* Gsc Promotors (-239 bis -198) enthält. (B) Die Zugabe gesteigerter Oct25-Mengen führt zur Bildung eines Komplexes mit GST-XWBSCR11 auf dem DE, was durch eine verringerte Mobilität sichtbar wird. (C) FAST1 kann spezifisch an ein Oligonukleotid binden, welches das proximale Element (PE: -145 bis -98), ein spezifisches FAST1-Bindungsmotiv, des *Gsc* Promotors enthält. (D) Durch eine reduzierte Mobilität wird deutlich, dass Oct25 mit FAST1 einen Komplex auf dem PE bilden kann. (E) Oct25 kann mit einem *Gsc* Promotorfragment (-1034 bis -989), das ein Oktamer-ähnliches Motiv enthält, interagieren. (F) Wird diese Region des *Gsc* Promotors mit Oct25 und steigenden Mengen GST/FAST1-Fusionsproteins inkubiert, zeigt sich eine verringerte Mobilität. (G) FAST1 bindet an das ARE des *Mix2* Promotors (-215 bis -166), welches das Bindungsmotiv von FAST1 enthält. (H) Unter Verwendung von GST-FAST1 und steigenden Oct25-Mengen ist eine Reduktion der Mobilität des FAST1-Komplexes auf dem ARE zu beobachten. Die Sequenzen der in EMSAs und Supershift-Analysen verwendeten *Gsc* und *Mix2* Promotorfragmente wurden jeweils unter den Bildern angegeben. Die Bindungsmotive von FAST1 und Oct25 wurden eingerahmt und die Supershifts

durch Pfeile markiert. (I) In ChIP-Untersuchungen zeigt sich, dass die Regionen des *Gsc* Promotors, die entweder die Oct25-Bindungsstelle (*Gsc-A*) oder das DE und PE (*Gsc-B*) enthalten, und die Region des *Mix2* Promotor, die das ARE umfasst, aus Chromatin amplifiziert werden, das zuvor durch einen Oct25-Antikörper präzipitiert wurde. Ein ChIP ohne Antikörper zeigt keine Amplifikationen. (J) Nach Inhibition der Oct25 Translation über Oct25MO werden im Vergleich zu ctrlMO-Injektionen nur geringe Mengen der *Gsc* und *Mix2* Promotorregionen amplifiziert.

3.1.15. Oct25 reprimiert die Aktivität der Promotoren von *Gsc* und *Mix2*

Die weiteren Untersuchungen befassten sich mit dem Einfluss von Oct25 auf die Transkription von *Gsc* und *Mix2*. Hierfür wurde eine Reihe von Luziferase-Reporterkonstrukten der *Gsc* (Abb. 18A) und *Mix2* (Cao et al., 2007) Promotoren hergestellt. Zuerst wurde die Aktivität des *Gsc* Promotors nach Überexpression von Oct25 in animalen Kappen untersucht. Das 1500 bp umfassende Promotorfragment (GscLuc(-1500)) wurde durch Injektion von *Xnr1* oder *Smad2* RNA sowie durch eine Inkubation der Kappen mit Aktivin A signifikant stimuliert (Abb. 18B). In jedem der drei Fälle erzeugte eine Koinjektion mit *Oct25* RNA eine massive Repression der Luziferaseaktivität. Dieses Ergebnis weist auf einen inhibierenden Einfluss von Oct25 auf die Aktivität des *Gsc* Promotors hin. Anschließend wurde mittels der Deletionsmutanten GscLuc(-479) und GscLuc(-226) analysiert, ob unterschiedliche Promotorregionen von *Gsc* sich bezüglich ihrer Reaktion auf die Oct25-Aktivität unterscheiden. Analog dem getesteten -1500 bp Fragment des *Gsc* Promotors zeigten auch diese beiden Konstrukte eine gesteigerte Expression des Luziferasegens durch überexprimiertes Xnr1 oder Smad2 bzw. nach Behandlung der Kappen mit Aktivin A (Abb. 18C und D). Wiederum resultierte die *Oct25* RNA Koinjektion in einer Unterdrückung der Luziferaseaktivität von beiden Promotorkonstrukten.

Aufgrund der Beobachtungen, dass XWBSCR11 für die Induktion von *Gsc* notwendig ist und eine Interaktion mit Oct25 eingeht (siehe 3.1.13), wurde die Auswirkung von Oct25 auf die durch XWBSCR11 induzierte Aktivität des Promotors analysiert. Ein bereits beschriebener artifizieller Promotorreporter, der sechs Wiederholungen des XWBSCR11-responsiven DE des *Gsc* Promotors vor dem -104 Minimalpromotor enthält (6xDE) (Ring et al., 2002), wurde durch die RNA Injektion einer aktivierten *XWBSCR11*-Form, *VP16-XWBSCR11*, deutlich stimuliert (Abb. 18E). Darüber hinaus bewirkte die gemeinsame Überexpression von VP16-XWBSCR11 und FAST1 eine gegenüber der *VP16-XWBSCR11* Einzelinjektion gesteigerte Aktivität. Interessanterweise reprimierte koinjiziertes Oct25 nicht nur den induzierenden Effekt von VP16-XWBSCR11 bzw. VP16-XWBSCR11 und FAST1, sondern auch die Grundaktivität des 6xDE-Konstruktes (Abb. 18E). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Oct25 die Aktivität des *Gsc* Promotors reprimiert.

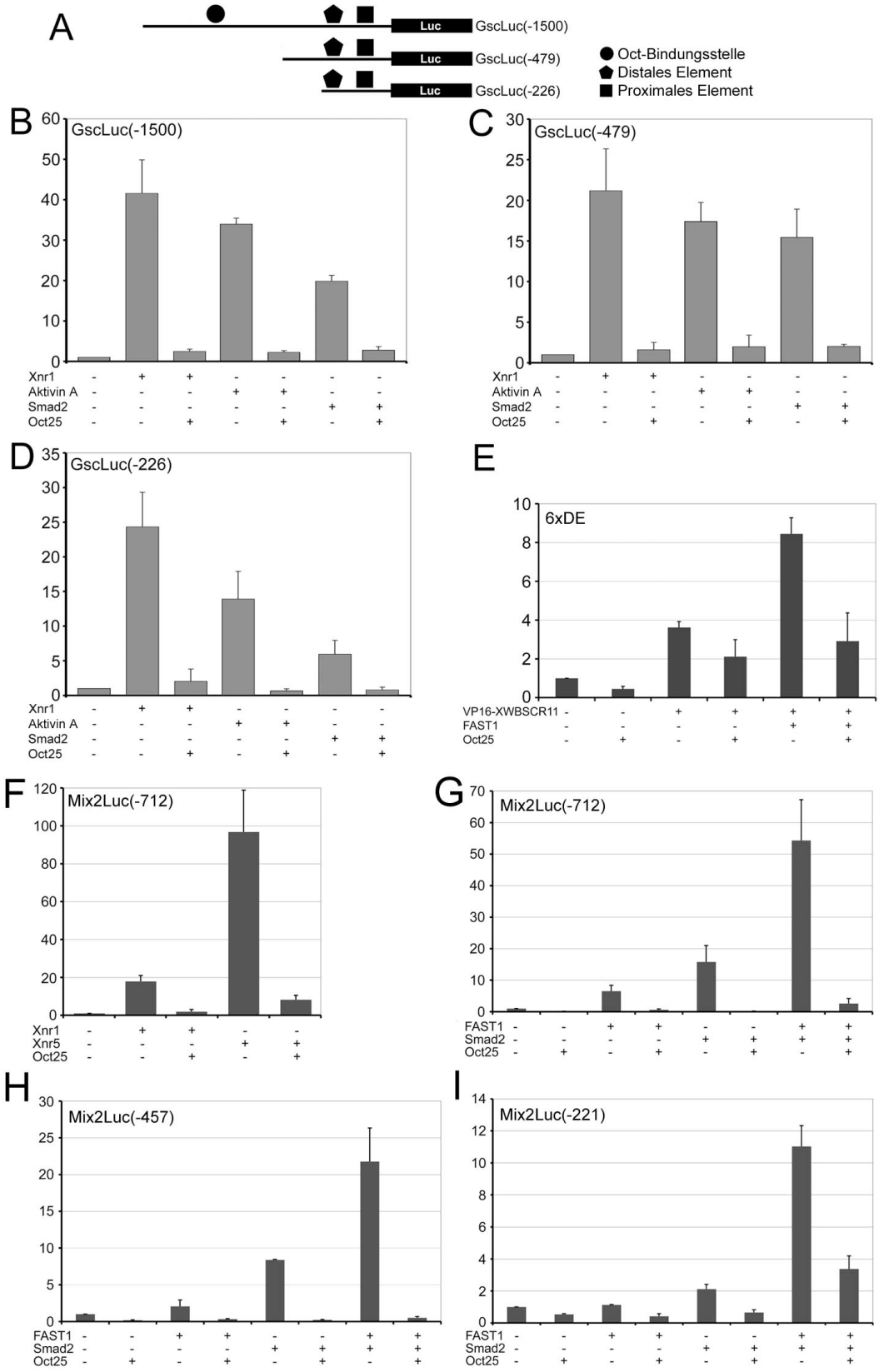


Abb. 18: Untersuchung des *Gsc* und des *Mix2* Promotors. (A) Darstellung des wildtypischen und der mutierten Luziferase-Reporterkonstrukte des *Gsc* Promotors. (B) Der wildtypischen *Gsc* Promotor (-1500/+3) wird in animalen Kappen durch eine Überexpression von Xnr1, Smad2 oder durch eine Behandlung mit Aktivin A stimuliert. Eine Koinjektion mit *Oct25* führt zu einer Repression der Luziferaseaktivität. (C, D) Auch für die verkürzten Promotoren -479/+3 (C) und -226/+3 (D) wurde der gleiche Effekt beobachtet. (E) Ein artifizieller, 6xDE enthaltender Reporter wird durch eine Überexpression von VP16-XWBSCR11 alleine und in Kombination mit FAST1 stimuliert und durch zusätzlich injiziertes *Oct25* reprimiert. (F, G) Die Injektion von

Oct25 kann die durch Überexpression von Xnr1 und Xnr5 (F), oder Smad2 und/oder FAST1 (G) stimulierten *Mix*2 Promotoraktivität inhibieren. (H, I) Überexprimiertes Smad2 und/oder FAST1 steigern die Luziferaseaktivität der verkürzten *Mix2* Promotoren, -457/+13 (*H*) und -221/+13 (*I*), die nach Koinjektion von *Oct25* erneut reprimiert wird.

Im zweiten Teil der Promotoranalysen wurde der Einfluss von Oct25 auf unterschiedliche Promotorfragmente des *Mix2* Gens untersucht. Bei einer Überexpression von Xnr1 oder Xnr5 wurde eine starke Aktivierung des Mix2Luc(-712) Promotors gefunden, wobei jedoch unterschiedliche Stimulationsraten für Xnr1 und Xnr5 detektiert wurden. Erneut verursachte eine Koinjektion mit *Oct25* RNA einen massiven Rückgang der Luziferaseaktivität (Abb. 18F). Weiterhin wurde untersucht, wie Oct25 die Aktivität des *Mix2* Promotors verändert, nachdem dieser mit *FAST1* und/oder *Smad2* stimuliert wurde. Der Grund für dieses Experiment war die bereits gefundene Interaktion von Oct25 mit FAST1 und Smad2 (Abb. 16A). Es konnte beobachtet werden, dass eine Überexpression von FAST1 oder Smad2 eine signifikante Steigerung der Aktivität des *Mix2* Promotors hervorruft (Abb. 18G). Die Koinjektion von *FAST1* und *Mix2* resultierte in einem synergistischen Effekt. Die entweder durch FAST1 oder Smad2 alleine oder durch Kombination beider hervorgerufene Stimulation des *Mix2* Promotors wurde mittels Überexpression von Oct25 unterdrückt. Dies belegt, dass auch die Aktivität des *Mix2* Promotors von Oct25 reprimiert wird. Identische Ergebnisse wurden auch für die beiden kürzeren Promotorkonstrukte, -457 und -221, beobachtet, die beide das ARE enthalten (Abb. 18H und I). Sie zeigten eine deutliche Stimulation nach FAST1 oder/und Smad2 Überexpression und einer Inhibition nach Koinjektion mit *Oct25*. In Anbetracht der Tatsache, dass unterschiedliche Regionen des *Mix2* Promotors keine Unterschiede hinsichtlich einer Unterdrückung aufweisen, wird der reprimierende Effekt von Oct25 auf die Aktivität des *Mix2* Promotors vermutlich über Interaktionen mit dem FAST1/Smad2-Komplex vermittelt.

3.1.16. Das Oktamer-Motiv ist für den inhibitorischen Effekt von Oct25 nicht essentiell

Im *Gsc* Promotor wurde ein Oktamer-Motiv gefunden, das die Bindung von Oct25 vermittelt. Allerdings sind Konstrukte des *Gsc* Promotors mit Deletion der Oct-Bindungsstelle noch immer responsiv für Oct25, was durch die Repression der Luziferaseaktivität bestätigt wurde (Abb. 18C und D). Somit stellt sich die Frage, welche Funktion die Oct-Bindungsstelle für die Regulation von *Gsc* einnimmt. Unter Verwendung eines künstlich hergestellten Promotorreporters (OctLuc8x), der acht Wiederholungen der kanonischen Oct-Bindungsstelle (ATGCAAAT) im pGL3-Promotorvektor enthält, sowie einer VP16-Fusion und einer EVE-Fusion mit Oct25 wurde versucht, diese Frage zu klären. Die Fusion an das VP16, einer

transkriptionellen Aktivatordomäne des Herpes Simplex Virus, führte zu einem konstitutiv aktiven Oct25-Konstrukt. Hingegen resultierte die Fusion an die repressorische Domäne des *Drosophila* Gens *Even-skipped* (EVE) in einem reprimierenden Oct25-Protein. Die Koinjektionen des artifiziellen Promotors OctLuc8x mit wildtypischer *Oct25* RNA zeigten eine geringe Stimulation der Luziferaseaktivität (Abb. 19A). Nach einer VP16-Oct25 Überexpression ließ sich ein massiver Anstieg der Aktivierung detektieren. Im Gegensatz dazu wurde nach koinjizierter *EVE-Oct25* RNA eine Repression der Promotoraktivität beobachtet. Zur Kontrolle wurden die verwendeten RNAs, *Oct25*, *VP16-Oct25* oder *EVE-Oct25*, mit dem pGL3(basic)-Promotorvektor koinjiziert (Abb. 19B). Die dargestellte Unterdrückung nach Koinjektion der jeweiligen RNAs (Abb. 19B) spiegelt die Spezifität der für OctLuc8x erhaltenen Ergebnisse (Abb. 19A) wider. Das lässt vermuten, dass Oct25 bei einer direkten Bindung an die Oktamersequenz des Promotors als Aktivator der Transkription des Zielgens agiert.

Des Weiteren wurde auch der Einfluss des VP16-Oct25 Konstrukts auf den wildtypischen *Gsc* (-1500) Promotor untersucht. Bereits beschrieben wurde die durch Injektion der *Xnr1* RNA hervorgerufene massive Stimulation des *Gsc* Promotors, die durch koinjizierte RNA von *Oct25* deutlich reprimiert wurde (siehe 3.1.15). Überraschenderweise verursachte eine *VP16-Oct25* RNA Koinjektion, entgegen dem vermuteten aktivierenden Einfluss auf den *Gsc* Promotor, eine weitaus stärkere Unterdrückung als Oct25 (Abb. 19C). *VP16-Oct25* scheint auch auf den durch *Xnr1* stimulierten *Mix2* Promotor, der keine spezifische Bindungsstelle für Oct-Proteine aufweist, einen stärkeren reprimierenden Einfluss auszuüben, als dies nach Koinjektion mit *Oct25* RNA beobachtet werden konnte (Abb. 19D). Folglich ist die Anwesenheit der Oktamersequenz nicht automatisch gleichzusetzen mit einer Aktivierung oder Repression der Transkription aufgrund einer Komplexbildung des Promotors mit Oct25.

Ferner stellt sich die Frage, ob die beobachtete Komplexbildung von Oct25 mit FAST1, XWBSCR11 oder Smad2 (siehe 3.1.13) Auswirkungen auf die mit VP16-Oct25 erhaltene Stimulation des OctLuc8x Promotors haben. Tatsächlich resultierte eine Koinjektion mit *FAST1* RNA in einer signifikanten Unterdrückung der durch *VP16-Oct25* RNA stimulierten Luziferaseaktivität (Abb. 19E). Allerdings konnte diese Beobachtung nicht für koinjiziertes *XWBSCR11* bzw. *Smad2* gemacht werden (Daten sind hier nicht gezeigt). Somit scheint zumindest FAST1 einen reprimierenden Einfluss auf die durch Oct25 induzierte Transkription des artifiziellen Promotors zu haben.

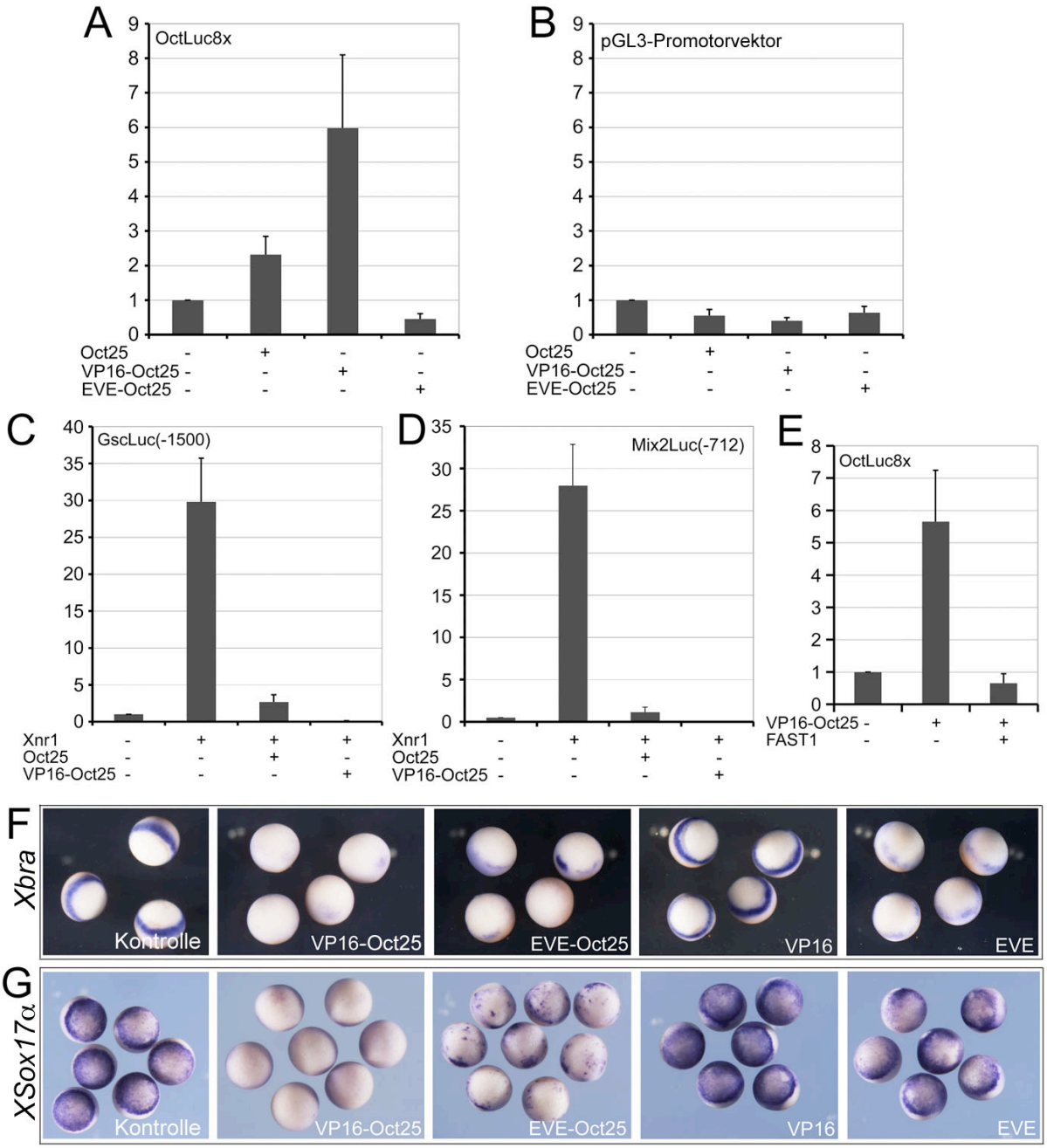


Abb. 19: Effekt des Fusionsproteins von Oct25 mit VP16 oder EVE auf die Aktivität der Promotoren und die Bildung des Mesendoderms. (A) Im Gegensatz zur Überexpression von EVE-Oct25 wird ein artifizielles Oktamer-Reporterkonstrukt durch das wildtypische Oct25 und durch VP16-Oct25 stimuliert. (B) Die Hochregulation hängt spezifisch vom Oktamer-Motiv ab, da der pGL3 Promotor alleine nicht stimuliert wird. (C, D) Sowohl Oct25 als auch VP16-Oct25 haben einen reprimierenden Effekt auf die Promotoren von *Gsc* (C) und *Mix2* (D). (E) Die durch *VP16-Oct25* vermittelte Stimulation des Oktamer-Reporterkonstruktes wird durch eine Koinjektion mit *FAST1* inhibiert. (F) Whole Mount *in situ* Hybridisierungen zeigen, dass die Injektion von *VP16-Oct25* bzw. *EVE-Oct25* eine Repression der wildtypischen Expression von *Xbra* und *XSox17a* hervorrufen. Im Vergleich dazu hat die injizierte *VP16* RNA alleine keinen und die *EVE* RNA lediglich einen schwachen Einfluss auf die Expression beider Gene.

Weiter galt es herauszufinden, wie sich eine vegetale Überexpression von VP16-Oct25 bzw. EVE-Oct25 im Vergleich zu Oct25, das die Bildung des Mesendoderms unterdrückt, auf die frühzeitige Embryogenese auswirkt. Die vegetale Injektion sowohl von *VP16-Oct25* als auch

von *EVE-Oct25* RNA führte ebenso zu einer Inhibition der Mesendodermbildung, was anhand der reduzierten Expression von *Xbra* (Abb. 19F) und *XSox17α* (Abb. 19G) zu erkennen ist. Im Gegensatz dazu zeigten Kontrollinjektionen mit *VP16* weder einen Effekt auf die *Xbra* noch auf die *XSox17α* Expression. Die Injektion der RNA, die für die EVE-Domäne kodiert, zeigte eine leicht reduzierte Expression von *Xbra* und *XSox17α*. Allerdings kann das nicht die Ursache für die massive Repression sein, die durch *EVE-Oct25* RNA hervorgerufen wird (Abb. 19F und G). Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass die Fusionen des Oct25-Proteins weder mit einer zusätzlichen aktivatorischen noch mit einer repressorischen Domäne eine Veränderung des inhibierenden Einflusses von Oct25 auf die Bildung des Mesendoderms ausüben.

3.1.17. Der reprimierende Einfluss von Oct25 auf die Transkription von *Gsc* und *Mix2* ist unabhängig von der Aktivität der HDACs

Aufgrund der Tatsache, dass in vorangegangenen Veröffentlichungen bereits eine Interaktion von Oct4 mit HDAC2, einer Histondeacetylase der Klasse I (HDAC I) (Khochbin et al., 2001), dargestellt werden konnte (Wang et al., 2006), liegt die Vermutung nahe, dass Oct4 oder das Orthologe in *Xenopus*, Oct25, die Genexpression über Modifikationen des Acetylierungsstatus der Histone regulieren kann. Um eine eventuelle Abhängigkeit der durch Oct25 verursachten Reprimierung des Nodal/Aktivin Signalweges von HDACs zu zeigen, wurde mit Hilfe von Trichostatin A (TSA), einem spezifischen Inhibitor der HDAC I (Yoshida et al., 1990), versucht, den reprimierenden Einfluss von Oct25 auf die Expression von *Gsc* und *Mix2* zu beeinflussen. Nach Behandlung nichtinjizierter Kontrollen mit TSA zeigte sich interessanterweise eine ektopische Aktivierung der Transkription von *Gsc*, was an einem ringförmigen Muster um den Blastoporus zu erkennen war (Abb. 20). Diese Beobachtung macht deutlich, dass die ventrale Unterdrückung der *Gsc* Expression in wildtypischen Embryonen auf die Aktivität der HDACs zurückzuführen ist. Da jedoch dorsal injizierte *Oct25* RNA in TSA behandelten Embryonen die Transkription von *Gsc* auf der dorsalen Seite inhibierte, was in einem Halbkreis auf der ventralen Seite resultierte (Abb. 20), scheint die durch Oct25 hervorgerufene Unterdrückung von *Gsc* nicht von TSA und folglich nicht von einer Aktivität der HDACs beeinflusst zu werden. Hingegen ließ die Expression von *Mix2* bei TSA Behandlung keine signifikanten Veränderungen in Bezug auf die Kontrollembryonen erkennen (Abb. 20). Auch in diesem Fall verursachte eine Oct25 Überexpression trotz TSA Behandlung eine effiziente Inhibition der *Mix2* Expression. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass der reprimierende Einfluss von Oct25 auf

Gsc und *Mix2* unabhängig von der Aktivität der Histondeacetylasen der Klasse I ist.

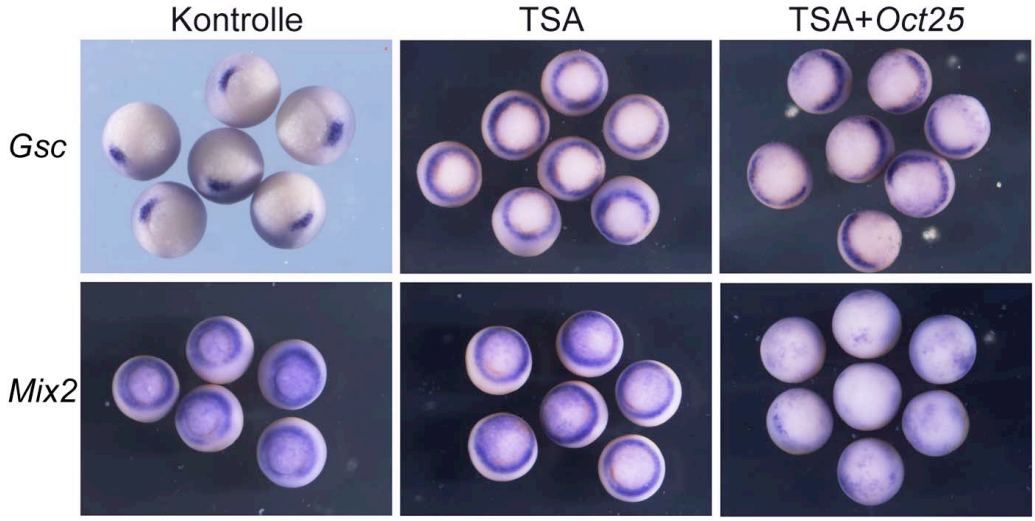


Abb. 20: Bei Unterdrückung der HDAC I Aktivität verändert sich der inhibitorische Einfluss von Oct25 auf *Gsc* und *Mix2* nicht. (A) Im Vergleich zur wildtypischen Expression von *Gsc* führt eine TSA Behandlung zu einer zirkulären Färbung und einem Verlust der dorsalen Expression nach zusätzlicher *Oct25* RNA Injektion. *Mix2* zeigt nach TSA Behandlung keine Veränderung des wildtypischen Expressionsmusters. Allerdings führt eine Überexpression von Oct25 zu einer Inhibition von *Mix2* in TSA behandelten Embryonen.

3.2. Untersuchung des *Dppa* Gens von *Xenopus laevis*

3.2.1. Identifizierung des *XDppa2/4* Gens in *Xenopus*

Bisher konnten *Dppa* Gene nur in Eutheria, d.h., in höheren Säugetieren identifiziert werden. Bei der Suche nach *Dppa* Genen in *Xenopus* wurde eine Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) Analyse mit der humanen und murinen cDNA und den Proteinsequenzen der *Dppa* Gene gegen Sequenzdatenbanken von *Xenopus laevis* durchgeführt. Ein Abgleich der Proteinsequenz von mDppa4 gegen die Proteindatenbank resultierte in der Identifikation von ähnlichen Sequenzen in *Xenopus laevis* (Accession Nummer: NP 001089568) und *Xenopus tropicalis* (Accession Nummer: AAI61173). Eine reverse BLAST Analyse gegen Sequenzdatenbanken der Säugetiere erbrachte die höchste Homologie zu mDppa2. Dies kann als Indiz gewertet werden, dass es sich bei dem gefundenen Protein aus *Xenopus laevis* möglicherweise um ein Dppa2/4 Homologes handelt. Ein Vergleich der Proteinsequenzen von *X. laevis* und *X. tropicalis* gegen Dppa2 und Dppa4 von Maus und Mensch (Abb. 21A) zeigt insgesamt eine Übereinstimmung von beinahe 25% (chemischer Identität). Im Vergleich hierzu liegt die Identität zwischen mDppa2 und hDppa2, respektive zwischen mDppa4 und

hDppa4 bei 44 bzw. 52%. Ein Vergleich der Proteinsequenzen von mDppa2 und mDppa4 weist eine Übereinstimmung von 32% auf (Maldonado-Saldivia et al., 2007).

Bemerkenswerterweise kann die SAP-Domäne als gemeinsames Merkmal von Dppa2 und Dppa4 aus Säugetieren auch in den *Xenopus* Sequenzen nachgewiesen werden (Abb. 21A und 21B). Weiterhin konnte in den Dppa2 und Dppa4 Proteinen aus Säugetieren ein zusätzlicher konservierter Bereich im C-Terminus gefunden werden (Maldonado-Saldivia et al., 2007), der ebenfalls in XDppa2/4 identifiziert wurde. Aufgrund ihrer höheren Konservierung wird sie im Folgenden als DCR (Dppa2/4 conserved region) bezeichnet. Im Gegensatz zur restlichen Proteinsequenz enthalten sowohl die SAP-Domäne als auch die DCR eine Vielzahl an identischen oder chemisch ähnlichen Aminosäuren zwischen den einzelnen Spezies (Abb. 21B). Detailliertere Untersuchungen haben gezeigt, dass jeweils eines dieser beiden Module in diversen Proteinen vorkommt. Die Tatsache, dass das Vorhandensein beider Domänen in einem Protein aber lediglich für Dppa2 und Dppa4 nachgewiesen werden konnte, ist ein starkes Indiz dafür, dass XDppa2/4 ein Mitglied dieser Proteinklasse darstellt (Abb. 21B). Während die humanen und murinen Dppa Proteine aus etwa 300 Aminosäuren bestehen, enthalten die XDppa2/4 Proteine von *X.l.* und *X.t.* lediglich 240 bzw. 241 Aminosäuren (Abb. 21A).

Zusätzliche Datenbankanalysen ergaben ein putatives Dppa2/4 Homologes auf dem 4. Chromosom des marsupialen Kurzschwanz-Opossums (Monodelphis domestica) (Ensembl: ENSMODP00000022542). Dieser Fund wurde durch die vom australischen Fuchskusu (Trichosurus vulpecula) stammenden ESTs EC346351 und EC304522 untermauert. Weiterhin konnte ein *Dppa2/4*-ähnliches Gen innerhalb des Reptiliengenoms von Rotkehlanolis (*Anolis carolinensis)* identifiziert werden (ENSACAP00000003902), das mit den zugehörigen, aus Ovarien abgeleiteten ESTs FG764357 und FG91940 übereinstimmt. Es muss erwähnt werden, dass alle diese aus den Datenbanken abgeleiteten Proteinsequenzen eine DCR- und eine SAP-Domäne enthalten. Folglich ist die Existenz von *Dppa2/4*-ähnlichen Genen nicht auf höhere Säugertiere begrenzt, sondern ebenfalls in niederen Vertebraten nachweisbar. Ein aus den Ergebnissen der BLAST-Analysen der humanen, murinen, Opossum, *Anolis* und *Xenopus* Dppa2/4-Proteine abgeleiteter phylogenetischer Stammbaum ist in Abb. 21C dargestellt. Unter Verwendung der Datenbank von Ensembl konnte das *XDppa2/4* Gen im Scaffold 673 (*Xenopus tropicalis genome assembly; Version 4.1*) lokalisiert werden. Es kodiert für acht Exons (Abb. 21D). In weiteren BLAST-Analysen des Genoms von *Xenopus tropicalis* konnte unter Verwendung der *XDppa2/4* Sequenz kein weiteres Gen identifiziert werden, das sowohl für die SAP-Domäne als auch für die DCR kodiert.

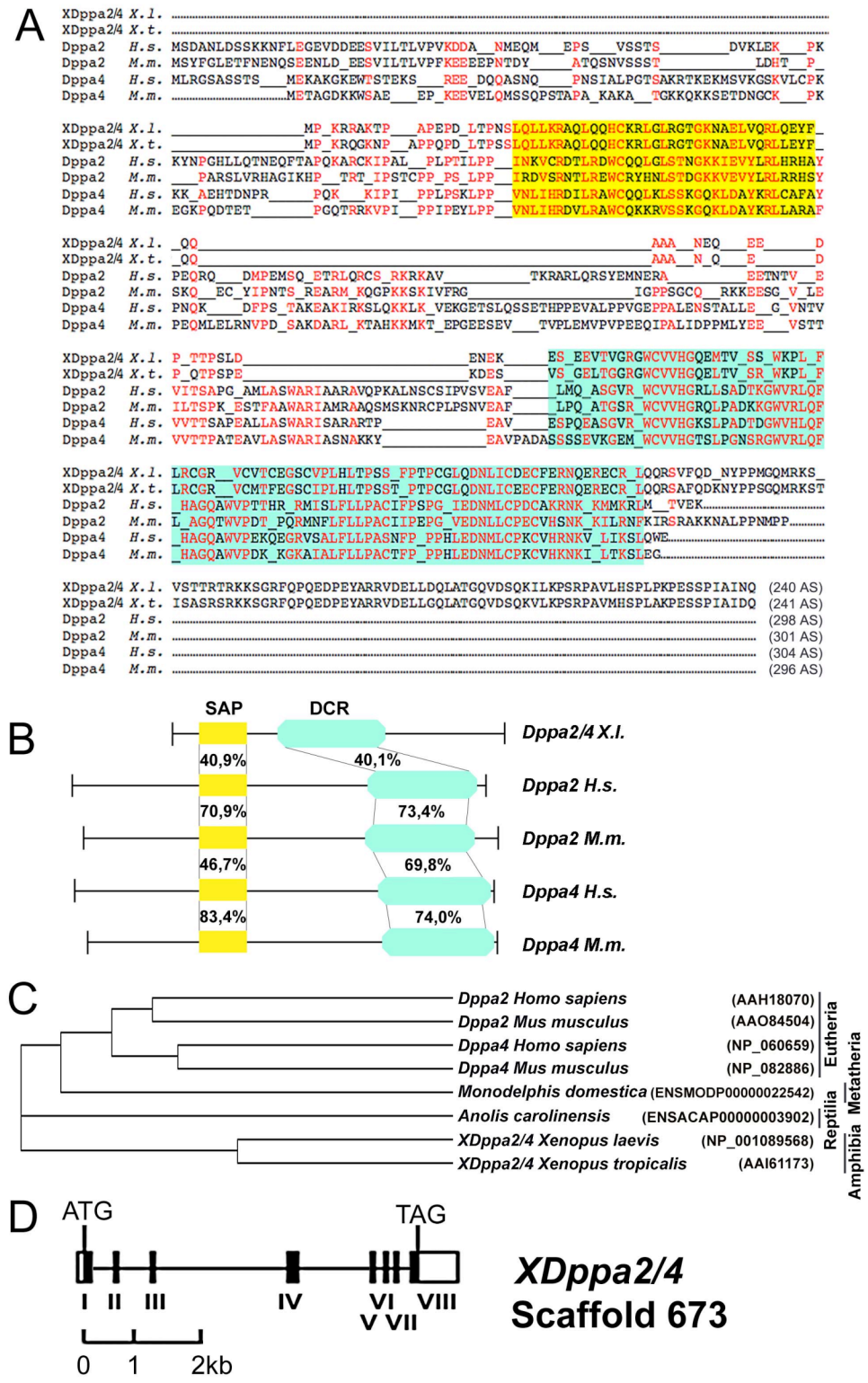


Abb. 21: Struktur der Dppa Proteine und genomische Organisation des *XDppa2/4* Gens. (A) Vergleich der Dppa Proteinsequenzen von Maus (*M.m.*), Mensch (*H.s.*), *Xenopus laevis* (*X.l.*) und *Xenopus tropicalis* (*X.t.*). Chemisch ähnliche Aminosäuren sind in rot dargestellt, (PAM100, mind. 4 von 6) und Deletionen sind durch Striche gekennzeichnet. Die SAP-Domäne (35 AS) ist gelb und die C-terminal konservierte Region (DCR: 78-82 AS) türkis unterlegt. (B) Schematische Darstellung der SAP- und DCR- Domänen innerhalb der Dppa Proteine. Die Prozentzahlen geben den Grad der chemischen Identität zwischen den dargestellten Domänen der entsprechenden Proteine an. (C) Phylogenetischer Stammbaum der Dppas- und verwandter Proteine verschiedener Arten (in Klammern sind Accessionnummern angegeben). (D) Erwartete genomische Organisation des in Scaffold 673 lokalisierten *XDppa2/4* Gens (*Xenopus tropicalis* genome assembly; Version 4.1). Exons sind mit römischen Zahlen gekennzeichnet. Schwarze Boxen repräsentieren die kodierenden Bereiche und weiße Boxen die UTRs.

3.2.2. Die Expression des *XDppa2/4* Gens entspricht dem Muster eines Pluripotenzfaktors

Eine Gemeinsamkeit aller bisher bekannten Pluripotenzfaktoren ist die Expression in pluripotenten Zellen und das Ausschalten der Genaktivität nach eintretender Differenzierung. Für *XDppa2/4* wurde das zeitliche Expressionsmuster unter Verwendung von extrahierter RNA aus Embryonen unterschiedlichen Entwicklungsstadien mittels real time RT-PCR analysiert (Abb. 22A).

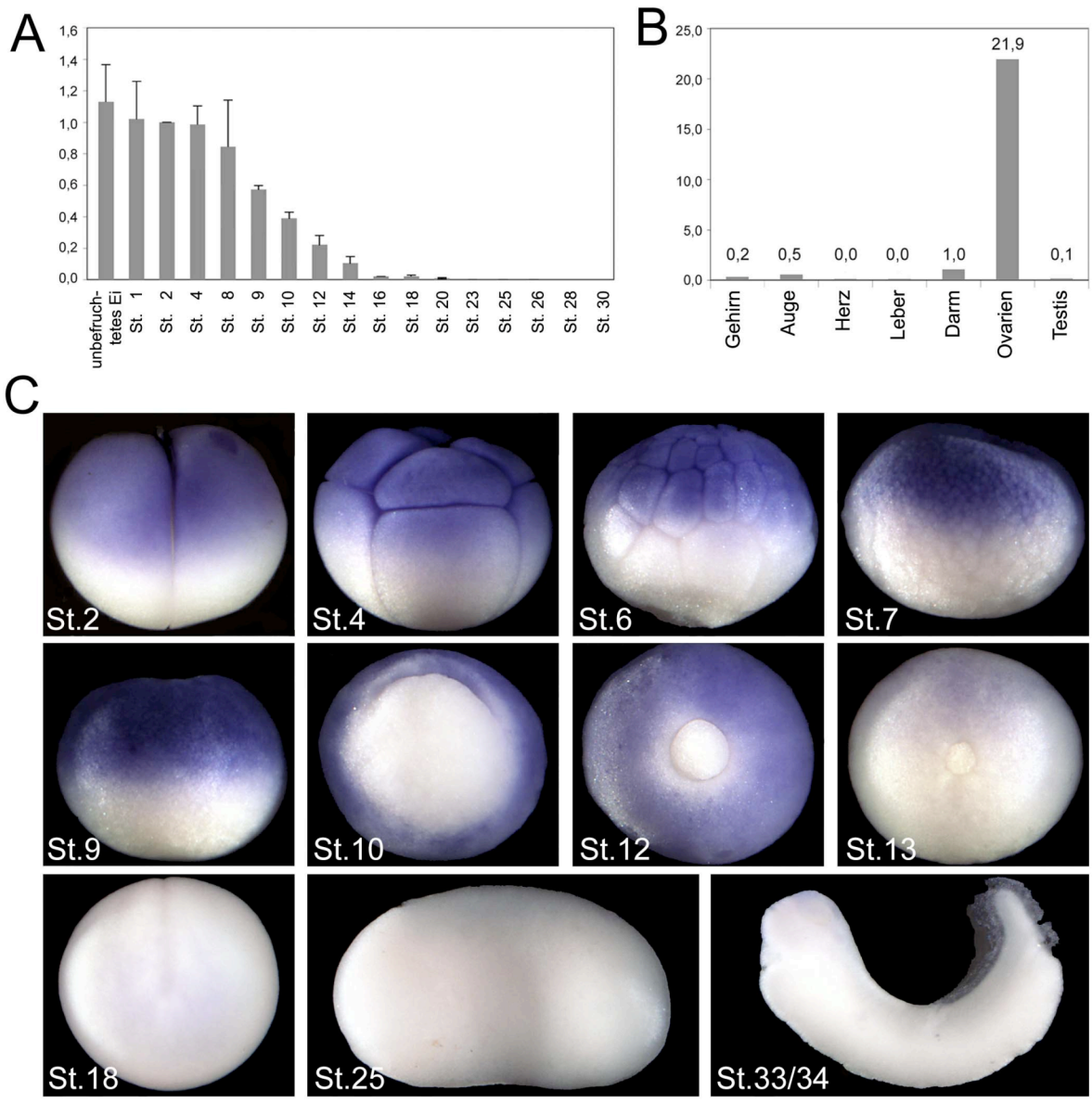


Abb. 22: Zeitliches und räumliches Expressionsmuster von *XDppa2/4* während der frühen embryonalen Entwicklung und in adulten Geweben von *Xenopus laevis*. (A, B) Die Expression wurde über real time RT-PCR von embryonaler RNA verschiedener Entwicklungsstadien (Nieuwkoop und Faber, 1967) (A) und von isolierter RNA verschiedener adulter Gewebe (B) analysiert. Die Werte in den Diagrammen werden in relativen Einheiten angegeben, die zum Expressionslevel des Stadiums 2 bzw. des Darms normalisiert sind. (C) *XDppa2/4* Whole Mount *in situ* Hybridisierung von Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien (Stadium 2-34). Die Färbung zeigt eine Anreicherung der Transkripte innerhalb der animalen Hälfte und den Verlust von *XDppa2/4* Transkripten während der Neurulation.

XDppa2/4 wird maternal transkribiert und die Transkripte sind während der ersten Teilungsstadien in hohen Mengen nachweisbar. Nach Midblastula Transition (MBT), dem Start der zygotischen Expression, kommt es jedoch zu einer schnellen und kontinuierlichen Abnahme der *XDppa2/4* Transkripte. Zum Ende der Neurulation können keine Transkripte mehr nachgewiesen werden. Die Untersuchung der relativen Transkriptverteilung in adulten Geweben mittels real time RT-PCR zeigt eine stark auf Ovarien begrenzte Expression, wohingegen nur eine geringe Transkriptmenge im Darm und fast keine Expression im Gehirn, Auge, Herz, Leber und Testis detektierbar ist (Abb. 22B).

Die räumliche Verteilung der *XDppa2/4* Transkripte während der frühen Embryonalentwicklung wurde mittels Whole Mount *in situ* Hybridisierung überprüft (Abb. 22C). In frühzeitigen Teilungsstadien findet sich eine Anreicherung der *XDppa2/4* Transkripte in der animalen Hälfte der Embryonen. Während der Blastula-Stadien (St. 7,5 bis 9) und Gastrulation (St. 10-12) entspricht diese Region den zukünftigen bzw. sich differenzierenden ektodermalen und mesodermalen Geweben. Zu Beginn der Neurulation sind die *XDppa2/4* Transkripte auf die neuroektodermalen Zellen begrenzt, während Transkripte in den Embryonen zum Zeitpunkt des Neuralfaltenschlusses (St. 16-18) weder per real time RT-PCR noch per Whole Mount *in situ* Hybridisierung detektiert werden können. Folglich spiegelt *XDppa2/4* das Expressionsmuster eines Pluripotenzgens wider. Es zeigt eine maternale Komponente und seine Aktivität wird mit beginnender Differenzierung während der Gastrulation dramatisch reduziert.

3.2.3. Der Knockdown von XDppa2/4 führt zu einer fehlgesteuerten Gastrulation und letztlich zu einer Unterdrückung der Neurulation

Um den Funktionsverlust von XDppa2/4 zu untersuchen, wurde ein Morpholino *antisense* Oligonukleotid verwendet (Abb. 23A). Zur Kontrolle seiner Effizienz wurde ein *in vitro* Transkriptions-/Translations-Test durchgeführt. Bei Zugabe des XDppa2/4 Morpholino *antisense* Oligonukleotides (XDppaMO) wurde die Synthese des XDppa2/4-Proteins unterbunden, die ohne Zugabe des XDppaMOs oder mit Zugabe eines Kontrollmorpholinos (ctrlMO) ungehindert stattfand. Um die Spezifität des XDppaMO zu testen, wurden in die Sequenz des *XDppa2/4*, die für die Bindung des XDppaMO essentiell ist, sieben stille Mutationen eingefügt (*mut-XDppa2/4*; Abb. 23A). Diese Veränderung von *XDppa2/4* resultierte im *in vitro* Transkriptions-/Translationssystems darin, dass die Proteinsynthese trotz Zugabe des XDppaMO ungehindert stattfand (Abb. 23B).

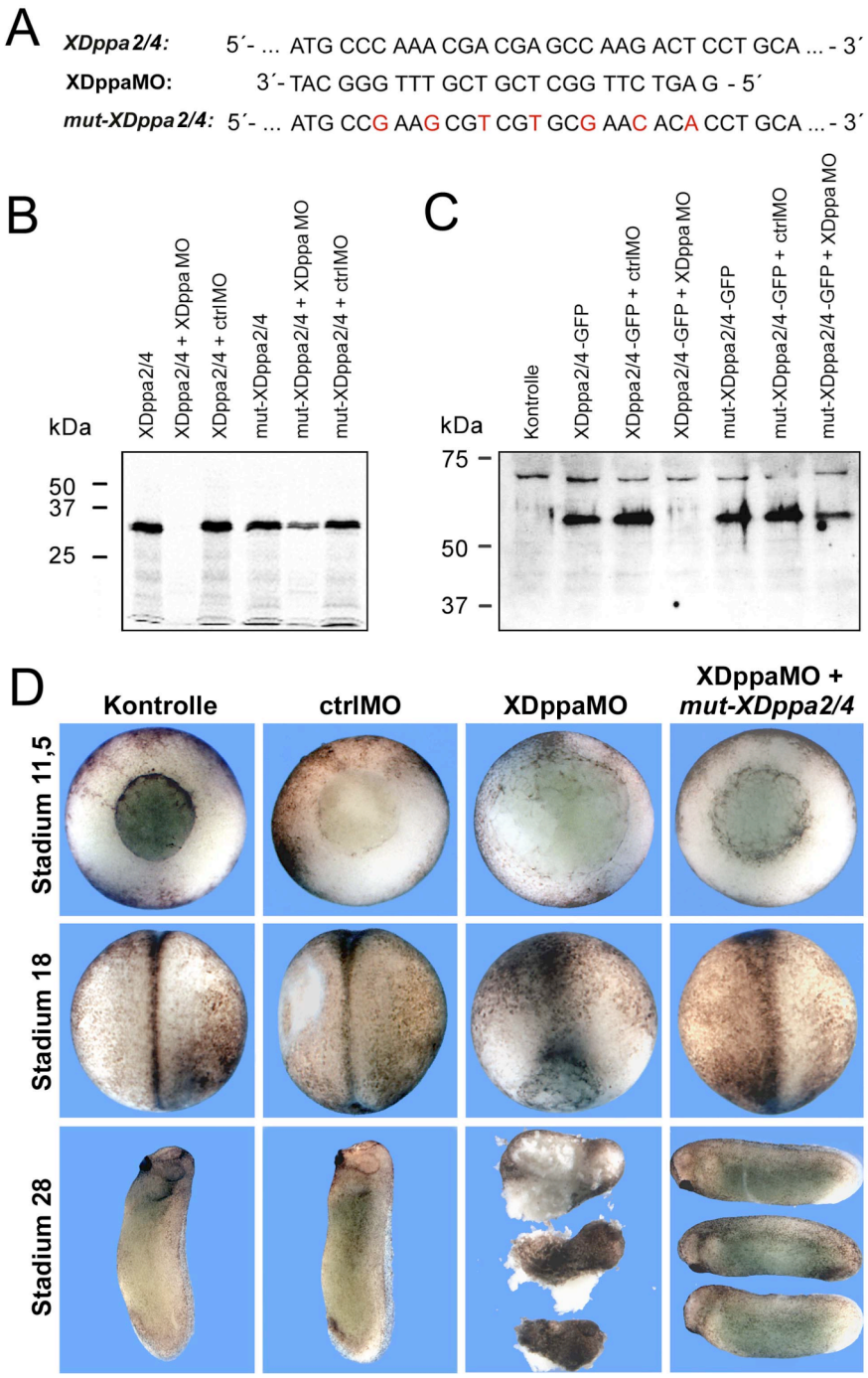


Abb. 23: Der Knockdown von XDppa2/4 führt zu Defekten während der Gastrulation und dem Ausbleiben der Neurulation. (A) Gegenüberstellung der cDNA Sequenz von *XDppa2/4*, dem Morpholino *antisense* Oligonukleotid (XDppaMO) und der Nukleotidsequenz des für die Revertierung verwendeten *mut-XDppa2/4*, das sieben stille Mutationen (rot gekennzeichnet) innerhalb der Bindesequenz enthält. (B) Die *in vitro* Transkription/Translation von 0,5 µg *XDppa2/4* Plasmid, jedoch nicht von 0,5 µg *mut-XDppa2/4* wird spezifisch durch die Zugabe von 10 ng XDppaMO, aber nicht durch 10 ng ctrlMO inhibiert. (C) Über einen Immunoblot mit einen Antikörper gegen die GFP-Markierung konnte nachgewiesen werden, dass die Translation von 500 pg *XDppa2/4-EGFP* aber nicht von *mut-XDppa2/4-EGFP* RNA durch die Koinjektion von 50 ng XDppaMO gehemmt wird. Im Gegensatz dazu haben 50 ng ctrlMO keinen Einfluss auf die Proteinexpression. Die Injektionen wurden im 2-Zell-Stadien getätigt und die Extrakte von Embryonen im Stadium 11,5 präpariert. (D) Die Injektion des XDppaMOs resultiert in einem weit offenen Blastoporus im Stadium 11,5, der bis zum Stadium 18 offen bleibt, und in einer fehlenden Bildung der Neuralfurche. Die meisten Embryonen sterben bis zum Ende der Neurulation und disaggregieren. Die Koinjektion von 50 ng XDppaMO mit 600 pg *mut-XDppa2/4* RNA revertiert den Phänotyp zu dem des Wildtyps. Als Kontrollen wurden nichtinjizierte und ctrlMO injizierte Embryonen abgebildet.

Die Effizienz des Morpholinos wurde auch *in vivo* unter Verwendung von C-terminal EGFP (enhanced green fluorescent protein)-fusioniertem XDppa2/4 und anschließender Analyse der embryonalen Proteinextrakte über einen Immunoblot untersucht (Abb. 23C). Im Gegensatz zu der unterdrückten Translation, die nach Koinjektion der *XDppa2/4-EGFP* RNA mit dem XDppaMO durch ein fehlendes EGFP-Signal deutlich wurde, konnte eine Koinjektion der *mut-XDppa2/4-EGFP* RNA mit dem XDppaMO die Translation des EGFP-Fusionsproteins nicht unterbinden. Ebenso wurde eine unveränderte Proteinsynthese nach Koinjektion von *XDppa2/4-EGFP* RNA mit ctrlMO festgestellt.

Embryonen mit Funktionsverlust für XDppa2/4, denen eine Gesamtmenge von 50 ng XDppaMO in beide Blastomeren des 2-Zell-Stadiums injiziert worden waren, zeigten in Stadium 11 in 228 von 240 Fällen einen weit geöffneten Blastoporus (Abb. 23D). Im Vergleich dazu findet sowohl bei nichtinjizierten (239/240) als auch bei 50 ng ctrlMO injizierten (233/237) Embryonen eine ungestörte Gastrulation statt. Während im Stadium 18 in nichtinjizierten Embryonen und nach ctrlMO Injektion der Schluss der Neuralfurche zu sehen ist, zeigen 78% (187/240) der XDppaMO injizierten Embryonen einen gestörten Blastoporusschluss. Folglich resultiert die Störung oder das Fehlen der typischen Gastrulationsbewegungen in einem Verlust der Neuralfaltenbildung. Zum Zeitpunkt, an dem normalerweise die Neurulation beendet ist, beginnen die XDppaMO injizierten Embryonen zu sterben und zu zerfallen. Die Spezifität des dargestellten XDppa2/4-Knockdown-Phänotyps konnte mit Hilfe einer Koinjektion des XDppaMO und der *mut-XDppa2/4-EGFP* RNA gezeigt werden (Abb. 23D). 86% (129/150) der Embryonen wiesen einen wildtypisch revertierten Phänotyp mit ungestörten Gastrulations- und Neurulationsbewegungen auf. 70% (107/150) dieser Embryonen entwickelten sich vollkommen normal und erreichten das Schwanzknospenstadium.

3.2.4. Die Überexpression von XDppa2/4, mDppa2 und mDppa4 resultiert in identischen Phänotypen

Zur Untersuchung des Phänotyps nach ektopischer Expression von *XDppa2/4* und zur Aufdeckung funktioneller Beziehungen zwischen *XDppa2/4* und *Dppa2* sowie *Dppa4* aus Säugetieren wurden variierende Mengen von *XDppa2/4*, *mDppa2* bzw. *mDppa4* in die äquatoriale Region beider Blastomeren von 2-Zell-Embryonen injiziert. Diese Injektionsexperimente resultierten in Dosis-abhängigen Defekten während der Gastrulation. Nach Injektion von 400 pg *XDppa2/4* RNA zeigten 95% (382/400) der Embryonen im Stadium 11,5 eine Verzögerung ihrer Entwicklung, die durch den weit offenen Blastoporus

der injizierten Embryonen gegenüber den nichtinjizierten Embryonen deutlich wird (Abb. 24). *XDppa2/4* RNA injizierte Embryonen des Stadiums 17 wiesen weiterhin einen verzögerten Schluss des Blastoporus in 80% (325/400) der Embryonen auf. Entgegen dem Knockdown-Phänotyp, fand in Embryonen nach ektopischer Expression von *XDppa2/4* eine Bildung der Neuralplatte statt und sie zeigten sowohl eine Ausbildung der anterior/posterioren, als auch der dorsal/ventralen Achse. Allerdings kam es zu einem unvollständigen Schluss der Neuralfurche, zu einer reduzierten Bildung der Achse sowie zu missgebildeten Kopf- und Schwanzstrukturen.

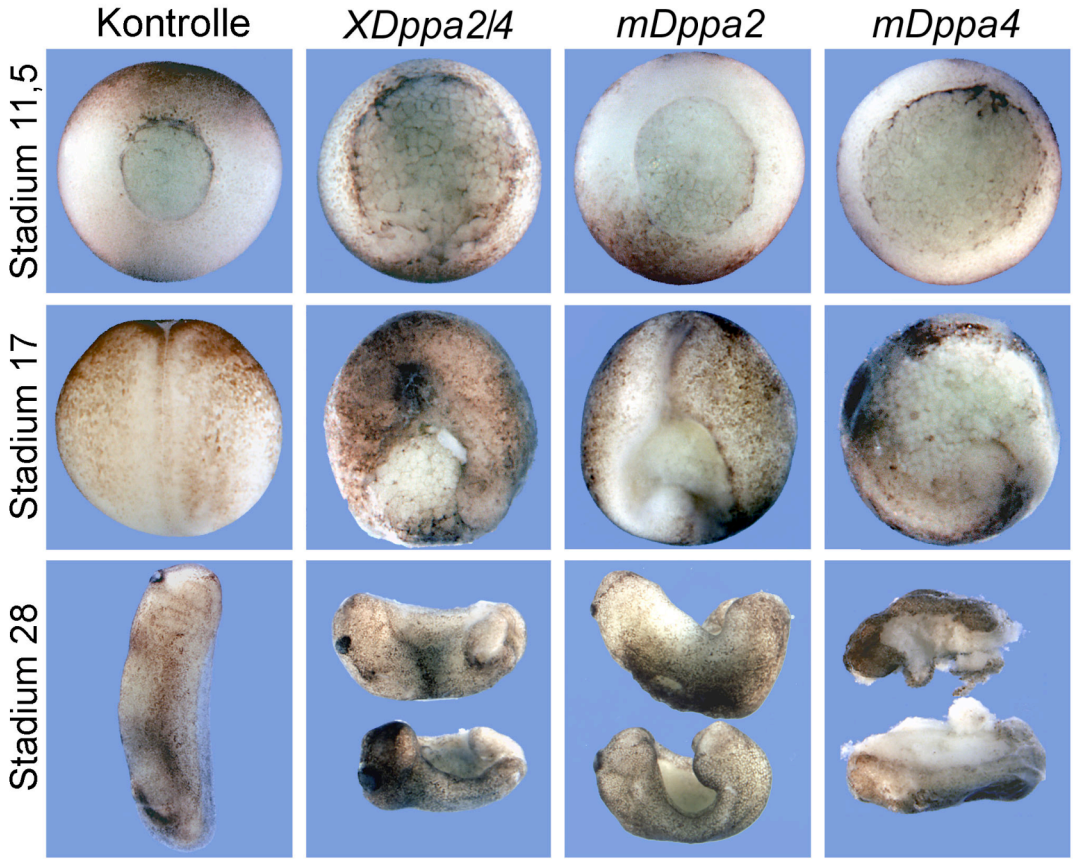


Abb. 24: Überexpression von *XDppa2/4*, *mDppa2* und *mDppa4* zeigt vergleichbare phänotypische Effekte. Die Injektion von 400 pg *XDppa2/4* RNA führt zu Defekten beim Schließen des Blastoporus. Im Stadium 17 bilden die Embryonen eine Neuralfalte aus, zeigen aber noch immer einen offenen Blastoporus. Im Schwanzknospenstadium verursacht die Überexpression von *XDppa2/4* ein Verkürzung der Körperachse, eine Reduktion der Schwanzstrukturen und eine offenen Neuralfurche. Die Injektion von 800 pg *mDppa2* oder 100 pg *mDppa4* führt zu vergleichbaren Phänotypen einschließlich des fehlenden Blastoporusschlusses, der offenen Neuralfalte und der Achsenreduktion.

Nach ektopischer Expression des murinen *Dppa2* bzw. *Dppa4* in *Xenopus laevis* wurden vergleichbare Phänotypen erhalten. Auch hier konnten ein fehlender Schluss des Blastoporus, offene Neuralfurchen und Reduktion der Achsen beobachtet werden. Allerdings scheinen unterschiedliche Mengen zur Erzeugung des identischen Phänotyps von *mDppa2* und *mDppa4* gegenüber *XDppa2/4* erforderlich zu sein. Um den Effekt zu erhalten, den 400 pg

XDppa2/4 RNA erzeugen, mussten 800 pg *mDppa2*, aber nur 100 pg *mDppa4* RNA injiziert werden. Der Grund für diesen Unterschied könnte in unterschiedlichen Translationseffizienzen liegen, die in *in vitro* Translationstests beobachtet wurden (nicht gezeigt).

3.2.5. Expression von Markergenen nach Überexpression und Funktionsverlust von XDppa2/4

Zur Aufklärung der molekularen Grundlagen für die beobachteten Phänotypen und um zusätzliche funktionelle Übereinstimmungen zwischen *XDppa2/4*, *mDppa2* und *mDppa4* aufzudecken, wurden Whole Mount *in situ* Hybridisierungen der injizierten Embryonen für ausgewählte Markergene durchgeführt (Abb. 25). Die Embryonen wurden nach dem bereits beschriebenen Prinzip im 2-Zell-Stadium injiziert und im Stadium 11 analysiert. *XDppa2/4* RNA injizierte Embryonen zeigten im Gegensatz zu nichtinjizierten Kontrollembryonen eine reduzierte *Xbra*-Färbung, die speziell auf der ventrolateralen Seite deutlich wurde. Für *mDppa2* bzw. *mDppa4* injizierte Embryonen wurde das gleiche Ergebnis erhalten. Nach Funktionsverlust von XDppa2/4 zeigte sich ebenfalls eine schwache Färbung für *Xbra*. Eine starke Unterdrückung des ventralen Markers *BMP4* und des ventrolateralen Markers *MyoD* wurden bei der Überexpression von XDppa2/4, mDppa2 bzw. mDppa4 nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde die ventrale Expression von *BMP4* nach Morpholinoinjektion verstärkt, jedoch wurde die Färbung für *MyoD* ebenfalls verringert. Die Transkription von *Gsc* findet in diesem Stadium im invaginierten Mesoderm statt. Nach Überexpression von XDppa2/4, mDppa2 bzw. mDppa4 ließ sich eine verstärkte Expression unmittelbar an der Blastoporuslippe beobachten. Nach Injektion des XDppaMO war die *Gsc*-Färbung nur auf den Bereich der dorsalen Lippe begrenzt. Dies lässt vermuten, dass die Invagination und Wanderung der Zellen inhibiert wurde. Das normalerweise auf der dorsalen animalen Seite exprimierte *XSox2* wurde durch Überexpression von XDppa2/4, mDppa2 und mDppa4 stark reduziert und nach Funktionsverlust von XDppa2/4 vollständig inhibiert. *Xema*, ein *Fox* Gen, das in die Unterdrückung des Mesendoderms innerhalb des Ektoderms involviert ist (Suri et al*.,* 2005; Mir et al*.,* 2007), zeigte generell eine gesteigerte Expression. Eine besonders stark erhöhte Transkriptmenge war nach *XDppa2/4* und *mDppa4* RNA Injektion zu erkennen. Auch für das XDppaMO zeigte sich eine leichte Verstärkung der Färbung. Die Expression von *XSox17α*, dessen Färbung im endodermalen Bereich der Kontrollen lokalisiert ist, wurde durch eine ektopische Expression stark gestört, aber durch die XDppaMO Injektion kaum beeinflusst.

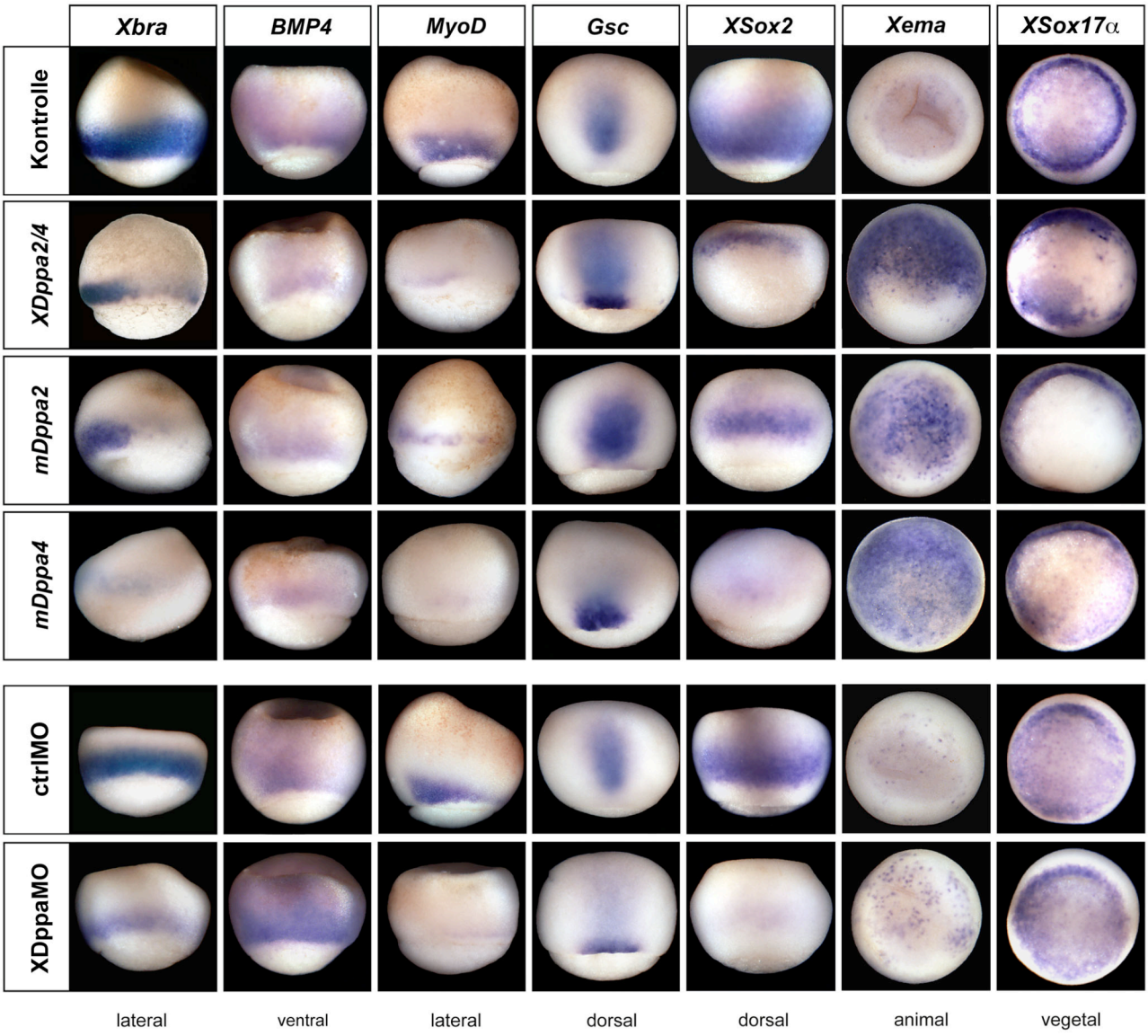


Abb. 25: Analyse des *XDppa2/4* Knockdowns und der Überexpression mittels Whole Mount *in situ* Hybridisierungen. *XDppa2/4*, *mDppa2* und *mDppa4* RNA sowie das XDppaMO wurden in beide Blastomeren des 2-Zell-Stadiums injiziert. Die Whole Mount *in situ* Hybridisierung wurde im Stadium 11 für *Xbra*, *BMP4*, *MyoD*, *Gsc*, *XSox2*, *Xema* und *XSox17α* durchgeführt. Nichtinjizierte und ctrlMO injizierte Embryonen zeigen das wildtypische Expressionsmuster der analysierten Marker in Stadium 11. Die jeweilige Orientierung der Embryonen ist angegeben. In der vegetalen Ansicht ist die dorsale Seite stets nach oben und in der lateralen Ansicht die dorsale Seite nach links ausgerichtet.

Um einen genaueren Überblick über die Veränderungen der Genexpression zu erhalten, wurden Analysen des Funktionsverlusts (Abb. 26A) und der Überexpressionen (Abb. 26B) mittels real time RT-PCRs für ausgewählte Marker durchgeführt. Die Expression des pan-mesodermalen Markers *Xbra* war sowohl in den XDppaMO injizierten Embryonen als auch nach Überexpression von XDppa2/4, mDppa2 bzw. mDppa4 leicht verringert (Abb. 26A und B). Die Injektion des XDppaMOs führte zu einer gesteigerten Expression von *BMP4* und *XVent1*.

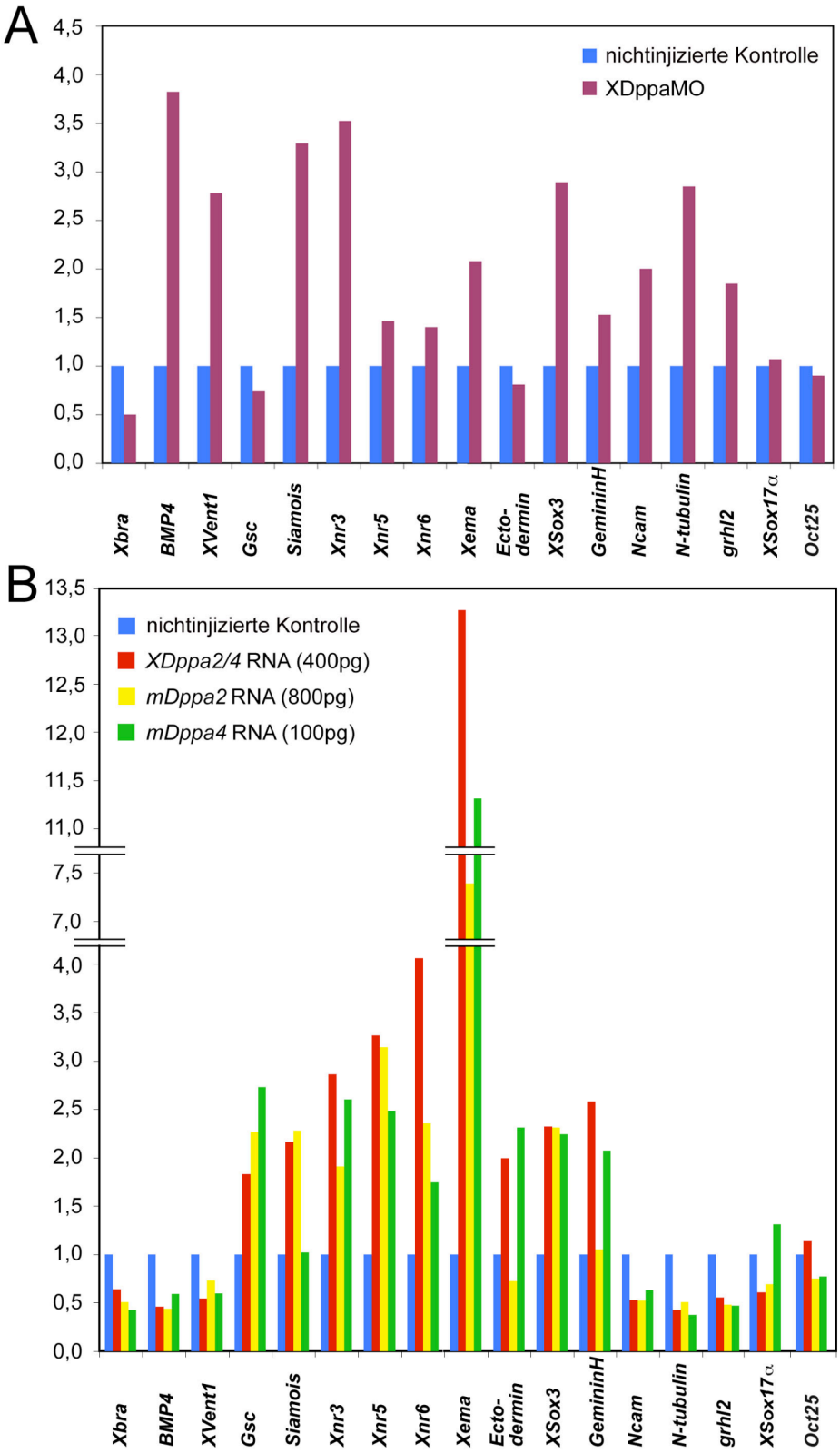


Abb. 26: Analyse des *XDppa2/4* Knockdowns und der Überexpression mittels real time RT-PCR. (A) Die RT-PCR wurde nach Injektion von 50 ng XDppaMO auf Embryonen des Stadiums 11 für die Marker *Xbra*, *BMP4*, *XVent1*, *Gsc, Xnr3*, *Siamois*, *Xnr5*, *Xnr6*, *Xema*, *Ectodermin*, *XSox3*, *Geminin H*, *Ncam*, *N-tubulin*, *grhl2, XSox17α* und *Oct25* durchgeführt. Die in Diagrammen dargestellten Werte sind als relative Einheiten angegeben und auf die Expression der ctrlMO injizierten bzw. auf die nichtinjizierten Embryonen normalisiert. (B) Für die Analyse der Überexpressionen wurden die Embryonen mit *XDppa2/4*, *mDppa2* oder *mDppa4* RNA in beide Blastomeren des 2-Zell-Stadiums injiziert. Die real time RT-PCRs wurden für die gleichen Marker wie für den Knockdown durchgeführt.

Im Gegensatz dazu führten die Injektionen von *XDppa2/4*, *mDppa2* bzw. *mDppa4* RNA zu einer Verringerung der *BMP4* und der *XVent1* Expression. Eine geringe Senkung der *Gsc* Expression, einem Marker für dorsales Mesoderm, konnte nach dem Funktionsverlust von XDppa2/4 beobachtet werden. Ein Anstieg der *Gsc* Expression zeigte sich nach Überexpression von XDppa2/4, mDppa2 bzw. mDppa4. Sowohl nach Überexpression als auch nach XDppaMO Injektion war eine erhöhte Transkriptmenge für die Zielgene von VegT, *Xnr5* und *Xnr6*, als auch von den β-Catenin Zielgenen, *Xnr3* und *Siamois*, zu detektieren. Während der ektodermale Marker *Ectodermin* durch einen Funktionsverlust von XDppa2/4 nicht beeinflusst wurde, führte eine Injektion der RNA von *XDppa2/4*, *mDppa2* bzw. *mDppa4* zu einer erhöhten Expression von *Ectodermin*. *Xema* zeigte ebenfalls eine höhere Menge an Transkripten. Die neuroektodermalen Marker *XSox3* und *Geminin H* ließen sowohl nach Injektion des Morpholinos als auch nach Injektion der RNA eine gesteigerte Expression beobachten. Die neuralen Marker *Ncam* und *N-tubulin* sowie der epidermale Marker *grainyhead like 2* (*grhl2*) wiesen nach XDppaMO Injektion einen Anstieg ihrer Expression und nach Überexpression eine Reduktion ihre Transkriptmenge auf. Ein früh exprimierter Marker für endodermales Gewebe, *XSox17α*, wurde durch XDppa2/4-Funktionsverlust nicht beeinflusst, aber nach Injektion der RNAs leicht verringert. Der Pluripotenzmarker *Oct25* wurde sowohl nach Funktionsverlust als auch nach Überexpression kaum verändert. Hingegen verursachte die Überexpression von Oct25 einen zweifachen Anstieg der *XDppa2/4* Transkripte (Daten werden hier nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Injektion von XDppaMO durch einen Anstieg der *Xnrs* und der ventralen mesodermalen Marker zusammen mit einem Anstieg der neuroektodermalen, neuralen und epidermalen Markern charakterisiert ist. Allerdings resultiert auch die Überexpression in einem Anstieg der mesendodermalen Induktoren und der neuroektodermalen Marker, was eine molekulare Interpretation der Funktionsverlusts- und Überexpressionsphänotypen erschwert. Interessanterweise lassen sich trotz einiger quantitativer Abweichungen keine qualitativen Unterschiede in den von *XDppa2/4* gegenüber *mDppa2* und *mDppa4* verursachten Veränderungen der Genexpression beobachten.

3.2.6. Die Injektion von *mDppa2* revertiert den frühen Phänotyp des XDppa2/4-Funktionsverlusts

Die meisten der bisher dargestellten Ergebnisse zeigen, dass das *XDppa2/4* Gen nach Überexpression die gleichen phänotypischen Auswirkungen wie *mDppa2* und *mDppa4* hervorruft. Ebenso wird ein gleiches regulatorisches Potential auf diverse Zielgene

beobachtet. Allerdings stellt sich die Frage, ob die Funktion des *XDppa2/4* tatsächlich von den Homologen der Maus übernommen werden kann. Um in Erfahrung zu bringen, ob die RNA von *mDppa2* bzw. *mDppa4* alleine oder in Kombination den durch einen Funktionsverlust von XDppa2/4 verursachten Phänotyp wieder aufheben kann, wurden entsprechende Injektionsexperimente durchgeführt.

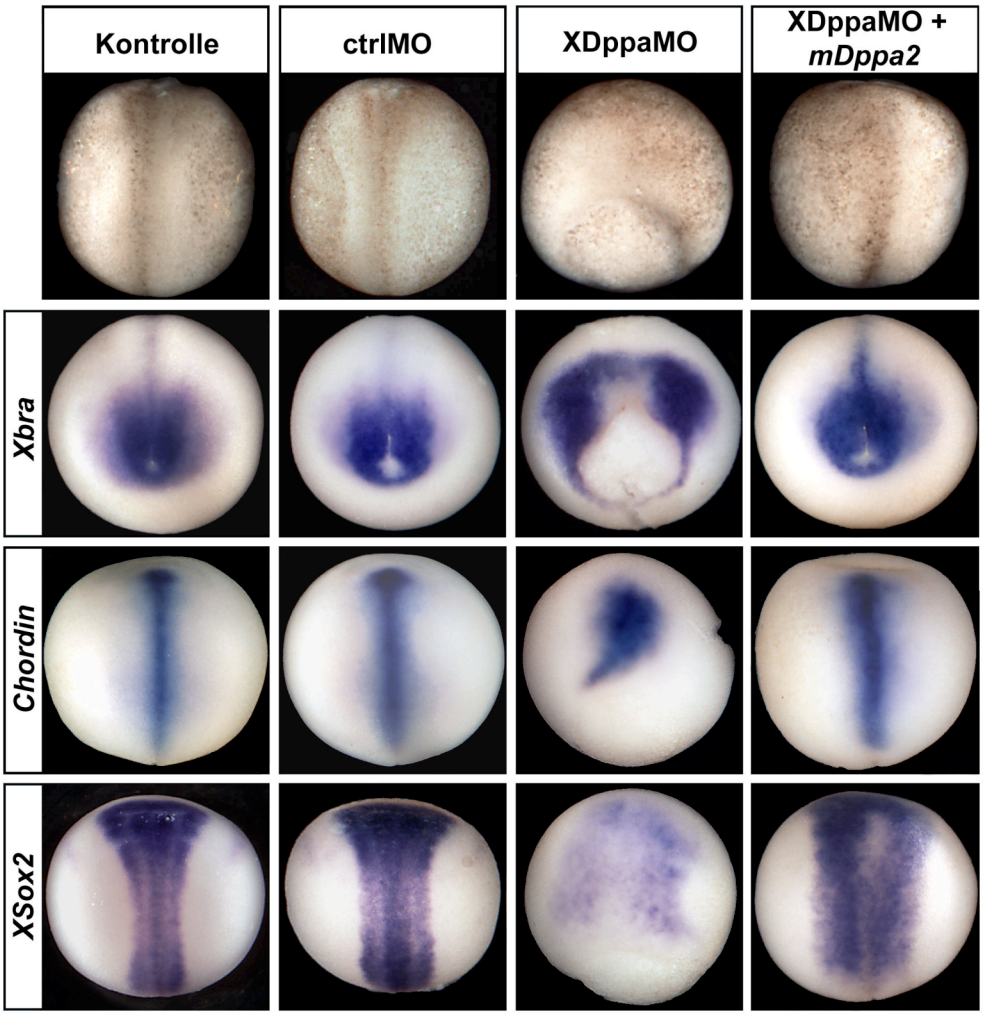


Abb. 27: In XDppaMO injizierten Embryonen konnte der Schluss des Blastoporus und die Bildung der Neuralfurche durch *mDppa2* RNA revertiert werden. Der offene Blastoporus und das Fehlen der Neuralfalte, wie sie nach Knockdown von XDppaMO zu beobachten sind, kann durch eine Koinjektion mit *mDppa2* RNA aufgehoben werden. Die Expressionsmuster der Marker *Xbra* (ventrale Ansicht), *Chordin* und *XSox2* (dorsale Ansicht), die nach Injektion des XDppaMOs entweder delokalisiert oder verringert sind, weisen eine revertierte, wildtypische Verteilung im Stadium 17 auf. Nichtinjizierte und ctrlMO injizierte Embryonen zeigen einen normalen Verlauf der Neurulation und eine wildtypische Expression der untersuchten Gene.

Eine XDppaMO-Dosis von 50 ng wurde mit verschiedenen RNA-Mengen von *mDppa2*, *mDppa4* oder mit Kombinationen beider RNAs injiziert. Die Koinjektionen des Morpholino Oligonukleotides mit unterschiedlichen *mDppa4* RNA-Dosen führten nicht zu einem normalen wildtypischen Ablauf der Embryonalentwicklung. Hingegen konnten bei 68% (102/150) der injizierten Embryonen nach Koinjektion des XDppaMO mit 600 pg *mDppa2*

RNA ein normaler Schluss der Blastoporen beobachtet werden (Abb. 27). Da die Bildung der Neuralfalte im Stadium 17 stattfand, verlief offensichtlich auch die Neurulation normal (Abb. 27).

Während *in situ* Hybridisierungen in Neurulationsstadien für den mesodermalen Marker *Xbra*, den axialen Marker *Chordin* und den neuroektodermalen Marker *XSox2* reduzierte oder delokalisierte Färbungen in XDppaMO injizierten Embryonen offenbarten, verhielten sich die Färbungen nach Koinjektion mit *mDppa2* RNA wie die wildtypischen Kontrollen bzw. die ctrlMO injizierten Embryonen. Dieses Ergebnis spiegelt die revertierte Ausbildung der Achse und der Neurulation wider. Allerdings konnte ein Absterben der Embryonen, wie es bei den XDppaMO injizierten Embryonen vor Beginn des Schwanzknospenstadiums zu verzeichnen war, weder durch eine Injektion mit *mDppa2* oder *mDppa4* RNA noch durch Koinjektion eines Gemisches unterschiedlicher Mengen von *mDppa2* und *mDppa4* verhindert werden (Ergebnisse hier nicht präsentiert).

Aus diesem Ergebnis kann gefolgert werden, dass Säugetier Dppa2 das XDppa2/4 während der Gastrulation und Neurulation funktionell ersetzen kann. Jedoch scheint XDppa2/4 für zusätzliche Funktionen benötigt zu werden, die in *Xenopus* weder durch mDppa2 noch mDppa4 erfüllen werden können.

3.2.7. Funktionelle Untersuchungen der verschiedenen Domänen in XDppa2/4

Zur funktionellen Analyse der SAP- und der DCR-Domäne wurden eine Reihe von Deletionskonstrukten hergestellt (Abb. 28A), die davon abgeleiteten Transkripte injiziert und die Phänotypen im Stadium 11,5 dokumentiert (Abb. 28B). Unerwarteterweise führte eine Injektion der *ΔSAP* RNA zu einer bruchstückhaften Bildung des Blastoporus, wie sie bereits für die Überexpression des wildtypischen XDppa2/4 beschrieben wurde. Auf der anderen Seite konnte für alle Konstrukte, denen die DCR-Domäne fehlte (ΔDCR, ΔSAPΔDCR oder XDppa2/4 aa1-65), eine ungestörte Entwicklung der Embryonen verzeichnet werden. Die Injektion von *ΔN-term* bzw. *aa66-240* RNA, die für Proteine mit DCR-Domäne kodieren, verursachte wiederum schwerwiegende Defekte während der Gastrulation. Außerdem glich die Expression von untersuchten Markergenen, die von *ΔSAP* RNA injizierten Embryonen mit Hilfe von real time RT-PCR-Analysen dokumentiert wurde, der nach Überexpression des wildtypischen XDppa2/4 (Ergebnisse werden hier nicht gezeigt).

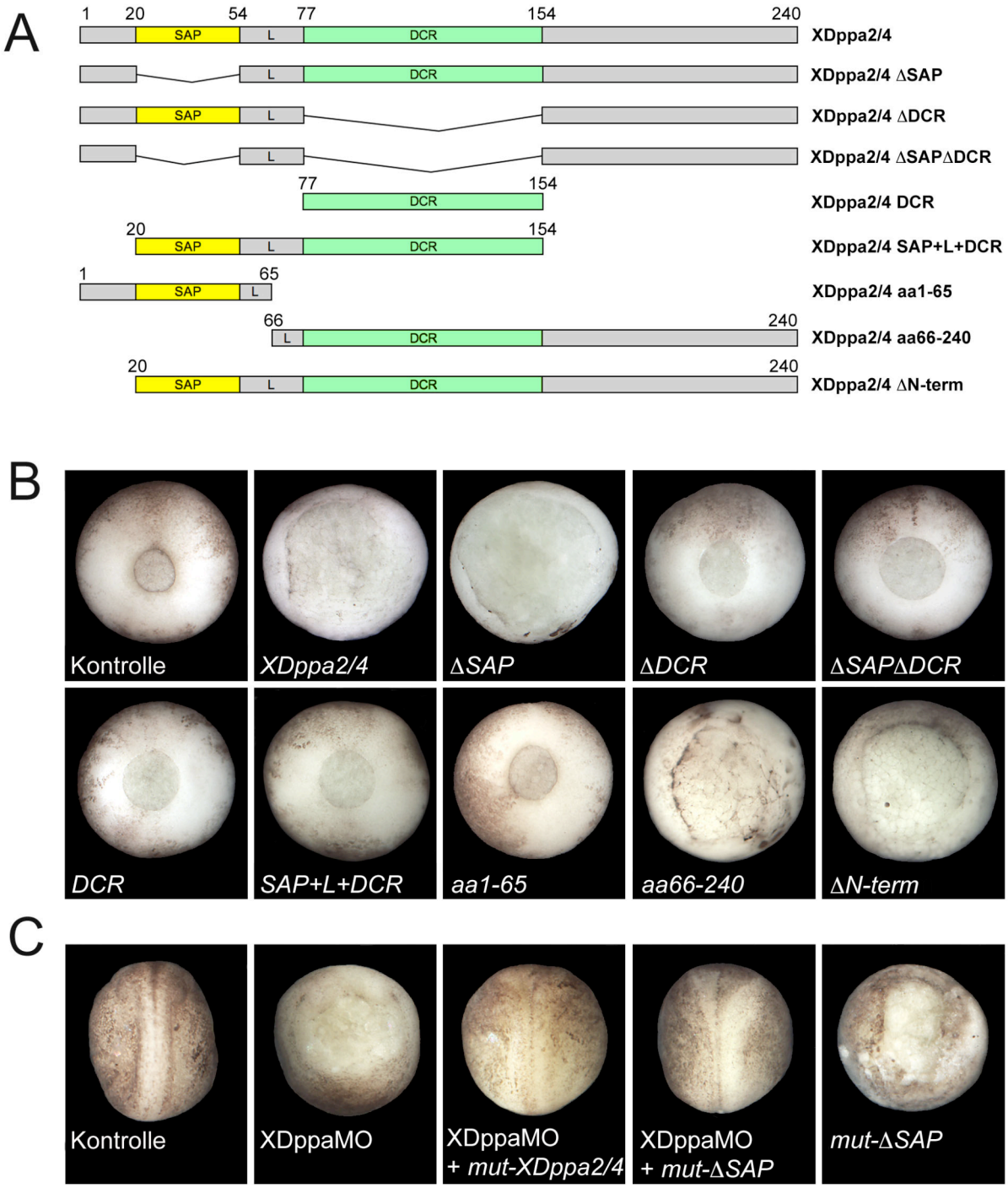


Abb. 28: Die SAP-Domäne ist nicht für die nach Überexpression oder Funktionsverlust beobachteten Phänotypen während der Gastrulation verantwortlich. (A) Schematischer Überblick der in Überexpressionsanalysen untersuchten Deletionskonstrukte von *XDppa2/4*. Die Zahlen repräsentieren die Aminosäurepositionen. Die SAP-Domäne ist in gelb und die DCR-Domäne in türkis dargestellt. Der Bereich des Linkers ist mit L markiert. (B) Phänotypen nach Überexpression der Deletionsmutanten. Vegetale Ansichten im Stadium 11,5 von nichtinjizierten Kontrollen und Embryonen, die mit 800 pg *XDppa2/4, ΔSAP, ΔDCR, ΔSAPΔDCR, DCR, SAP+L+DCR, aa1-65, aa66-240* und *ΔN-term* RNA in beide Blastomeren von Zweizellern injiziert waren. (C) Revertierung des Funktionsverlustphänotyps (MO) mittels Koinjektion von *mut-ΔSAP* RNA. Dorsale Ansicht von Embryonen im Stadium 18. Nach Injektion von 50 ng MO oder 650 pg *mut-ΔSAP* weisen Embryonen Gastrulationsdefekte und einen Verlust der Neurulation auf. Die Bildung der neuralen Falte wird durch Koinjektion von 50 ng MO mit 550 pg *mut-XDppa2/4* oder 600 pg *mut-ΔSAP* RNA revertiert.

Diese Ergebnisse belegen, dass nicht die SAP-Domäne sondern die DCR-Domäne für die phänotypischen Auswirkungen der XDppa2/4 Überexpression verantwortlich ist. Jedoch waren weder die Injektionen der *DCR* noch der *SAP+L+DCR* RNA ausreichend, eine gestörte Gastrulation zu generieren. Somit bedarf es vermutlich eines weiteren Bereichs der C-terminalen Region von XDppa2/4 zur Erzeugung der phänotypischen Defekte während der Gastrulation.

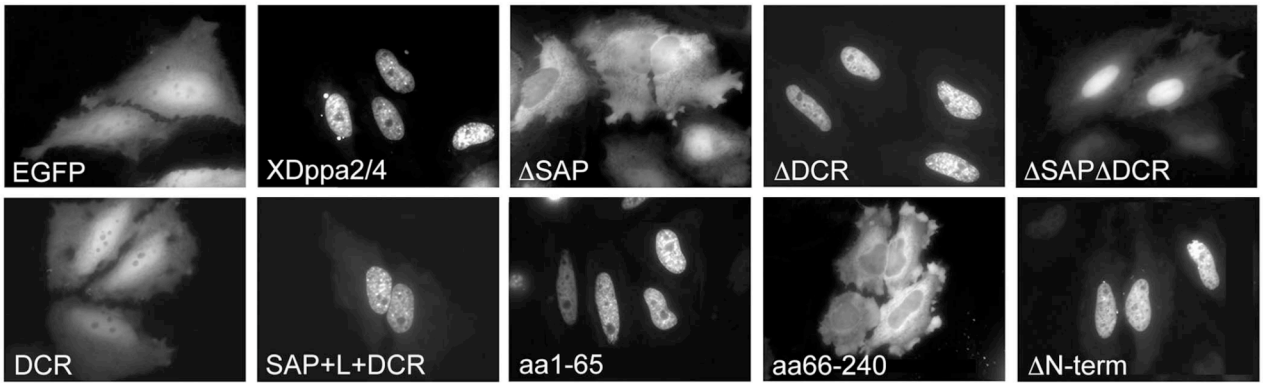
Es stellte sich ferner die Frage, ob die SAP-Domäne für die Funktion von XDppa2/4 notwendig ist. Daher wurden Revertierungsversuche mit dem *mut-XDppa2/4*- sowie dem *mut-ΔSAP*-Konstrukt, in denen jeweils die Bindungsstelle des XDppaMOs durch sieben stille Mutationen verändert worden waren, durchgeführt. Es zeigte sich, dass der auf das Morpholino zurückzuführende Phänotyp sowohl durch Koinjektion der *mut-XDppa2/4* sowie der *mut-ΔSAP* RNA unterdrückt werden konnte (Abb. 28C). Alle bei dem Blastoporusschluss und der Neuralfaltenbildung auftretenden Defekte konnten vollständig revertiert werden. Im Gegensatz zu den Embryonen nach Koinjektion der wildtypischen *XDppa2/4* (*mut-XDppa2/4*) RNA sterben die mit *mut-ΔSAP* RNA koinjizierten Embryonen nach dem Abschluss der Neurulation. Das deutet darauf hin, dass das Fehlen der SAP-Domäne für den während der Gastrulation auftretenden Funktionsverlustphänotyp nicht verantwortlich ist. Allerdings scheint das Vorhandensein der SAP-Domäne für das spätere Überleben der Embryonen essentiell zu sein.

3.2.8. Lokalisation der XDppa2/4-Deletionsmutanten innerhalb der Zelle

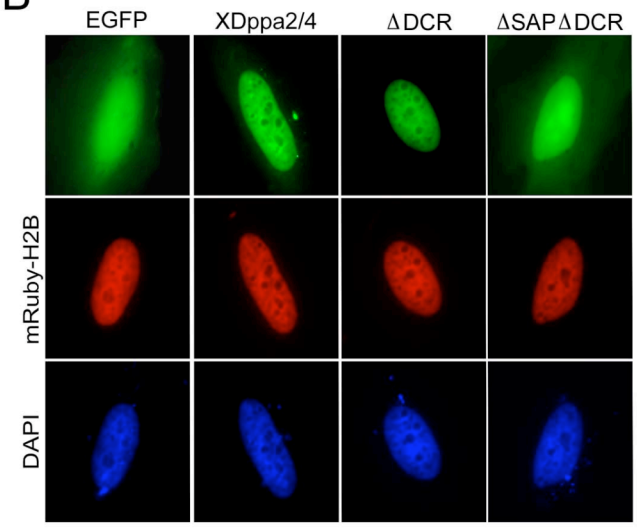
Die intrazelluläre Verteilung von XDppa2/4 sowie der XDppa2/4-Deletionsmutanten (Abb. 28A) wurde in HeLa-Zellen mittels EGFP-fusionierter XDppa2/4 Proteine genauer untersucht (Abb. 29A und Zusammenfassung Abb. 29C). XDppa2/4-EGFP wies im Gegensatz zum ubiquitär verteilten EGFP eine nukleäre Lokalisation mit spezifischer intranukleärer Verteilung auf. Diese spezifische Verteilung im Zellkern wurde durch den Nachweis einer Kolokalisation mit Histon H2B als Chromatinassoziation identifiziert (Abb. 29 B). Die Deletion der SAP-Domäne führte zu einer deutlichen Abnahme der Fluoreszenz innerhalb des Zellkerns. Da sich die höchste Anreicherung des XDppa2/4 ΔSAP-EGFP-Fusionsproteins im Zytoplasma nachweisen ließ, wird vermutet, dass die SAP-Domäne eine wichtige Funktion für die Kernlokalisation und die Assoziation am Chromatin übernimmt. Im Gegensatz dazu wiesen die Proteine mit einer Deletion der DCR-Domäne eine vom wildtypischen Protein nicht zu unterscheidende nukleäre Anhäufung auf. Überraschenderweise war auch eine ΔSAPΔDCR-Mutante, die weder die SAP- noch die DCR-Domäne enthält, im Zellkern

lokalisiert. Allerdings war bei dieser Mutante keine Chromatinassoziation mehr nachweisbar (Abb. 29B). Die alleinige Fusion der DCR an das EGFP führte zu einer dem EGFP ähnlichen ubiquitären Verteilung. Die beiden mutanten Proteine SAP+L+DCR und aa1-65 waren wiederum fast ausschließlich im Zellkern lokalisiert. Dem entgegen war die Mutante aa66-240, die Teile des Linker-Bereiches, die DCR-Domäne und das C-terminale Ende enthält, bevorzugt im Zytoplasma anzutreffen. Scheinbar haben die ersten 19 Aminosäuren des N-Terminus keine Bedeutung für eine nukleäre Lokalisation, da die ΔN-terminale Mutante eine Lokalisation im Zellkern aufwies. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse führt zu dem Schluss, dass die SAP-Domäne nicht nur für den nukleären Import sondern auch für die Chromatinassoziation verantwortlich ist.

A



B



C

	Lokalisation		Überexpressionsphänotyp (Abb.24/Anzahl der Embryonen)
	Zytosol	Zellkern	
EGFP	diffus, ubiquitär		- (0/41)
XDppa2/4	+	+++	+ (85/85)
XDppa2/4 ΔSAP	+++	+	+ (45/45)
XDppa2/4 ΔDCR	±	+++	- (0/36)
XDppa2/4 ΔSAPΔDCR	+	+++ (diffus)	- (5/39)
XDppa2/4 DCR	diffus, ubiquitär		- (1/44)
XDppa2/4 SAP+L+DCR	+	+++	- (2/46)
XDppa2/4 aa1-65	+	+++	- (0/48)
XDppa2/4 aa66-240	+++	+	+ (57/57)
XDppa2/4 ΔN-Term	+	+++	+ (54/54)

Abb. 29: Verteilung der XDppa2/4-Deletionsmutanten innerhalb der Zelle (A) und innerhalb des Kerns (B). (A) Nach Transfektion der HeLa-Zellen mit den angegebenen GFP-fusionierten Deletionskonstrukten von *XDppa2/4* ergeben sich Unterschiede in der zellulären Lokalisation. Als Kontrollen wurde das EGFP-Konstrukt alleine oder wildtypisches XDppa2/4 transfiziert. (B) Eine gemeinsame Histon H2B-mRuby- (rot) und DAPI- (blau) Färbung zeigt, dass lediglich die XDppa2/4 Proteine, die eine vollständige SAP-Domäne enthalten, mit dem Chromatin assoziieren können. (C) Ergebnisse der subzellulären Lokalisation im Vergleich zu den nach Überexpression der angegebenen Konstrukte erhaltenen Phänotypen.

Die DCR-Domäne hingegen enthält kein NLS. Trotzdem wiesen die Deletionen beider Domänen, der SAP- und der DCR-Domäne, wiederum eine nukleäre Verteilung auf, obwohl das mutierte Protein offensichtlich nicht mehr mit dem Chromatin assoziieren konnte.
Interessanterweise existiert kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der intrazellulären Lokalisation und der phänotypischen Auswirkung der einzelnen Mutanten (Abb. 29C). Während die Lokalisation innerhalb des Zellkerns, außer für die Mutante ΔSAPΔDCR, von einer intakten SAP-Domäne abzuhängen scheint, ist für die Erzeugung eines phänotypischen Effekts nach ektopischer Expression die Anwesenheit der C-terminal verlängerten DCR-Domäne notwendig. Das Auftreten des Gastrulationsphänotyps ist dabei unabhängig von einer nukleären oder zytoplasmatischen Lokalisation. Diese Ergebnisse werden noch komplizierter durch die Beobachtungen, dass weder das wildtypische Protein ausschließlich im Kern noch alle Mutanten, denen die SAP-Domäne fehlt, ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert, sind.

3.2.9. Sowohl Funktionsverlust als auch ektopische Expression von XDppa2/4 induzieren den apoptotischen Signalweg

Als nächstes wurde der Frage nachgegangen, ob es sich bei dem Absterben der Embryonen in den Funktionsverlusts- und Überexpressionsstudien um einen apoptotischen Prozess handelt oder ob es in den Embryonen aufgrund fehlgeleiteter Gastrulations- und Neurulationsbewegungen zu Nekrosen kommt. Es ist bereits bekannt, dass eine Überexpression von mDppa4 die Differenzierung der mesodermalen Zellen unterdrückt und ein massiver Zelltod ausgelöst wird (Masaki et al., 2007). Zur Analyse apoptotischer Zellen wurde ein TUNEL mit Embryonen des Stadiums 11,5 und 18 durchgeführt, die entweder im 2-Zell-Stadium mit XDppaMO oder *XDppa2/4*, *mDppa2* bzw. *mDppa4* RNA injiziert worden waren (Abb. 30A). Im Vergleich zu nichtinjizierten bzw. ctrlMO injizierten Embryonen wurde während der Gastrulation in den *XDppa2/4* und *mDppa4* injizierten Embryonen eine hohe Zahl apoptotischer Zellen gefunden. Im Gegensatz dazu war zu diesem Entwicklungszeitpunkt weder nach Injektion der *mDppa2* RNA noch des XDppaMO eine erhöhte Apoptoserate zu verzeichnen. Während der Neurulation, bei der *XDppa2/4* und *mDppa4* RNA Injektionen sogar noch höhere apoptotische Raten nach sich ziehen, fanden sich auch nach XDppa2/4-Funktionsverlust eine erhöhte Zahl an Zellen, in denen Apoptose induziert war. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigte sich jedoch bei den mit *mDppa2* RNA injizierten Embryonen lediglich ein leichter Anstieg apoptotischer Zellen.
Der apoptotische Signalweg kann parallel von verschiedenen Kaspasen angeschaltet werden.

Mit Hilfe einer auf Lumineszenz basierenden Methode kann die Aktivität zweier Initiatorkaspasen, nämlich Kaspase 8 und 9, ermittelt werden. Die Kaspase 8 vermittelt die Induktion der extrinsischen rezeptorvermittelten Apoptose und die Kaspase 9 ist für die stressinduzierte intrinsische Apoptose verantwortlich. Zusätzlich wurden auch die Aktivitäten der Effektorkaspasen 3 und 7 bestimmt. Für die Untersuchung wurden *XDppa2/4*, *mDppa2*, *mDppa4* RNA und XDppaMO injizierte Embryonen der Stadien 11,5 und 18 (Abb. 30B) eingesetzt. Im Stadium 11,5 konnte für die injizierten Embryonen kein Unterschied der Aktivitäten der Initiatorkaspasen 8 und 9 gegenüber den Kontrollen detektiert werden. Allerdings war die Aktivität der Effektorkaspasen 3/7 bei Embryonen des Stadiums 11,5 sowohl für die XDppa2/4 (Faktor 3,4) als auch für die mDppa4 (Faktor 2,0) Überexpression verstärkt. Im Stadium 18 konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Aktivitäten der Kaspasen 8 und 9 nach Injektion und in Kontrollen detektiert werden. Im Vergleich dazu konnte nach *XDppa2/4* eine 3,3-fach und nach *mDppa4* RNA Injektion eine 2,6-fach erhöhte Kaspase 3/7-Aktivität gemessen werden. Darüber hinaus war zu diesem Entwicklungsstadium auch bei Funktionsverluststudien von XDppa2/4 ein Anstieg der Kaspase 3/7-Aktivität um den Faktor 1,8 zu verzeichnen.

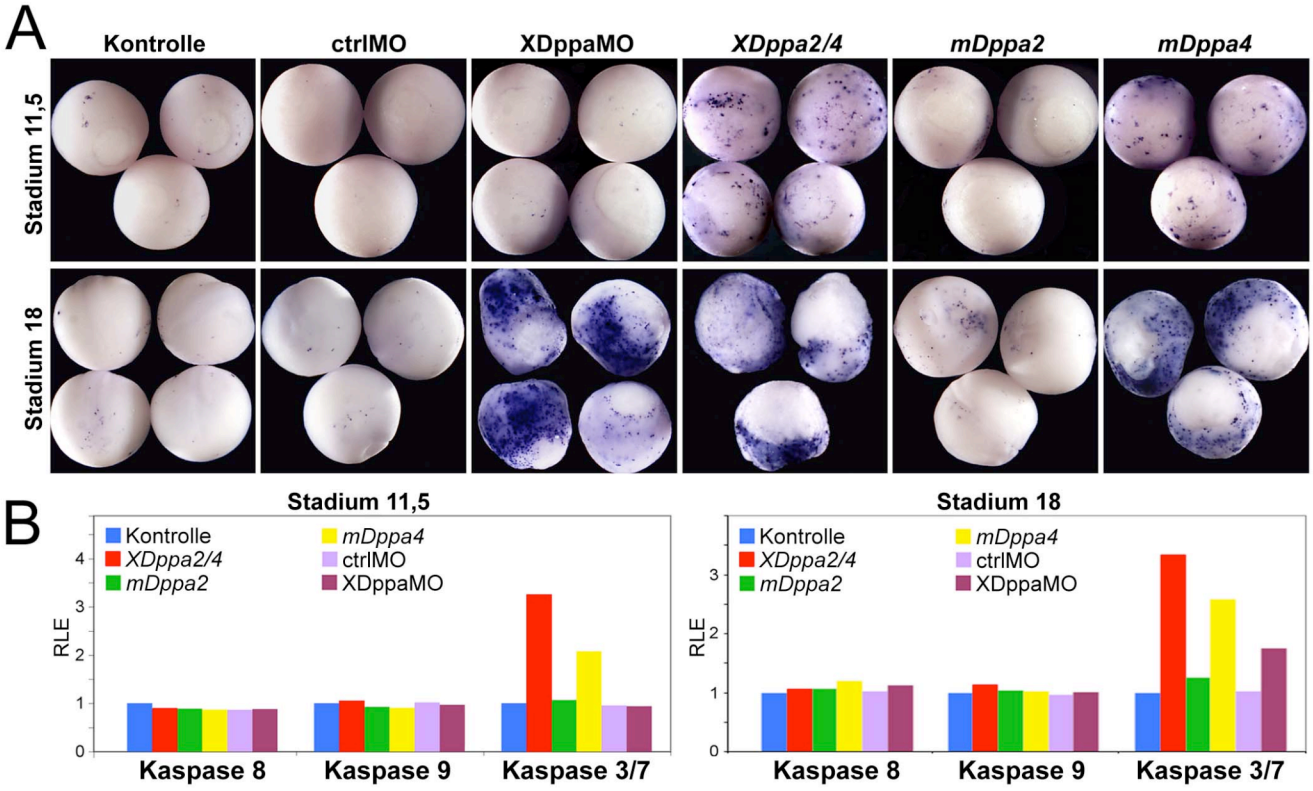


Abb. 30: TUNEL Analysen und Bestimmung der Kaspaseaktivitäten. (A) Nichtinjizierte und mit 50 ng ctrlMO, 50 ng XDppaMO, 400 pg *XDppa2/4*, 800 pg *mDppa2* oder 100 pg *mDppa4* RNA im 2-Zell-Stadium injizierte Embryonen wurde im Stadium 11,5 bzw. 18 abgesammelt und mittels TUNEL analysiert. (B) Die Aktivitäten der Initiatorkaspasen 8 und 9 und der Effektorkaspasen 3/7 wurden ermittelt. Gemessen wird die Chemoluminiszenz der durch die Kaspasen aktivierten Substrate. Die Werte in den Diagrammen sind auf die nichtinjizierten Embryonen normalisiert und in relativen Lichteinheiten angegeben.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des TUNELs führte die Messung der Kaspase 3/7-Aktivität in *mDppa2* RNA injizierten Embryonen im Stadium 18 nur zu einer sehr schwachen Steigerung. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sowohl die Überexpression als auch der funktionelle Knockdown von XDppa2/4 zu einer Erhöhung der Apoptoserate führt, die offensichtlich über eine Aktivierung der Effektorkaspasen 3/7 induziert wird.

4. Diskussion

4.1. Oct25 und Oct60 inhibieren die Bildung des Mesendoderms und unterstützen die Bildung des Neuroektoderms

Die ventrale Überexpression von Oct25, Oct60 oder Oct91 führt in Embryonen zu einem Verlust der Blastoporusbildung und zu einer fehlerhaft ablaufenden Gastrulation. Schon anhand des Phänotyps lässt sich vermuten, dass die mesodermalen und endodermalen Keimblätter nicht korrekt gebildet werden. Diese Vermutung wurde durch die unterdrückte Expression von *Xbra* und *XSox17α* gestützt. Ebenfalls konnte eine Reprimierung der dorsalen sowie ventralen mesodermalen und endodermalen Markergene mittels real time RT-PCR Untersuchungen nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte sich für alle Gene, die die Induktion und die Musterbildung des Mesendoderms spezifizieren, eine reduzierte Expression. Folglich verursacht die Überexpression der POU-V Faktoren innerhalb der vegetalen Hälfte des Embryos eine Unterdrückung der mesendodermalen Keimblattbildung.

Der Funktionsverlust von Oct25 und Oct60 in der äquatorialen Region zeigte im Gegensatz zu den Ergebnissen der ektopischen Expression eine gesteigerte Transkription mesendodermaler Markergene, wie *Xbra*, *Xwnt8*, *Goosecoid*, *XSox17α*, *Mixer*, *Cerberus* und *Xhex*. Der Embryo reagiert demzufolge auf eine innerhalb der äquatorialen Region verringerte Transkriptmenge der *POU-V* Gene mit einer verstärkten Bildung des Mesoderms und ektopischer Bildung des Endoderms. Somit scheint eine exakte Dosierung der Transkripte, wie sie für das mammale *Oct3/4* beschrieben wurde, auch für die POU-V Faktoren in *Xenopus* zur Bildung der Keimblätter notwendig zu sein. Sowohl bei zu geringen als auch bei zu hohen Oct3/4-Mengen kommt es zu einer gestörten Entwicklung des Mesendoderms. Die Ergebnisse werden durch den bereits für murine und humane ES-Zellen beschriebenen Knockdown von Oct3/4 bestätigt, der ebenfalls zu einer verstärkten Transkription endodermaler Marker führte (Hay et al., 2004; Chew et al., 2005). Trotz eines vergleichbaren Phänotyps zwischen Zebrafischen mit einer Mutation im Gen für *spiel ohne grenzen* (spg; *pou2/Oct4*) und dem Oct25- und Oct60-Knockdown in *Xenopus* weisen die Mutanten des Zebrafisches lediglich eine verstärkte Entwicklung des Mesoderms auf Kosten des Endoderms auf (Lunde et al., 2004; Reim et al., 2004). Wahrscheinlich beruht die Divergenz zwischen beiden Spezies auf unterschiedlichen Induktionsereignissen und Signalen während der frühen Embryonalentwicklung.

Bei einer Überexpression von Oct25 in animalen Kappen ließ sich im Stadium 10 eine gesteigerte Expression neuroektodermaler Gene, wie *XSox2*, *XSox3*, *Geminin H* und *Zic1* beobachten. Nach einem Funktionsverlust von Oct25 in animalen Kappen kam es zu einer deutlichen Reduktion der *XSox2* Transkription, aber lediglich zu einer geringen Veränderung anderer neuroektodermaler Marker. Daraus lässt sich folgern, dass Oct25 zumindest für die Expression von *XSox2* essentiell ist. Diese Behauptung wird durch die bereits beobachtete gegenseitige positive Stimulation von *Oct3/4* und *Sox2* in ES-Zellen von Säugern untermauert, bei denen *Sox2* als weiterer Pluripotenzfaktor beschrieben wurde (Chew et al., 2005). Des Weiteren wird Sox2 für die neurale Differenzierung gebraucht, wirkt sich aber aufgrund einer Inhibition der proneuralen Gene negativ auf die neuronale Differenzierung aus (Kishi et al., 2000; Bylund et al., 2003; Graham et al., 2003). Das gilt offensichtlich auch für die neuronale Entwicklung in *Xenopus*, da bei überexprimiertem Oct25 in ganzen Embryonen eine fehlende *N-tubulin* Expression und in animalen Kappen nach einem Knockdown für Oct25 fast keine neuronale Differenzierung nachzuweisen war (unveröffentlichte Daten). Somit liegt der Schuss nahe, dass Oct25 durch die Regulation des *XSox2* Gens für die Aufrechterhaltung der neuralen Vorläuferzellen verantwortlich ist.

4.2. Die Nodal/Aktivin und bFGF Signalwege werden durch Oct25 und Oct60 inhibiert

Oct25 und Oct60 Überexpression führen zu einer Unterdrückung der induzierenden Aktivität sowohl des Nodal/Aktivin als auch des bFGF Signalweges. Diese Beobachtung ist unabhängig von der Bereitstellung der Liganden, weil der dorsalisierende Effekt von injizierten *Xnrs* durch eine zusätzliche Oct25 Überexpression aufgehoben wurde. Da die Wirkungen von Aktivin und bFGF in der animalen Region des Embryos Dosis-abhängig sind (Cornell und Kimelman, 1994; LaBonne und Whitman, 1997), könnte Oct25 oder Oct60 die Identität des ektodermalen Keimblattes aufrecht halten, indem es die Aktivität dieser Signalkaskaden in der animalen Kappe blockiert oder einschränkt. Jedoch war der gegenläufige Versuch, die durch Oct25 und Oct60 Überexpression erzeugten Phänotypen durch eine *Xnrs* Injektion in die vier vegetalen Blastomeren eines Achtzellers zu revertieren, nicht erfolgreich (unpublizierte Daten). Das könnte bedeuten, dass die POU-V Faktoren nicht nur die Unterdrückung der durch bFGF und Aktivin/Nodal aktivierten Signalkaskaden bewirken, sondern eventuell auch einen Einfluss auf die primären induzierenden Signalwege ausüben. Letztlich könnte die durch die POU-V Faktoren verursachte Inhibition der Mesendodermbildung nicht nur auf die unterdrückten bFGF und Nodal Signalwege sondern

auch auf andere Signalwege zurückzuführen sein, die in die Induktion und die Musterbildung des Mesendoderms involviert sind. Diese Vermutung konnte tatsächlich durch weitere Analysen bestätigt werden, die die primäre Induktion der Keimblätter durch VegT und den Wnt Signalweg betreffen.

Die Ergebnissen der Untersuchungen zu den bFGF und Nodal/Aktivin Signalwegen lassen für die Spezifizierung der drei Keimblätter in *Xenopus* den Schluss zu, dass Oct25 und Oct60 im Ektoderm über eine gesteigerte Transkription der neuroektodermalen Gene die Bildung des Neuroektoderms fördern und durch eine Unterdrückung der Nodal/Aktivin und bFGF Signalwege eine ektopische Mesendodermentstehung verhindern. Hierbei dürfte eine exakte Abstimmung dieser antagonistischen Aktivitäten, d.h., die zeitlich und räumlich koordinierte Expression der Induktionsfaktoren und der POU-V Faktoren, für die korrekte Bildung der Keimblätter essentiell sein.

POU-V Faktoren in *Xenopus* können sowohl aktivierende als auch reprimierende Funktionen im Bezug auf die Kontrolle der Genexpression übernehmen, weil sie neuroektodermale Gene stimulieren und mesendodermale Gene inhibieren. Dieser Befund stimmt mit den Resultaten einer Studie in humanen ES-Zellen überein, bei der der Einfluss von Oct3/4 auf das Netzwerk der Transkription untersucht wurde (Babaie et al., 2007). Die durch Oct3/4 beeinflussten Gene, zu denen offensichtlich Regulatoren diverser Signalwege gehören, werden entweder wie *Sox2* positiv oder wie *brachyury* negativ reguliert. Wahrscheinlich ist die zeitliche und räumliche Verteilung der POU-V Proteine und ihrer Kofaktoren während der Embryonalentwicklung ausschlaggebend, ob sie eine aktivierende oder reprimierende Rolle einnehmen. Diese zweiseitige Aktivität wurde auch schon für *Oct3/4* in ES-Zellen beschrieben (Pesce und Schöler, 2000).

4.3. Funktionelle Konservierung der POU-V Faktoren

Die Existenz dreier POU-V Faktoren in *Xenopus laevis*, Oct25, Oct60 und Oct91, wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben (Hinkley et al., 1992; Whitfield et al., 1993; Whitfield et al., 1995). Die jeweiligen Gene sind wahrscheinlich durch Genduplikation aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden, da sie im Genom von *Xenopus tropicalis* (Ensembl v37, *X. tropicalis*, JGI 4; scaffold_886) als Cluster vorliegen. Unterschiede bei der räumlichen und zeitlichen Expression dieser Gene könnten ein Anzeichen evolutionärer Veränderungen im Promotor dieser Gene widerspiegeln. Betrachtet man allerdings die zusammengefasste Expression der drei Vertreter der *POU-V* Klasse in *Xenopus,* so korreliert sie mit dem

zeitlichen Expressionsmuster von *Oct3/4* in Säugern (Ovitt und Schöler, 1998). Interessanterweise ist die zeitliche Reihenfolge, in der die drei POU-V Faktoren exprimiert werden, ihrer Orientierung im Cluster entgegengesetzt. Bei funktionellen Untersuchungen hat sich gezeigt, dass die drei POU-V Faktoren der *Xenopus*-Embryonen auch überlappende Funktionen aufweisen. Die Überexpression von *Oct25*, *Oct60* oder *Oct91* RNA resultierte in einem identischen Phänotyp, wie er auch bei einer Überexpression von *mOct3/4* zu beobachten war. Des Weiteren unterdrückten sowohl Oct25 und Oct60 als auch mOct3/4 die gleiche Auswahl an mesendodermalen Genen. Darüber hinaus konnten sowohl Oct25 als auch Oct60 die Aktivitäten des Nodals/Aktivin Signalwegs und der primär induzierenden Signale VegT und β-Catenin blockieren. Letztlich ist aber die Aufhebung des Phänotyps, der durch Oct25- oder Oct60-Funktionsverlust verursacht wurde, mittels Expression von mOct3/4 ein deutlicher Beleg dafür, dass Oct3/4 aus Säugern und *Xenopus* Oct25 sowie Oct60 funktionelle Homologe darstellen. *Oct91* generiert auch einen mit *Oct25* und *Oct60* vergleichbaren Phänotyp. Allerdings bleibt bislang ungeklärt, ob Oct91 auch alle Funktionen von Oct25 und Oct60 übernehmen kann.

4. 4. POU-V Faktoren antagonisieren die primären Induktionsereignisse

Die Induktion des Mesoderms und des Endoderms werden in *Xenopus* über Signalwege vermittelt, die durch das maternale VegT gesteuert werden. Beide Keimblätter werden durch einen zusätzlichen maternal exprimierten Faktor, dem β-Catenin, dorsalisiert. Bei einer vegetalen Überexpression von Oct25 oder Oct60 konnte eine Inhibition der VegT und/oder β-Catenin Zielgene, *Xnr1-6* und *Siamois*, beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war bei einem Funktionsverlust der POU-V Faktoren eine deutlich gesteigerte Transkription dieser Zielgene zu beobachten. Somit kann gefolgert werden, dass die POU-V Faktoren bereits für die Transkription der *Xnr* sowie *Siamois* Gene und die Bereitstellung der jeweiligen Proteine verantwortlich sind. Folglich limitieren die POU-V Faktoren bereits die Expression der die Nodal/Aktivin und bFGF Signalwege initiierenden Liganden und wirken nicht ausschließlich auf die Signaltransduktion dieser später für die Mesendodermbildung benötigten Signalwege (Henig et al., 1998; Cao et al., 2006; Snir et al., 2006). Untersuchungen an animalen Kappen haben eine transkriptionelle Unterdrückung von Genen gezeigt, die durch VegT oder β-Catenin aktiviert werden. Für ganze Embryonen konnte sogar der nach Injektion von *Oct25* und *Oct60* RNA erhaltene Phänotyp, der sich in einer fehlerhaften Gastrulation und Körperachse äußert, mit Hilfe von VegT aufgehoben werden. Zusätzlich kann die Entstehung einer sekundären Körperachse, die mittels ektopischer Expression von β-Catenin

hervorgerufenen wird, durch Oct25 und Oct60 unterdrückt werden. Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass die Vertreter der POU-V Klasse in *Xenopus* die Funktionen von maternalem VegT und β-Catenin antagonisieren. Wird diese regulatorische Beziehung mit der positionellen Information dieser Signale in Verbindung gebracht, kann ein Modell für die Induktion und Musterbildung der drei Keimblätter während der Blastulation erstellt werden (Abb. 31). Das maternale VegT ist hauptsächlich in der vegetalen Region des Embryos lokalisiert und nimmt vom vegetalen zum animalen Pol hin ab. Während große Mengen von VegT Endoderm induzieren, tendieren Regionen mit geringerem VegT-Spiegel zur Induktion von Mesoderm (Kavka und Green, 2000). Die nach der Befruchtung stattfindende dorsale Akkumulation von nukleärem β-Catenin führt zu einer Überlappung von VegT und β-Catenin in den dorsalen vegetalen Regionen des Embryos. In dieser Zone verstärken sie die Transkription der dorsalisierenden Faktoren der mesendodermalen Keimblätter. Die POU-V Faktoren, die in der animalen Hälfte des Embryos lokalisiert sind und deren Konzentration in Richtung des vegetalen Poles abnimmt, können die induzierende VegT- und β-Catenin-Aktivität austitrieren und dadurch die fehlerfreie Induktion und Musterbildung des mesendodermalen Keimblattes sicherstellen. In der animalen Region unterstützen die POU-V Faktoren die Bildung des Neuroektoderms, verhindern aber die neuronale Differenzierung. (Cao et al., 2006; Snir et al., 2006).

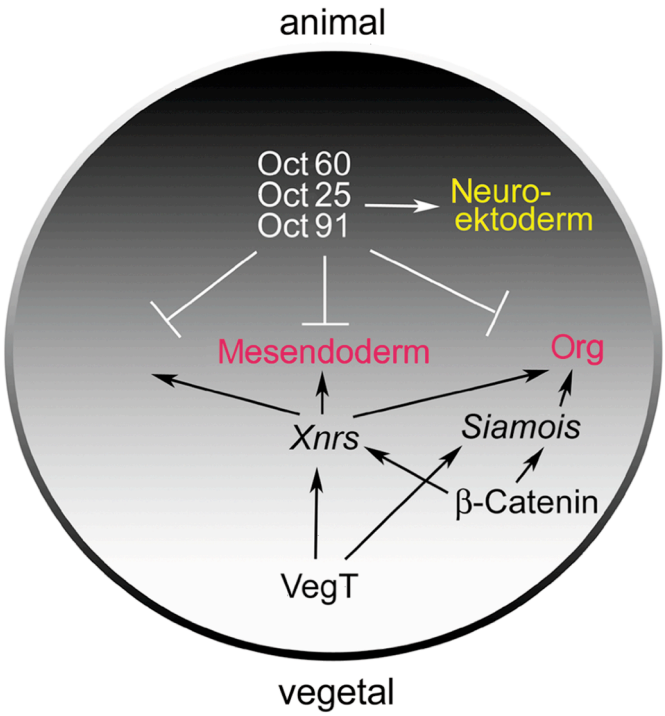


Abb. 31: Modell zur mesendodermalen Spezifizierung und Musterbildung. Die POU-V Faktoren antagonisiern die Aktivität von VegT und β-Catenin bei der Induktion der mesendodermalen Keimblätter. In der animalen Region des Embryos fördert Oct25 die Bildung des Neuroektoderms.

4.5. Oct25, ein Korepressor der Transkription von VegT und β-Catenin Zielgenen

Um herauszufinden, auf welcher Ebene Oct25 die durch VegT und/oder β-Catenin induzierte Genaktivierung unterdrückt, hat sich gezeigt, dass Oct25 direkt mit VegT und Tcf3 interagieren kann. Überraschenderweise konnte zusätzlich eine direkte Interaktion zwischen VegT und Tcf3 nachgewiesen werden. Diese Beobachtung knüpft eine unmittelbare Verbindung zwischen dem VegT und dem β-Catenin Signalweg. Des Weiteren konnte für Oct25, VegT und Tcf3 auch die Bildung eines ternären Komplexes sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachten werden. Dieser Befund deutet auf einen Mechanismus, bei dem Oct25 als Korepressor die Transkription der durch VegT und β-Catenin aktivierten Gene reguliert. Als Fallbeispiele wurde der regulatorische Einfluss von Oct25 auf die durch maternales VegT und β-Catenin aktivierten Promotoren von *Xnr1* und *Siamois* untersucht. Die in EMSA-Untersuchungen erhaltenen Supershifts zeigten, dass sowohl Oct25 und VegT gemeinsam einen Komplex auf der T-Box-Bindungsstelle des *Xnr1* Promotors, als auch Oct25 und Tcf3 Komplexe auf den TCF/LEF-Bindungsstellen der Promotoren von *Xnr1* und *Siamois* bilden können. Unter Verwendung von Luziferasereportern konnte die durch VegT oder durch Komponenten des β-Catenin Signalwegs hervorgerufene Aktivierung des *Xnr1* bzw. des *Siamois* Promotors in animalen Kappen mit Oct25 reprimiert werden. Darüber hinaus konnte auch bei Mutanten des *Xnr1* und des *Siamois* Promotors, denen die Oct-Bindungsstellen fehlen, die Stimulation durch koinjizierte *Oct25* RNA unterdrückt werden. Folglich scheint eine direkte Interaktion von Oct25 mit den Promotoren von *Xnr1* und *Siamois* nicht notwendig zu sein, um die durch VegT oder β-Catenin aktivierte Transkription der Gene zu reprimieren. Stattdessen ist es wahrscheinlich, dass die Repression durch einen Komplex von Oct25 und VegT auf der T-Box-Bindungsstelle oder von Oct25 und Tcf3 auf der TCF/LEF-Bindungsstelle verursacht wird. Folglich agiert Oct25 in der Abwesenheit seiner Bindungsstelle als Korepressor von VegT oder Tcf3, um die Transkription der Zielgene zu unterdrücken.

Da Oct25 die Aktivitäten beider Promotoren selbst in Abwesenheit von Oktamermotiven als direkten Bindungsstellen unterdrücken kann, stellt sich die Frage nach der Notwendigkeit dieser Oct-Bindungsstellen. Promotor-/Reportermutanten von *Xnr1* und *Siamois*, die lediglich die Bindungsstellen für POU-V Faktoren enthalten, zeigten nach Überexpression von VegT oder β-Catenin keine Veränderung ihrer Luziferaseaktivität. Unerwarteterweise konnte nach Überexpression von Oct25 eine Stimulation festgestellt werden. Die Bestätigung dieses

Resultates erfolgte mittels eines artifiziellen Promotorreporters, der acht Wiederholungen des Oktamermotivs enthält (Niwa et al., 2002; Morrison und Brickman, 2006). EMSA-Untersuchungen belegten, dass sowohl VegT als auch Tcf3 eine Interaktion mit Oct25 auf der Oktamersequenz eingehen können. Nach Koinjektion mit *VegT* RNA wurde die Stimulation des mutierten Promotors durch Oct25 inhibiert. Hingegen wurde nach Überexpression von Tcf3 keine Veränderung der durch Oct25 verursachten Stimulation des artifiziellen Promotors beobachtet (Daten werden hier nicht gezeigt). Die Bildung eines Proteinkomplexes auf dem Oktamermotiv bietet eine weitere Möglichkeit der Repression, indem Oct25 die Bindung von VegT oder Tcf3 an ihre jeweiligen spezifischen Bindungsstellen abfängt und so die durch VegT bzw. β-Catenin induzierte Transkription zusätzlich inhibieren kann.

Es stellt sich die Frage, ob die Unterdrückung der durch VegT und β-Catenin aktivierten Gene eine Besonderheit der POU-V Faktoren ist oder ob POU-Faktoren generell diese Unterdrückung verursachen können. Die animale als auch die vegetale Überexpression von Oct1, einem POU-Faktor der Unterklasse II aus *Xenopus* (Veenstra et al., 1998), resultierte aber in keinem vergleichbaren Phänotyp (Daten hier nicht gezeigt). Darüber hinaus wurde die Aktivität der Promotoren von *Xnr1* und *Siamois* auch durch überexprimiertes Oct1 nicht reprimiert (Daten hier nicht gezeigt). Diese Ergebnisse belegen, dass der inhibitorische Einfluss auf die Zielgene von VegT und β-Catenin ein spezifisches Merkmal für Faktoren der POU-V Klasse darstellt.

Nukleotidsequenzvergleiche der Promotoren von *Xnr1*, *2*, *3*, *5*, *6* und *Siamois* ergaben die Existenz eines Oktamermotivs für jedes dieser Gene. Außer bei dem Promotor von *Xnr6* konnten bei allen anderen Genen zusätzlich Bindungsstellen von TCF/LEF identifiziert werden. T-Box-Bindungsstellen wurden bis auf die Promotoren von *Xnr3* und *Siamois* ebenfalls bei allen Genen gefunden. Die konservierte Lokalisation dieser Elemente lässt einen ähnlichen regulativen Mechanismus vermuten. Diese Gene werden entweder durch β-Catenin alleine oder durch eine Kombination von VegT und β-Catenin aktiviert. Wie in Embryonen oder an animalen Kappen gezeigt wurde, kann diese Aktivierung durch eine Überexpression von Oct25 unterdrückt werden.

4.6. Die Interaktion von VegT mit Tcf3 bietet eine Erklärung für den Synergismus von VegT und β-Catenin bei der Transkription von *Siamois*

Obwohl kein kanonisches T-Box-Motiv innerhalb des untersuchten Teils des *Siamois* Promotors gefunden wurde, konnte eine Aktivierung dieses Promotors durch VegT detektiert werden. Ein synergistischer Effekt zwischen VegT und Xwnt8 bei der Aktivierung von

Siamois wurde bereits in animalen Kappen beschrieben (Rex et al., 2002). Des Weiteren verursacht der Funktionsverlust von VegT eine reduzierte Expression von *Siamois* und *Xnr3* in Embryonen. Dieser Effekt wird durch einen gemeinsamen Funktionsverlust von VegT und β-Catenin noch verstärkt (Xanthos et al., 2002). Auf der einen Seite kann nicht ausgeschlossen werden, dass VegT die Expression eines anderen Faktors fördert, der gemeinsam mit β-Catenin/Tcf3 für die Aktivierung des *Siamois* Promotors verantwortlich ist. Die hier erhaltenen Daten weisen aber andererseits darauf hin, dass der Synergismus durch die Bildung eines ternären Komplexes zwischen β-Catenin, Tcf3 und VegT bewirkt wird.

4.7. Ein Mechanismus für die Erhaltung der Pluripotenz

Die POU-V Faktoren aus *Xenopus* verhalten sich wie funktionelle Homologe des Oct3/4 der Säugetiere (Cao et al., 2006; Morrison und Brickman, 2006), das bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz in embryonalen Stammzellen eine Schlüsselrolle einnimmt. Welche Rolle diese Faktoren in Embryonen für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz während der frühen Teilungsstadien einnehmen, ist immer noch weitgehend ungeklärt. Anhand der hier erhaltenen Ergebnisse zeigt sich, dass die POU-V Faktoren von *Xenopus* die Bildung des mesendodermalen Keimblattes unterdrücken, indem sie der Funktion von maternal exprimierten embryonalen Induktoren, wie VegT, entgegen wirken. Weiterhin wird der in Vertebraten hochkonservierte β-Catenin Signalweg, der eine Funktion bei der Spezifizierung der Achsen spielt, durch die Interaktion von Oct25 mit Tcf3 reprimiert. Die Familie der TCF/LEFs besteht aus einer Vielzahl von Mitgliedern mit konservierten funktionellen Domänen. Folglich ist ebenfalls eine Interaktion von Oct25 mit anderen Familienmitgliedern denkbar, zumal in bestimmten Entwicklungsstadien oder auch in unterschiedlichen Geweben jeweils bestimmte TCF/LEF-Faktoren die Signale des β-Catenin Signalweges weiterleiten. Somit könnte Oct25 neben seiner maternalen Rolle auch generell mit dem β-Catenin Signalweg interferieren.

Bisher wurde in Säugern kein direktes Homolog des maternalen VegTs von *Xenopus* identifiziert. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass dessen Funktion durch ein anderes maternal exprimiertes T-Box-Protein übernommen werden könnte. Interessanterweise interagiert auch das murine Oct3/4 sowohl mit dem Tcf3 als auch dem VegT von *Xenopus*. Demzufolge scheinen die POU-V Faktoren der Säuger die Bildung des Mesendoderms nach dem gleichen Prinzip zu inhibieren. Wie bereits beschrieben, blockieren die POU-V Faktoren während der frühen Embryonalentwicklung ebenfalls die Signalwege von Nodal/Aktivin und bFGF, deren Funktion für die Bildung des Mesendoderms in Vertebraten konserviert ist

(Henig et al., 1998; Cao et al., 2006; Morrison und Brickman, 2006). Sowohl in *Xenopus* als auch in Säugetieren wurde des Weiteren die Aktivierung der *Sox2* Expression durch die POU-V Faktoren beschrieben (Chew et al., 2005; Cao et al., 2006; Babaie et al., 2007). Bei Sox2 handelt es sich um einen weiteren für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz essentiellen Faktor, besonders für die Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zellstatus der ektodermalen Vorläuferzellen (Boiani und Schöler, 2005).

Zusammengenommen lassen diese Beobachtungen ein generelles Prinzip vermuten, bei dem die Pluripotenz aufrechterhalten wird, indem die für die Einleitung der Differenzierung essentiellen Signale blockiert werden. Zusätzlich werden die Signale gefördert, welche die Zellen in einem undifferenzierten Zustand halten und die terminale Differenzierung inhibieren. Der dahinter liegende molekulare Mechanismus ist von der zeitlichen und räumlichen Expression der POU-V Proteine und ihrer zugehörigen Kofaktoren abhängig. Durch eine gradientenmäßige entgegengesetzte Verteilung von Induktionsfaktoren und POU-V Faktoren wird koordiniert, welche Gene aktiviert oder reprimiert werden.

4.8. Die POU-V Faktoren inhibieren die Transkription von *Gsc* und *Mix2,* die Zielgene des Nodal/Aktivin Signalweges darstellen

Der Ablauf der frühen Embryonalentwicklung wird von der korrekten Balance zwischen dem Erhalt des undifferenzierten Zustandes und der Einleitung der Differenzierung einzelner Zellen/Zellgruppen unter Einbeziehung zweier Signale geprägt. Das eine Signal ist für die Induktion frühembryonaler Zellen zur Differenzierung in die Keimblätter und schließlich in die verschiedenen Gewebstypen verantwortlich. Hingegen ist das zweite Signal für die Unterdrückung der vorzeitigen Differenzierung der embryonalen Zellen essentiell. Einer der für die Induktion der Mesoderm- und Endodermentwicklung in Vertebraten wichtigsten Signalwege ist der Nodal/Aktivin Signalweg. Dabei wird die zygotische Aktivierung der *Nodals* durch die maternalen Faktoren VegT und β-Catenin bewirkt. Auf der anderen Seite steht der für die Erhaltung des undifferenzierten Zustands embryonaler Zellen notwendige Faktor Oct3/4 bzw. dessen Homologe in anderen Spezies (Zhou et al., 2007; Kim et al., 2008). Wie bereits gezeigt wurde, können die Homologen von Oct3/4 in *Xenopus*, Oct25, Oct60 und Oct91, die Aktivität des maternalen VegTs und β-Catenins unterdrücken und somit die Bildung des Mesendoderms verhindern (Cao et al., 2007). Zusätzlich wurde auch die Unterdrückung der Mesendoderm-induzierenden Aktivität des Nodal/Aktivin Signalwegs durch Oct25 belegt (Cao et al., 2006; Morrison und Brickman, 2006) und durch die Inhibition der Transkription der Zielgene *Gsc* und *Mix2* bestätigt. Die Durchführung von

Überexpressions- und Kockdownanalysen sowohl in kompletten Embryonen als auch in animalen Kappen zeigte, dass Oct25 die Transkription beider Zielgene des Nodal/Aktivin Signalwegs reprimiert und somit im Zellkern die Auswirkung dieses Signalwegs auf die Transkription zu regulieren vermag. Mittels biochemischer Analysen wurden Interaktionen zwischen Oct25 und den wichtigsten nukleär lokalisierten Komponenten des Nodal/Aktivin Signalweges identifiziert. Diese mit Smad2, FAST1 und WBSCR11 gebildeten Komplexe werden über die FAST1- bzw. die WBSCR11-Bindungsstelle an die Promotoren von *Gsc* und *Mix2* dirigiert. Wie durch Untersuchungen von Luziferasereportern mit unterschiedlich mutierten Promotorkonstrukten gezeigt wurde, resultierte die Interaktion der Proteinkomplexe mit den Promotoren in einer Inhibierung der Transkription beider Gene. Dieser Effekt kann nicht auf eine Oct25 vermittelte Reduktion der Transkripte von *Smad2*, *FAST1* und *WBSCR11* zurückgeführt werden (Daten werden hier nicht gezeigt). Demzufolge ist die Inhibition auf den Zusammenschluss von Oct25 mit Smad2, FAST1 und WBSCR11 zurückzuführen, der die stimulierenden Aktivitäten des Nodal/Aktivin Signalwegs in eine Repression umzuwandeln vermag. Aufgrund der Tatsache, dass analoge Resultate auch für die Regulation der untersuchten Zielgene von VegT und β-Catenin erzielt wurden (Cao et al., 2007), scheint dieser regulatorische Mechanismus von Oct25 nicht auf den Nodal/Aktivin Signalweg beschränkt zu sein. Stattdessen liegt ein generelles Prinzip zugrunde, wonach diese Art der Repression ebenfalls bei anderen Signalwegen zum Einsatz kommt, die für die Differenzierung der embryonalen Zellen verantwortlich sind.

Von Oct3/4 ist bereits bekannt, dass es in embryonalen Stammzellen positiv auf die Transkription seiner Zielgene *FGF4*, *Nanog*, *Sox2* und auf das *Oct4* Gen selbst wirkt (Pesce und Schöler, 2000). Die Vermittlung dieser transkriptionellen Aktivierung erfolgt über eine Interaktion von Oct3/4 mit dem in den Promotoren seiner Zielgene gelegenen Oktamermotiv ATGCAAAT. Auch die innerhalb des *Gsc* Promotors identifizierte, dem Oktamermotiv ähnliche Sequenz ATGCAAAA konnte eine Bindung mit Oct25 eingehen. Allerdings erhöhte Oct25 nicht die Aktivität des *Gsc* Promotors, sondern wirkte sich stark inhibierend aus. Selbst nach Deletion des im Promotor gelegenen Oktamermotivs zeigte sich ein inhibierender Effekt. Aus diesem Grund ist der Einfluss von Oct25, seiner konstitutiv aktiven Form VP16-Oct25 sowie seiner repressiven Variante EVE-Oct25 auf die Aktivität eines künstlichen Promotors untersucht worden, der lediglich aus acht Wiederholungen des Oktamermotivs besteht. In Übereinstimmung mit dem Resultat, dass es sich bei Oct3/4 um einen transkriptionellen Aktivator handelt, konnte sowohl Oct25 als auch VP16-Oct25 die Aktivität des Promotors stimulieren. Die konstitutiv aktive Variante von Oct25 scheint allerdings einen

stärkeren stimulierenden Einfluss auszuüben. Konträr dazu, verursachte EVE-Oct25 eine Inhibition des Promotors. Anhand dieser Beobachtungen zeigt sich, dass Oct25 alleine über die direkte Bindung an das Oktamermotiv tatsächlich die Gentranskription erhöhen kann. Analog dem wildtypischen Oct25 resultierten beide Oct25-Fusionsproteine dennoch in einer Unterdrückung der Promotoraktivitäten von *Gsc* und *Mix2* sowie in ausbleibender Bildung des Mesendoderms. Folglich ist die Anwesenheit eines Oktamermotivs nicht zwingend mit einer Aktivierung durch Oct25 verbunden. Stattdessen wird der regulatorische Einfluss von Oct25 auf die Genexpression durch seine Interaktionspartner bestimmt. Diese Theorie wird durch die Befunde bestätigt, dass eine Interaktion zwischen Oct25 und FAST1 auf dem Oktamermotiv eine Unterdrückung der durch VP16-Oct25 hervorgerufenen Stimulation des Oktamer-Promotors nach sich zog. Es ist zu erwähnen, dass die Konsensussequenz des Oktamermotivs auch von anderen Transkriptionsfaktoren der POU-Familie für eine Bindung an die DNA herangezogen wird (Ryan und Rosenfeld, 1997). Allerdings sind bis auf die POU-V Faktoren, wie z.B. Oct3/4, die anderen POU-Faktoren, wie z.B. Oct1, nicht an der Aufrechterhaltung der Pluripotenz und der Selbsterneuerung der embryonalen Stammzellen beteiligt. Folglich scheinen die verschiedenen Unterklassen der POU-Faktoren auch verschiedene Arten von Zielgenen zu regulieren. Dies kann aber nicht ausschließlich auf die Interaktion mit einem existierenden Oktamermotiv innerhalb des Zielgenpromotors erklärt werden. Offensichtlich werden die Funktionen der POU-Faktoren nicht allein von ihrer Fähigkeit zur DNA-Bindung, sondern insbesondere durch die Interaktion mit anderen Proteinfaktoren festgelegt. Diese Protein/Protein Interaktionen führen zu einer Selektion der Zielgene und bestimmen die Art des regulatorischen Effektes.

4.9. Die Reprimierung von *Gsc* und *Mix2* durch Oct25 ist unabhängig von der Aktivität der Histondeacetylasen der Klasse I und II

Viele Transkriptionsfaktoren regulieren ihre Zielgene über Interaktionen mit Faktoren, die für die Modifikation des Chromatins verantwortlich sind. Ein Beispiel hierfür ist die bereits in embryonalen Stammzellen beschriebene Interaktion zwischen Oct3/4 und HDAC2 (Wang et al., 2006). Diese Komplexbildung legt nahe, dass Oct3/4 die Genexpression reprimiert, indem die Acetylierungen der chromatinassoziierten Histone verringert wird. Allerdings blieb trotz TSA Inkubation, einem Hemmer der HDACs, die Repression der *Gsc* und *Mix2* Gene durch Oct25 erhalten. Daraus kann gefolgert werden, dass die durch Oct25 hervorgerufene Reprimierung von *Gsc* bzw. *Mix2* unabhängig von der Aktivität der HDACs in gastrulierenden *Xenopus* Embryonen ist. Allerdings wirkt sich das als Inhibitor der HDACs

eingesetzte TSA lediglich auf die HDACs der Klasse I und II negativ aus (Mariadason, 2008). Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass der reprimierende Effekt von Oct25 auf eine Interaktion mit den HDACs der Klasse III zurückzuführen ist. Neben der Acetylierung der Chromosomen exstieren auch noch weitere Möglichkeiten der Chromatinmodifikation, wie z.B. die Methylierung der Histone. Die meisten der in embryonalen Stammzellen stillgelegten Gene, die für entwicklungsrelevante Induktoren kodieren, sind Zielgene sowohl von Oct3/4 als auch der Gruppe der Polycombproteine (Bernstein et al., 2006; Boyer et al., 2006b; Lee et al., 2006). Die PcGs sind als epigenetische Regulatoren bekannt, die das Histon3 (H3) im Chromatin am Lysinrest 27 (K27) methylieren und daraufhin die Transkription der Zielgene unterdrücken (Ringrose und Paro, 2004). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Oct25 mit den Proteinen des PcGs interagiert, um die Transkription der Zielgene des Nodal/Aktivin Signalweges zu inhibieren. Ein solcher Sachverhalt könnte auch für die durch Oct25 hervorgerufene Repression des maternalen β-Catenin/Tcf3 Signalweges oder für das VegT Signal gelten (Cao et al., 2007). Sowohl Oct3/4 als auch seine Homologe in anderen Spezies können die Gentranskription entweder verstärken oder aber reprimieren. Die Art des regulatorischen Einflusses und die Spezifität der von Oct25 beeinflussten Zielgene könnten aber auch ein gemeinsames exakt koordiniertes Ergebnis der räumlich-zeitlichen Verteilung der POU-V Proteine, ihrer Interaktionspartner und der PcG Proteine sein. Ob dies tatsächlich zutrifft und ob sich dieses Prinzip nicht nur auf die embryonalen Stammzellen beschränkt sondern auch auf die Embryogenese angewendet werden kann, bleibt zukünftigen Untersuchungen überlassen.

4.10. Die Existenz der *Dppa2/4* Gene ist nicht auf höhere Vertebraten begrenzt

Die in der Klasse der Developmental Pluripotenz assoziiert (Dppa) zusammengefassten Gene weisen eine aktive Transkription in pluripotenten Zellen, wie den embryonalen Zellen vor Implantation, dem Epiblast und der Keimbahn, auf (Bortvin et al., 2003). Hingegen findet in somatischen Geweben keine Transkription mehr statt. Da diese Gene bisher nur in Eutheria beschrieben wurden, handelt es sich hier um die erste Charakterisierung eines *Dppa2/4*-ähnlichen Gens, dem *XDppa2/4*, in den niederen Vertebraten *Xenopus tropicalis* und *Xenopus laevis*.

Drei der fünf Mitglieder der Dppa-Familie, Dppa2, Dppa3 und Dppa4, enthalten eine SAP-Domäne (Aravind und Koonin, 2000). Durch Datenbankabfrage mit dieser Domäne war es möglich, ein *Dppa2* bzw. *Dppa4* homologes Gen in den Amphibien *Xenopus tropicalis* und *Xenopus laevis*, dem Kurzschwanz-Opossum und dem australischen Fuchskusu aus der

Gattung Marsupialier sowie dem Reptil *Anolis carolinensis* zu identifizieren. Die strukturelle Verwandtschaft wird darüber hinaus durch einen zusätzlichen, konservierten Bereich innerhalb des C-Terminus unterstützt (Maldonado-Saldivia et al., 2007). Aufgrund ihres Vorkommens wurde diese Region, deren funktionelle Bedeutung bis dato unbekannt ist, DCR (Dppa2/4 conserved region) genannt. Erwähnenswert ist, dass neben Dppa2 und Dppa4 keine weiteren Proteine identifiziert werden konnten, die eine Kombination beider Motive, der SAP und der DCR, aufweisen. Dieses Ergebnis führt zu der These, dass die Präsenz sowohl der SAP-Domäne als auch der DCR die Unterklasse der Dppa2/4 Proteine definieren.

Den ersten Hinweis für die funktionelle Homologie zwischen XDppa2/4, mDppa2 und mDppa4 lieferten die vergleichbaren Phänotypen, die nach deren Überexpression erhalten wurden. Bemerkenswerterweise zeigten sich bei einem Vergleich der Überexpressionen von mDppa2 und mDppa4 lediglich ein paar Differenzen bezüglich der Regulation zahlreicher Zielgene. Aufgrund der bereits veröffentlichten funktionellen Unterschiede zwischen mDppa2 und mDppa4 während der Differenzierung der ES-Zellen (Masaki et al., 2007), liegt die Vermutung nahe, dass mDppa2 und mDppa4 sich zwar während der Evolution aus einem Vorläufergen gebildet haben aber zumindest teilweise unterschiedliche Funktionen wahrnehmen (Maldonado-Saldivia et al., 2007). Darüber hinaus führt eine Überexpression von mDppa4 in Zellkulturen zu einem erhöhten Zelltod, während dies nach Überexpression von mDppa2 nicht der Fall zu sein scheint (Masaki et al. 2007). Tatsächlich konnte hier nach ektopischer Expression von XDppa2/4 sowie von mDppa4, aber nicht von mDppa2, eine Induktion der Apoptose während der frühen Entwicklung von *Xenopus laevis* festgestellt werden. Die eingeleitete Apoptose scheint unabhängig von den beiden Initiatorkaspasen 8 und 9 zu sein, aber durch die Effektorkaspasen 3/7 vermittelt zu werden.

Ein starkes Indiz für die funktionelle Homologie zwischen XDppa2/4 und Dppa2 in Säugetieren war der Befund, dass der bei Funktionsverlust des XDppa2/4 während der Gastrulation auftretende Phänotyp durch die Injektion von *mDppa2* RNA aufgehoben werden kann. Die XDppaMO und *mDppa2* RNA koinjizierten Embryonen zeigen eine wildtypische Entwicklung bis zum Ende der Neurulation, sterben aber im anschließenden Verlauf der Entwicklung. Diese späte Letalität konnte weder durch eine Koinjektion mit *mDppa4* RNA noch durch verschiedenste Kombinationen von *mDppa2* und *mDppa4* RNA verhindert werden. Folglich kann XDppa2/4 nur während der Gastrulation und der Neurulation funktionell durch mDppa2 ersetzt werden. Anscheinend hat XDppa2/4 aber zusätzliche Funktionen, die weder von mDppa2 noch mDppa4 übernommen werden können.

4.11. XDppa2/4 ist für die Embryogenese essentiell

Ihren Namen erhielten die *Dppa* Gene aufgrund ihrer auf die pluripotenten Zellen begrenzten Expression (Bortvin et al., 2003; Maldonado-Saldivia et al., 2007). Mittels RT-PCR als auch *in situ* Hybridisierungen konnte die mengenmäßige Reduktion der maternalen *XDppa2/4* Transkripte nach dem Ende des Blastula-Stadiums bei beginnender Differenzierung aufgezeigt werden. *XDppa2/4* wird folglich in Zellen mit pluripotentem Charakter exprimiert, zu denen Oozyten und Embryonen in den frühen Teilungsstadien bis zu Blastulation gehören. In somatischen Geweben findet keine Transkription statt. Somit verhält sich *XDppa2/4* bezüglich seiner Expression wie ein Mitglied der *Dppa*-Familie.

Die Rolle von Dppa2 und Dppa4 bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz und der Selbsterneuerung in murinen ES-Zellen wurde durch Überexpression und funktionellem Knockdown untersucht (Ivanova et al., 2006; Masaki et al., 2007). Während beide Studien darin übereinstimmen, dass Dppa4 nicht für die Selbsterneuerung der Zellen benötigt wird, zeigen sie widersprüchliche Ergebnisse betreffend der Funktion von Dppa4 bei der Differenzierung von embryonalen Stammzellen. So weist der Verlust von Dppa4 anhand erhöhter Expression von *Fgf5* und *Nestin* selbst in der Anwesenheit von LIF auf eine Differenzierung der ES-Zellen in Richtung primitiven Ektoderms (Masaki et al., 2007). Andererseits konnte die induzierte Differenzierung der embryonalen Stammzellen mit Hilfe von *shRNA* durch die zweite Studie nicht bestätigt werden (Ivanova et al., 2006). Schließlich beweist auch der erst kürzlich publizierte Knockout, dass Dppa2 und Dppa4 keine Funktion für die Selbsterneuerung und die Aufrechterhaltung der Pluripotenz in ES Zellen haben (Madan et al., 2009). Demgegenüber sind sie offensichtlich unverzichtbar für die Embryogenese, da Dppa4(-/-) Embryonen perinatal letal sind. Die Auswirkungen des funktionellen XDppa2/4-Knockdowns auf die embryonale Entwicklung von *Xenopus* führen zu der gleichen Schlussfolgerung. Der XDppa2/4-Funktionsverlust führt zum Tod der Embryonen, wenn nichtinjizierte Kontrollembryonen das Schwanzknospenstadium erreichen. Die Ursache ihres Absterbens ist allerdings noch nicht geklärt, zumal sie zu einem Zeitpunkt sterben, an dem keine *XDppa2/4* Expression mehr nachgewiesen werden kann. Denkbar wäre, dass XDppa2/4, wie es bereits für mDppa3 gezeigt wurde, epigenetische Modifikationen des Chromatins bewirkt (Nakamura et al., 2007). Dppa3 kodiert ebenfalls für ein Protein mit einer SAP-Domäne. Die DNA-bindende SAP-Domäne könnte eine Rolle in der chromosomalen Reorganisation spielen. In Analogie zu mDppa4 (Masaki et al., 2007) konnte auch für XDppa2/4 eine Assoziation mit Chromatin nachgewiesen werden. Wie über entsprechende Deletionsmutanten gezeigt werden konnte, beruht diese Assoziation auf der Existenz der

SAP-Domäne.

Embryonen mit Funktionsverlust oder Überexpression von XDppa2/4 wurden auf die Expression mehrerer Markergene analysiert. Im Stadium 11 finden sich für den Knockdown eine erhöhte Expression von ventralen mesodermalen Markern, wie *BMP4* und *XVent1*, dem neural induzierenden Marker *Xnr3*, der als Antagonist der *BMP*-Aktivität bekannt ist (Glinka et al., 1996), und mesendodermalen Induktoren wie *Nodal 5* und *6* (Agius et al., 2000; Takahashi et al., 2000; Shivdasani, 2002; Xanthos et al., 2002). Diese Ergebnisse könnten so interpretiert werden, dass ein Funktionsverlust von XDppa2/4 ein frühzeitiges Einleiten von Differenzierungsprozessen verursacht und somit die Embryogenese negativ beeinflusst, insbesondere die Ausbildung der dorsoventralen Achse. Auf der anderen Seite widerspricht diese Interpretation der nach funktionellem Knockdown und ektopischer Expression beobachteten Reduktion der *Xbra* Transkripte, der Steigerung von *Siamois*, *Xema*, *XSox3* und *Geminin H* und vor allem der nach Überexpression gesteigerten Menge von *Xnr* Transkripten. Deshalb ist die Schlussfolgerung, dass sie für die Aufrechterhaltung des pluripotenten Status oder der Verhinderung der Differenzierung verantwortlich sind, in dieser Form sicher nicht zutreffend. XDppa2/4 scheint vielmehr solche Gene zu beeinflussen, die innerhalb der embryonalen Genkaskaden weiter unten lokalisiert sind, die aber durchaus noch ein Potential für die Regulation der während der frühen Embryogenese stattfindenden Differenzierungs- und Musterbildungsprozesse haben.

Während eine Überexpression von *Xenopus* Oct25 zu einer Verdopplung der *XDppa2/4* Transkripte führte (Daten hier nicht gezeigt), resultierte eine Überexpression von XDppa2/4 in keinerlei Veränderung der *Oct25* Transkription. Es ist bekannt, dass es sich bei mDppa4 um ein Zielgen des Oct3/4-Sox2-Komplexes handelt (Boyer et al., 2005; Chakravarthy et al., 2008). Ob ein aus einem der POU-V Faktoren und XSox2 gebildeter Komplex auch die Expression von *XDppa2/4* regulieren kann, blieb bislang ungeklärt.

4.12. Die SAP-Domäne von XDppa2/4 ist für den Ablauf der Gastrulation entbehrlich

Das murine *Dppa4* Gen kodiert für zwei verschiedene Spleißvarianten. Das kleinere Transkript der beiden kodiert für ein Protein ohne SAP-Domäne (Maldonado-Saldivia et al., 2007). Durch Verwendung von rekombinanten Expressionsvektoren wurde in Transfektionsexperimenten die Isoform, die die SAP-Domäne enthält, im Zellkern und die Isoform, der die SAP-Domäne fehlt, im Zytoplasma lokalisiert (Madan et al., 2009). Diese Beobachtung stimmt mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen überein, wonach ein XDppa-EGFP Fusionsprotein nach Transfektion von HeLa-Zellen im Zellkern und ein ΔSAP-

EGFP im Zytoplasma angereichert ist. Im Gegensatz dazu zeigte die ΔDCR-EGFP Mutante eine nukleäre Verteilung. Überraschenderweise verursachte die Überexpression der Mutante ohne SAP-Domäne (ΔSAP) einen mit der Überexpression von XDppa2/4 vergleichbaren Phänotyp. Die Überexpression der ΔDCR Mutanten hingegen führte zu wildtypischen Embryonen. Darüber hinaus lässt eine Deletion der ersten 65 Aminosäuren inklusive der SAP-Domäne (aa66-240) und ebenso eine Deletion des N-terminalen Endes, das der SAP-Domäne vorausgeht (aa1-19), den Schuss zu, dass weder der N-Terminus noch die SAP-Domäne für den dargestellten Phänotyp verantwortlich sind. Bemerkenswerterweise scheint der nach Überexpression beobachtete Phänotyp auch unabhängig von der nukleären Lokalisation zu sein. Während für den ΔN-Terminus eine nukleäre Lokalisation nachgewiesen werden konnte, waren die Mutanten ΔSAP und aa66-240 zytosolisch angereichert. Allerdings wiesen alle Konstrukte mit einer Deletion der DCR-Domäne (ΔDCR, ΔSAPΔDCR und aa1-65) unabhängig von ihrer intrazellulären Lokalisation eine normale Blastoporusbildung und Neurulation auf. Das macht deutlich, dass die DCR-Domäne für den erhaltenen Phänotyp verantwortlich ist. Jedoch lässt eine Injektion der DCR-Domäne allein oder in Verbindung mit der SAP-Domäne (SAP+L+DCR) den Schluss zu, dass die Region DCR-Domäne nicht ausreichend ist, sondern dass zusätzliche Bereiche der C-terminalen Region benötig werden. Darüber hinaus wird auch der Phänotyp des Funktionsverlusts nicht durch ein Fehlen der SAP-Domäne hervorgerufen. Der nach funktionellem Knockdown im Verlauf der Gastrulation beobachtete Defekt beim Blastoporusschluss konnte nicht nur durch die Überexpression von XDppa2/4 sondern auch durch die ΔSAP-Mutante revertiert werden. Allerdings lässt die Tatsache, dass die ΔSAP-Mutante nach der abgeschlossenen Neurulation das Absterben der Embryonen nicht unterdrücken konnte, die Schlussfolgerung zu, dass die SAP-Domäne eine Funktion im Ablauf der normalen Entwicklung in späteren embryonalen Stadien übernimmt. Dabei ist anzunehmen, dass es bereits in frühen Stadien zu epigenetischen Veränderungen kommt, da die Transkripte von XDppa2/4 nach Abschluss der Gastrulation nicht mehr nachweisbar sind. Angesichts dieser Schlussfolgerung stellt sich allerdings die Frage, warum mDppa2, das ebenfalls eine SAP-Domäne enthält, das Absterben der Embryonen nicht verhindert. Möglicherweise könnte diese Diskrepanz auf die evolutionäre Distanz und die geringe Konservierung zwischen den beiden SAP-Domänen in Maus und *Xenopus* zurückzuführen sein.

Abschließend wurde die strukturelle Identität der C-terminal verlängerten DCR-Domäne näher untersucht. Mit Hilfe von BLAST-Analysen wurden offensichtliche Übereinstimmungen zur Pleckstrin Homologie (PH)-Domäne des Plekhb1 der Ratte

(Andrews et al., 2000) gefunden (Abb. 32). Die PH-Domäne wurde ursprünglich als ein Bereich von 100 bis 120 AS in Pleckstrin beschrieben (Haslam et al., 1993). Mittlerweile wurde sie in einer Vielzahl eukaryotischer Proteine nachgewiesen, die sehr unterschiedliche Funktionen sowohl im Zytosol als auch im Nukleus ausüben (Shaw, 1993). Den PH-Domänen ist eine Struktur aus sieben β-Strängen gemeinsam, die zwei antiparallele β-Blätter bilden und sich vor einer C-terminal gelegenen α-Helix befinden (Riddihough, 1994; Lemmon et al., 1996; Isakoff et al., 1998). Es muss erwähnt werden, dass die Konsensussequenz der Dppa2/4 Proteine zur PH-Domäne über die als DCR beschriebene Region hinaus in Richtung des C-Terminus verlängert ist (Abb. 32). Das könnte die Ursache dafür sein, dass nach Überexpression allein der DCR-Domäne keine phänotypische Veränderung auftrat. Auch die Beobachtung, dass die Reversion des XDppa2/4-Funktionsverlusts während der Neurulation lediglich mit mDppa2 aber nicht mit mDppa4 erfolgte, dem die C-terminale Verlängerung der DCR-Domäne fehlt (Abb. 21), könnte mit Hilfe dieses Sachverhalts erklärt werden. Allerdings bedarf es weiterer Experimente, um die Zusammenhänge zwischen der DCR/C-terminalen Region von XDppa2/4 und der PH-Domäne aufzudecken.



Abb. 32: Vergleich der Pleckstrin Homologie-Domäne des Plekhb1 von *Rattus norvegicus* und der DCR-Domäne von Dppa2/4 Proteinen verschiedener Spezies. Die PH-Domäne ist gelb und die DCR-Domäne grau unterlegt. Chemisch identische Aminosäuren sind rot hervorgehoben (PAM 100; mind. 3 von 5 AS). Ähnliche oder identische Aminosäuren zwischen lediglich einem der Dppa-Proteine und Pleckhb1 sind in blau dargestellt. Eine hypothetische Konsensussequenz ist darunter abgebildet (mind. 4 von 5 AS). Φ stellt hydrophobe AS dar, p markiert polare AS, ausgenommen saure und basische. Basische AS werden durch b und saure durch a markiert. In den Klammern befinden sich Accession- und Ensembl-Nummern. *A.c. Anolis carolinensis; H.s. Homo sapiens; M.m. Mus musculus; R.n. Rattus norvegicus; X.l. Xenopus laevis*

5. Zusammenfassung

Unter Pluripotenz von Zellen versteht man deren Fähigkeit zur Selbsterneuerung und deren Potential, sich in Derivate jedes der drei Keimblätter, Ektoderm, Mesoderm und Endoderm zu entwickeln. Embryonale Stammzellen (ES) der Säugetiere exprimieren eine Reihe von Genen, wie den POU-V Faktor Oct3/4, die für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz und für die Unterdrückung der Differenzierung essentiell sind. Mit einsetzender Differenzierung kommt es zur Inhibition und letztlich zur Stilllegung der Gene für Pluripotenzfaktoren. Mit Hilfe von ektopischer Expression und Funktionsverlustanalysen der POU-V Homologen in *Xenopus*, Oct60, Oct25 und Oct91, konnte gezeigt werden, dass die Bildung des Mesoderms und des Endoderms unterdrückt wird. Die POU-V Faktoren von *Xenopus* wirken antagonistisch gegenüber VegT und β-Catenin, die die primären Ereignisse der mesendodermalen Keimblattinduktion und Dorsalisierung des Embryos induzieren. Es konnte gezeigt werden, dass die POU-V Faktoren mit VegT und Tcf3, einem Kofaktor für die Weiterleitung des β-Catenin-Signals, Komplexe formen können. Auch direkte Zielgene von VegT und/oder β-Catenin, wie *Xnr1* und *Siamois*, stehen unter der Regulation der POU-V Faktoren. Zusätzlich werden auch die mesendodermal induzierenden Aktivitäten des Nodal/Aktivin Signalwegs inhibiert. Dies wird durch eine direkte Interaktion der POU-V Faktoren mit dessen Komponenten, z.B. Smad2, FAST1 und WMSCR11, vermittelt. Da das Oct3/4 Protein aus Säugern die Funktion der POU-V Faktoren in *Xenopus* übernehmen kann, ist die funktionelle Homologie dieser Gene bestätigt.

Andere in pluripotenten ES Zellen und frühembryonalen Stadien exprimierte Gene werden zur Gruppe der "*Developmental pluripotency associated*" (*Dppa*) Gene zusammengefasst. In dieser Arbeit konnte erstmals ein Gen in *Xenopus, XDppa2/4,* charakterisiert werden, das zu den in Säugern exprimierten *Dppa2* und *Dppa4* Genen homolog ist. Ein Charakteristikum der Dppa2/4 Proteine ist die Existenz zweier konservierter Bereiche, nämlich einer DNA-bindenden SAP-Domäne und einer bislang nicht näher charakterisierten C-terminalen Domäne (DCR). Das zeitliche und räumliche Expressionsmuster des *XDppa2/4* Gens entspricht der für die *Dppa* Gene gültigen Definition. Mittels ektopischer Expression von XDppa2/4, einer Reihe von Deletionsmutanten sowie mittels eines Morpholino *antisense* Oligonukleotid bedingten Funktionsverlustes konnte die Rolle dieses Gens in der frühen Embryonalentwicklung von *Xenopus* charakterisiert werden. Dabei zeigte sich, dass die DCR-Domäne für die Erzeugung eines frühen Phänotyps während der Gastrulation verantwortlich ist, wohingegen die SAP-Domäne vermutlich für epigenetische Veränderungen erforderlich ist, deren Funktionen erst in späteren Entwicklungsstadien zum Tragen kommen.

6. Summary

Pluripotent cells are characterized by self-renewal and their ability to form all types of tissues derived from the three germ layers, ectoderm, mesoderm and endoderm. One of the factors required for the maintenance of pluripotency is the mammalian Oct3/4, a member of the POU-V family of transcription factors. Starting with the primary induction of differentiation, pluripotency factors become downregulated and finally silenced. Thereby, the cells lose their pluripotent status and are determined to differentiate into distinct tissues. However, the correct formation of germ layers requires a proper balance between differentiation signals and signals maintaining the undifferentiated state of embryonic cells. In *Xenopus,* three members of the POU-V family, Oct25, Oct60 and Oct91, have been identified, which show a pluripotency related expression behavior in oocytes and early embryos. They are able to suppress formation of mesendoderm by antagonizing two key players in the hierarchy of factors that are required for induction and patterning of mesendoderm in *Xenopus* embryogenesis, VegT and β-Catenin. This is mediated by the formation of repression complexes between Oct25, VegT and Tcf3 on gene promoters being activated by VegT and β-Catenin. Additionally, inhibition of the nodal/activin signaling pathway is also achieved by formation of repression complexes between Oct25 and the signal transducers of the nodal/activin pathway, WBSCR11, FAST1, and Smad2, on the promoters of *Gsc* and *Mix2*. Thereby, POU-V factors maintain the undifferentiated state of embryonic cells in preventing them from premature differentiation and they also control the levels of embryonic signaling pathways for correct specification of germ layers. The functional homology between mammalian Oct3/4 and *Xenopus* Oct25 or Oct60 is demonstrated by the fact, that overexpression of Oct3/4 is able to rescue the POU-V knockdown in *Xenopus*.

Another set of genes expressed in pluripotent ES-cells are designated as *developmental pluripotency associated* genes (*Dppa)*. This work describes the first characterization of a *Xenopus* gene*, XDppa2/4,* that is homologous to mammalian *Dppa2* and *Dppa4*. XDppa2/4 protein contains a DNA-binding SAP domain and a conserved but not yet characterized Dppa C-terminal conserved region (DCR). The spatial and temporal expression of *XDppa2/4* in *Xenopus* correlates to that of other known pluripotency factors. Ectopic expression of wildtype and mutant XDppa2/4 as well as knockdown studies revealed the role of this gene in early embryonic development of *Xenopus*. While phenotypic variations observed during gastrulation until the end of neurulation are exclusively caused by the conserved C-terminal region, the SAP domain is presumably required for epigenetic modifications being indispensable for embryonic survival at later stages.

7. Literaturverzeichnis

Agius, E., Oelgeschlager, M., Wessely, O., Kemp, C. und DeRobertis, E.M. (2000). Endodermal Nodal-related signals and mesoderm induction in *Xenopus*. *Development* **127**: 1173-1183

Albano, R.M., Godsave, S.F., Huylebroeck, D., Van Nimmen, K., Isaacs, H.V., Slack, J.M. und Smith, J.C. (1990). A mesoderm-inducing factor produced by WEHI-3 murine myelomonocytic leukemia cells is activin A. *Development* **110**: 435-443

Amano, H., Itakura, K., Maruyama, M., Ichisaka, T., Nakagawa, M. und Yamanaka, S. (2006). Identification and targeted disruption of the mouse gene encoding ESG1 (PH34/ECAT2/DPPA5). *BMC Dev. Biol*. **6**: 11

Andrews, K.L., Potdar, P.D., Nettesheim, P. und Ostrowski, L.E. (2000). KPL1, which encodes a novel PH domain-containing protein, is induced during ciliated cell differentiation of rat tracheal epithelial cells. *Exp. Lung Res.* **26**: 257-271

Aravind, L. und Koonin, E.V. (2000). SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 112-114

Ariizumi, T., Sawamura, K., Uchiyama, H. und Asashima, M. (1991). Dose and time-dependent mesoderm induction and outgrowth formation by activin A in *Xenopus laevis*. *Int. J. Dev. Biol.* **35**: 407-414

Aruga, J., Tohmonda, T., Homma, S. und Mikoshiba, K. (2002). Zic1 promotes the expansion of dorsal neural progenitors in spinal cord by inhibiting neuronal differentiation. *Dev. Biol.* **244**: 329-341

Asashima, M., Nakano, H., Shimada, K., Kinoshita, K., Ishii, K., Shibai, H. und Ueno, N. (1990). Mesodermal induction in early amphibian embryos by activin A (erythroid differntiation factor). *Roux's Arch. Dev. Biol.* **198**: 330-335

Asashima, M., Nakano, H., Uchiyama, H., Sugino, H., Nakamura, T., Eto, Y., Ejima, D., Nishimatsu, S., Ueno, N. und Kinoshita, K. (1991). Presence of activin (erythroid differentiation factor) in unfertilized eggs and blastulae of *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 6511-6514

Azuara, V., Perry, P., Sauer, S., Spivakov, M., Jorgensen, H.F., John, R.M., Gouti, M., Casanova, M., Warnes, G., Merkenschlager, M. und Fischer, A.G. (2006). Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat. Cell Biol.* **8**: 532–538

Babaie, Y., Herwig, G., Greber, B., Brink, T.C., Wruck, W., Groth, D., Lehrach, H., Burdon, T. und Adjaye, J. (2007). Analysis of OCT4 dependent transcriptional networks regulating self renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells* **25**: 500-510

Balemans, W. und Van Hul, W. (2002). Extracellular Regulation of BMP Signaling in Vertebrates: A Cocktail of Modulators. *Dev Biol*. **250**: 231-250

Behrens, J., von Kries, J.P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. und Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-Catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**: 638-642

Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R., Wagschal, A., Feil, R., Schreibers, S.L. und Landers, E.S. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**: 315-326

Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. **7**: 1513-1523

Boiani, M. und Schöler, H.R. (2005). Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 872-884

Boorse, G.C., Kholdani, C.A., Seasholtz, A.F. und Denver, R.J. (2006). Corticotropin-releasing factor is cytoprotective in Xenopus tadpole tail: coordination of ligand, receptor, and binding protein in tail muscle cell survival. *Endocrinology* **147**: 1498-1507

Bortvin, A., Eggan, K., Skaletsky, H., Akutsu, H., Berry, D.L., Yanagimachi, R., Page, D.C. und Jaenisch, R. (2003). Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development* **130**: 1673-1680

Bortvin, A., Goodheart, M., Liao, M. und Page, D.C. (2004). Dppa3 / Pgc7 / stella is a maternal factor and is not required for germ cell specification in mice. *BMC Dev. Biol.* **4:**2

Botquin, V., Hess, H., Fuhrmann, G., Anastassiadis, C., Gross, M.K., Vriend, G. und Schöler, H.R. (1998). New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. *Genes Dev.* **12**: 2073-2090

Bottcher, R.T. und Niehrs, C. (2005). Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr. Rev*. **26**: 63-77

Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., Gifford, D.K., Melton, D.A., Jaenisch, R. und Young, R.A. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**: 947-956

Boyer, L.A, Mathur, D. und Jaenisch, R. (2006a). Molecular control of pluripotency. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**: 455-462

Boyer, L.A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L.A., Lee, T.I., Levine, S.S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M.K., Bell, G.W., Otte, A.P., Vidal, M., Gifford, D.K., Young, R.A. und Jaenisch, R. (2006b). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* **441**: 349-353

Brannon, M., Gomperts, M., Sumoy, L., Moon, R.T. und Kimelman, D. (1997). A beta-Catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes Dev.* **11**: 2359-2370

Briggs, R. und King, T.J. (1960). Nuclear transplantation studies on the early gastrula (Rana pipiens). I. Nuclei of presumptive endoderm. *Dev. Biol.* **2**: 252-270

Bullock, W.O., Fernández, J.M. und Short, J.M. (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**: 376

Burgess, S., Reim, G., Chen, W., Hopkins, N. und Brand, M. (2002). The zebrafish spiel-ohne-grenzen (spg) gene encodes the POU domain protein Pou2 related to mammalian Oct4 and is essential for formation of the midbrain and hindbrain, and for pre-gastrula morphogenesis. *Development* **129**: 905-916

Bylund, M., Andersson, E., Novitch, B.G. und Muhr, J. (2003). Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat. Neurosci*. **6**: 1162-1168

Campbell, K.H., McWhir, J., Ritchie, W.A. und Wilmut, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer

from a cultured cell line. *Nature* **380**: 64-66

Cao, Y., Knöchel, S., Donow, C., Miethe, J., Kaufmann, E. und Knöchel, W. (2004). The POU factor Oct-25 regulates the Xvent-2B gene and counteracts terminal differentiation in *Xenopus* embryos. *J. Biol. Chem.* **279**: 43735-43743

Cao, Y., Siegel, D., Donow, C., Knöchel, S., Yuan, L. und Knöchel, W. (2007). POU-V factors antagonize maternal VegT activity and beta-Catenin signaling in Xenopus embryos. *EMBO J.* **26**: 2942-2954

Cao, Y., Siegel, D. und Knöchel, W. (2006). Xenopus POU factors of subclass V inhibit activin/nodal signaling during gastrulation. *Mech. Dev*. **123**: 614-625

Cao, Y., Siegel, D., Oswald, F. und Knöchel, W. (2008). Oct25 represses transcription of nodal/activin target genes by interaction with signal transducers during Xenopus gastrulation. *J. Biol. Chem.* **283(49)**: 34168-34177

Carlone, D.L., Lee, J.H., Young, S.R., Dobrota, E., Butler, J.S., Ruiz, J. und Skalnik, D.G. (2005). Reduced genomic cytosine methylation and defective cellular differentiation in embryonic stem cells lacking CpG binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 4881-4891

Chakravarthy, H., Boer, B., Desler, M., Mallanna, S.K., McKeithan. T.W. und Rizzino, A. (2008). Identification of DPPA4 and other genes as putative Sox2:Oct-3/4 target genes using a combination of in silico analysis and transcription-based assays. *J. Cell Physiol.* **216**: 651-662

Chambers, I. (2004). The molecular basis of pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* **6**: 386-391

Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S. und Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**: 643-655

Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L. und Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* **450**: 1230-1234

Chew, J.L., Loh, Y.H., Zhang, W., Chen, X., Tam, W.L., Yeap, L.S., Li, P., Ang, Y.S., Lim, B., Robson, P. und Ng, H.H. (2005). Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 6031-6046

Cho, K.W.Y., Blumberg, B., Steinbeisser, H. und DeRobertis, E.M. (1991). Molecular nature of Spemann´s organizer: the role of Xenopus homeobox gene geoosecoid. *Cell* **67**: 1111-1120

Christian, J.L. und Moon, R.T. (1993). Interactions between Xwnt-8 and Spemann organizer signaling pathways generate dorsoventral pattern in the embryonic mesoderm of Xenopus. *Genes Dev.* **7**: 13-28

Clark, A.T., Rodriguez, R.T., Bodnar, M.S., Abeyta, M.J., Cedars, M.I., Turek, P.J., Firpo, M.T. und Reijo Pera, R.A. (2004). Human STELLAR, NANOG, and GDF3 genes are expressed in pluripotent cells and map to chromosome 12p13, a hotspot for teratocarcinoma. *Stem Cells* **22**: 169-179

Clements, D., Friday, R.V. und Woodland, H.R. (1999). Mode of action of VegT in mesoderm and endoderm formation. *Development* **126**: 4903-4911

Conlon, F.L., Fairclough, L., Price, B.M., Casey, E.S. und Smith, J.C. (2001). Determinants of T box

protein specificity. *Development* **128**: 3749-3758

Cornell, R.A. und Kimelman, D. (1994). Activin-mediated mesoderm induction requires FGF. *Development* **120**: 453-462

Cornell, R.A., Musci, T.J. und Kimelman, D. (1995). FGF is a prospective competence factor for early activin-type signals in Xenopus mesoderm induction. *Development* **121**: 2429-2437

Cox, W.G. und Hemmati-Brivanlou, A. (1995). Caudalization of neural fate by tissue recombination and bFGF. *Development* **121**: 4349-4358

Dale, L., Howes, G., Price, B.M. und Smith, J.C. (1992). Bone morphogenetic protein 4: a ventralizing factor in early Xenopus development. *Development* **115(2)**: 573-585

Dale, L. und Slack, J.M. (1987). Regional specification within the mesoderm of early embryos of Xenopus laevis. *Development* **100**: 279-295

DeRobertis, E.M. und Kuroda, H. (2004). Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**: 285-308

Domingo, C. und Keller, R. (2000). Cells remain competent to respond to mesoderm-inducing signals present during gastrulation in Xenopus laevis. *Dev. Biol.* **225**: 226-240

Dreyer, T.F. (1915). The morphology of tadpole of *Xenopus laevis. Trans. Roy. Soc. South Africa* **4**: 241-258

Dugaiczyk, A., Boyer, H.W. und Goodman, H.M. (1975). Ligation of Eco RI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J. Mol. Biol*. **96**: 171-176

Edgeworth, F.H. (1930). On the masticatory and hyoid muscles of larvae of Xenopus laevis. *J. Anat.* **64**: 184-188

Eggan, K., Akutsu, H., Loring, J., Jackson-Grusby, L., Klemm, M., Rideout, W.M., 3rd, Yanagimachi, R. und Jaenisch, R. (2001). Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 6209-6214

Eickbush, T.H. und Moudrianakis, E.N. (1978). The compaction of DNA helices into either continuous supercoils or folded-fiber rods and toroids. *Cell* **13**: 295-306

Evans, M.J. und Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**: 154-156

Fan, M.J., Grüning, W., Walz, G. und Sokol, S.Y. (1998). Wnt signaling and transcriptional control of Siamois in *Xenopus* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5626-5631

Feldman, N., Gerson, A., Fang, J., Li, E., Zhang, Y., Shinkai, Y., Cedar, H. und Bergman, Y. (2006). G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nat. Cell Biol.* **8**: 188-194

Frank, D. und Harland, R.M. (1992). Localized expression of a Xenopus POU gene depends on cell-autonomous transcriptional activation and induction-dependent inactivation. *Development* **115**: 439-448

Geiduschek, E.P. und Gray I. (1956). Non-aqueous solutions of sodium deoxyribose-nucleate. *J. Am. Chem. Soc*. **78**: 879-880

Glinka, A., Delius, H., Blumenstock, C. und Niehrs, C. (1996). Combinatorial signalling by Xwnt-11 and Xnr3 in the organizer epithelium. *Mech. Dev.* **60**: 221-231

Graff, J. M., Bansal, A. und Melton, D. A. (1996). Xenopus Mad proteins transduce distinct subsets of signals for the TGF superfamily. *Cell* **85**: 479-487

Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P. und Pevny, L. (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* **39**: 749-765

Green, J.B. und Smith, J.C. (1990). Graded changes in dose of a *Xenopus* activin A homologue elicit stepwise transitions in embryonic cell fate. *Nature* **347**: 391-394

Gurdon J.B. (1975). Nuclear transplantation and the analysis of gene activity in early amphibian development. *Adv. Exp. Med. Biol.* **62**: 35-44

Gurdon, J.B., Harger, P., Mitchell, A. und Lemaire, P. (1994). Activin signalling and response to a morphogen gradient. *Nature* **371**: 487-492

Gutzeit, E. (1889). Die Hornzähne der Batrachierlarven. *Diss. Innaug. Zool.* Univ. Albertina, Wilhelm Engelmann, Leipzig

Harland, R.M. (1991). In situ hybridization: an improved whole-mount method for Xenopus embryos. *Methods Cell Biol.* **36**: 685-695

Harland, R.M. (1994). Neural induction in Xenopus. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**: 543-549

Harland, R. und Gerhart, J. (1997). Formation and function of Spemann's organizer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**: 611-667

Haslam, R.J., Koide, H.B. und Hemmings, B.A. (1993). Pleckstrin domain homology. *Nature* **363**: 309-310

Hay, D.C., Sutherland, L., Clark, J. und Burdon, T. (2004). Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* **22**: 225-235

Heasman, J. (2006). Maternal determinants of embryonic cell fate. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **17**: 93-98

Heasman, J., Kofron, M. und Wylie, C. (2000). Beta-Catenin signaling activity dissected in the early Xenopus embryo: a novel antisense approach. *Dev. Biol.* **222**: 124-134

Heldin, C.H., Miyazono, K. und ten Dijke, P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**: 465-471

Helling, R.B., Goodman, H.M. und Boyer, H.W. (1974) Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J. Virol*. **14**: 1235-1244

Henig, C., Elias, S. und Frank, D. (1998). A POU protein regulates mesodermal competence to FGF in *Xenopus*. *Mech. Dev.* **71**: 131-142

Hensey, C. und Gautier, J. (1998) Programmed cell death during *Xenopus* development: a spatio-temporal analysis. *Dev. Biol*. **203**: 36-48

Herr, W. und Cleary, M.A. (1995). The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain. *Genes Dev*. **9**: 1679-1693

Hilton, E., Rex, M. und Old, R. (2003). VegT activation of the early zygotic gene Xnr5 requires lifting of Tcf-mediated repression in the *Xenopus* blastula. *Mech. Dev.* **120**: 1127-1138

Hinkley, C.S., Martin, J.F., Leibham, D. und Perry, M. (1992). Sequential expression of multiple POU proteins during amphibian early development. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 638-649

Houston, D.W., Kofron, M., Resnik, E., Langland, R., Destree, O., Wylie, C. und Heasman, J. (2002). Repression of organizer genes in dorsal and ventral *Xenopus* cells mediated by maternal XTcf3. *Development* **129**: 4015-4025

Huang, H.-C., Murtaugh, L.C., Vize, P.D. und Whitman, M. (1995). Identification of a potential regulator of early transcriptional response to mesoderm inducers in the frog embryo. *EMBO J.* **14**: 5965-5973

Hurlstone, A. und Clevers, H. (2002). T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *EMBO J.* **21**: 2303-2311

Hyde, C.E. und Old, R.W. (2000). Regulation of the early expression of the Xenopus nodal-related 1 gene, Xnr1. *Development* **127**: 1221-1229

Ichimura, T., Bonventre, J.V., Bailly, V., Wie, H., Hession, C.A., Cate, R.L. und Sanicola, M. (1998). Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J. Biol. Chem.* **273**: 4135-4142

Isaacs, H.V., Pownall, M.E. und Slack, J.M. (1998). Regulation of Hox gene expression and posterior development by the *Xenopus* caudal homologue Xcad3. *EMBO J.* **17**: 3413-3427

Isakoff, S.J., Cardozo, T., Andreev, J., Li, Z., Ferguson, K.M., Abagyan, R., Lemmon, M.A., Aronheim, A. und Skolnik, E.Y. (1998). Identification and analysis of PH domain-containing targets of phosphatidylinositol 3-kinase using a novel in vivo assay in yeast. *EMBO J.* **17**: 5374-5387

Ivanova, N., Dobrin, R., Lu, R., Kotenko, I., Levorse, J., DeCoste, C., Schafer, X., Lun, Y. und Lemischka, I.R. (2006). Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* **442**: 533-538

Jaenisch, R. und Young, R. (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* **132**: 567-582

Johnson, P.H. und Grossman, L.I. (1977). Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double- and single-stranded DNAs. *Biochemistry* **16**: 4217-4225

Jones, C.M., Kuehn, M.R., Hogan, B.L., Smith, J.C. und Wright, C.V. (1995). Nodal-related signals induce axial mesoderm and dorsalize mesoderm during gastrulation. *Development* **121**: 3651-3662

Joseph, E.M. und Melton, D.A. (1997). Xnr4: a Xenopus nodal-related gene expressed in the Spemann organizer. *Dev. Biol.* **184**: 367-372

Kavka, A.I. und Green, J.B.A. (2000). Evidence for dual mechanisms of mesoderm establishment in Xenopus embryos. *Dev. Dyn*. **219**: 77-83

Kehler, J., Tolkunova, E., Koschorz, B., Pesce, M., Gentile, L., Boiani, M., Lomelí, H., Nagy, A., McLaughlin, K.J., Schöler, H.R. und Tomilin. A. (2004). Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep.* **5**: 1078-1083

Khochbin, S., Verdel, A., Lemercier, C. und Seigneurin-Berny, D. (2001). Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**: 162-166

Kim, J., Chu, J., Shen, X., Wang, J. und Stuart Orkin, H. (2008). An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell* **132**: 1049-1061

Kimelman, D., Abraham, J.A., Haaparanta, T., Palsi, T. und Kirschner, M.W. (1988). The presence of fibroblast growth factors in the frog egg. Its role as a natural mesoderm inducer. *Science* **242**: 1053-1056

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

Kirby, K.S. (1956). A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *Biochem. J.* **64**: 405-408

Kishi, M., Mizuseki, K., Sasai, N., Yamazaki, H., Shiota, K., Nakanishi, S. und Sasai, Y. (2000). Requirement of Sox2-mediated signaling for differentiation of early *Xenopus* neuroectoderm. *Development* **127**: 791-800

Kofron, M., Demel, T., Xanthos, J., Lohr, J., Sun, B., Sive, H., Osada, S., Wright, C., Wylie, C. und Heasman, J. (1999) Mesoderm induction in *Xenopus* is a zygotic event regulated by maternal VegT via TGFbeta growth factors. *Development* **126**: 5759-5770

Köster, M., Plessow, S., Clement, J.H., Lorenz, A., Tiedemann, H. und Knöchel, W. (1991). Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4), a member of the TGF-beta family, in early embryos of Xenopus laevis: analysis of mesoderm inducing activity. *Mech. Dev.* **33**: 191-199

LaBonne, C. und Whitman, M. (1997). Localization of MAP kinase activity in early *Xenopus* embryos: implications for endogenous FGF signaling. *Dev. Biol.* **183**: 9-20

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Lamb, T. M. und Harland, R. M. (1995). Fibroblast growth factor is a direct neural inducer, which combined with noggin generates anterior-posterior neural pattern. *Development* **121**: 3627-3636

Laurent, M., Hashimoto, C., Blitz, I.L., Rothbacher, U. und Cho, K.W.Y. (1997) The Xenopus homeobox gene twin mediates Wnt induction of goosecoid in establishment of Spemann´s organizer. *Development* **124**: 4905-4916

Lavial, F., Acloque, H., Bertocchini, F., Macleod, D.J., Boast, S., Bachelard, E., Montillet, G., Thenot, S., Sang, H.M., Stern, C.D., Samarut, J. und Pain, B. (2007). The Oct4 homologue PouV and Nanog regulate pluripotency in chicken embryonic stem cells. *Development* **134**: 3549-3563

Lee, T.I., Jenner, R.G., Boyer, L.A., Guenther, M.G., Levine, S.S., Kumar, R.M., Chevalier, B., Johnstone, S.E., Cole, M.F., Isono, K., Koseki, H., Fuchikami, T., Abe, K., Murray, H.L., Zucker, J.P., Yuan, B., Bell, G.W., Herbolsheimer, E., Hannett, N.M., Sun, K., Odom, D.T., Otte, A.P., Volkert, T.L., Bartel, D.P., Melton, D.A., Gifford, D.K., Jaenisch, R. und Young, R.A. (2006). Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* **125**: 301-313

Lemaire, P., Darras, S., Caillol, D. und Kodjabachian, L. (1998) A role for the vegetally expressed Xenopus gene Mix.1 in endoderm formation and in the restriction of mesoderm to the marginal zone. *Development* **125**: 2371-2380

Lemmon, M.A., Ferguson, K.M. und Schlessinger, J. (1996). PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. Cell **85**: 621-624

Li, J., Greco, V., Guasch, G., Fuchs, E. und Mombaerts, P. (2007). Mice cloned from skin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 2738-2743

Lunde, K., Belting, H.G. und Driever, W. (2004). Zebrafish *pou5f1/pou2* homolog of mammalian Oct4, functions in the endoderm specification cascade. *Curr. Biol.* **14**: 48-55

Lustig, K.D., Kroll, K.L., Sun, E.E. und Kirschner, M.W. (1996). Expression cloning of a Xenopus T-related gene (Xombi) involved in mesodermal patterning and blastopore lip formation. *Development* **122**: 4001-4012

Madan, B., Madan, V., Weber, O., Tropel, P., Blum, C., Kieffer, E., Viville, S. und Fehling, H.J. (2009). The pluripotency-associated gene Dppa4 is dispensable for embryonic stem cell identity and germ cell development but essential for embryogenesis. *Mol. Cell Biol*. **29**: 3186-3203

Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, Y., Tchieu, J., Jaenisch, R., Plath, K. und Hochedlinger, K. (2007). Global epigenetic remodeling in directly reprogrammed fibroblasts. *Cell Stem Cell* **1**: 55-70

Maldonado-Saldivia, J., van den Bergen, J., Krouskos, M., Gilchrist, M., Lee, C., Li, R., Sinclair, A.H., Surani, M.A. und Western, P.S. (2007). Dppa2 and Dppa4 are closely linked SAP motif genes restricted to pluripotent cells and the germ line. *Stem Cells* **25**: 19-28

Mariadason, J.M. (2008). HDACs and HDAC inhibitors in colon cancer. *Epigenetics* **3**: 28-37

Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**: 7634-7638

Masaki, H., Nishida, T., Kitajima, S., Asahina, K. und Teraoka, H. (2007). Developmental pluripotency-associated 4 (DPPA4) localised in active chromatin inhibits mouse embryonic stem cell differentiation into a primitive ectoderm lineage. *J. Biol. Chem.* **282**: 33034-33042

Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A.A., Ko, M.S. und Niwa, H. (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* **9**: 625-635

McDonell, M.W., Simon, M.N. und Studier, F.W. (1977). Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J. Mol. Biol*. **110**: 119-146

McPherson, M.J., Hames, B.D. und Taylor, G.R. (1995). PCR 2- A Practical Approach. *IRL Press at Oxford University Press*, *Oxford*

McPherson, M.J., Quirke, P. und Taylor, G.R. (1991). PCR 1- A Practical Approach. *IRL Press at Oxford University Press, Oxford*

Mikkelsen, T.S., Ku, M., Jaffe, D.B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T.K., Koche, R.P., Lee, W., Mendenhall, E., O'Donovan, A., Presser, A., Russ, C., Xie, X., Meissner, A., Wernig, M., Jaenisch, R., Nusbaum, C., Lander, E.S. und Bernstein, B.E. (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* **448**: 553-560

Mir, A., Kofron, M., Zorn, A.M., Bajzer, M., Haque, M., Heasman, J. und Wylie, C.C. (2007). FoxI1e activates ectoderm formation and controls cell position in the Xenopus blastula. *Development* **134**:

779-788

Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M. und Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **113**: 631-642

Mizuseki, K., Kishi, M., Matsui, M., Nakanishi, S. und Sasai, Y. (1998). *Xenopus* Zic-related-1 and Sox-2, two factors induced by chordin, have distinct activites in the initiation of neural induction. *Development* **125**: 579-587

Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O. und Clevers H. (1996). XTcf-3 transcription factor mediates beta-Catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* **86**: 391-399

Monk, M. und Holding, C. (2001). Human embryonic genes re-expressed in cancer cells. *Oncogene* **20**: 8085-8091

Moon, R.T. und Christian, J.L. (1992). Competence modifiers synergize with growth factors during mesoderm induction and patterning in Xenopus. *Cell* **71**: 709-712

Morrison, G.M. und Brickman, J.M. (2006). Conserved roles for Oct4 homologues in maintaining multipotency during early vertebrate development. *Development* **133**: 2011-2022

Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335-350

Nakamura, T., Arai, Y., Umehara, H., Masuhara, M., Kimura, T., Taniguchi, H., Sekimoto, T., Ikawa, M., Yoneda, Y., Okabe, M., Tanaka, S., Shiota, K. und Nakano, T. (2007). PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nat. Cell Biol.* **9**: 64-71

Newport, J.W. und Kirschner, M.W. (1984). Regulation of the cell cycle during early Xenopus development. *Cell* **37**: 731-742

Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H. und Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* **95**: 379-391

Niehrs, C., Keller, R., Cho, K.W.Y. und DeRobertis, E.M. (1993). The homeobox gene goosecoid controls cell migration in Xenopus embryos. *Cell* **72**: 491-503

Nieuwkoop, P.D. und Faber, J. (1967). Normal Table of Xenopus laevis (Daudin), 2nd ed. Elsevier/North Holland, Amsterdam

Niwa, H., Masui, S., Chambers, I., Smith, A.G. und Miyazaki, J. (2002). Phenotypic complementation establishes requirements for specific POU domain and generic transactivation function of Oct-3/4 in embryonic stem cells. *Mol. Cell Biol.* **22**: 1526-1536

Niwa, H., Miyazaki, J. und Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* **24**: 372-376

Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R. und Rossant, J. (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* **123(5)**: 917-929

Okabayashi, K. und Asashima, M. (2003). Tissue generation from amphibian animal caps. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**: 502-507

Okamoto, K., Okazawa, H., Okuda, A., Sakai, M., Muramatsu, M. und Hamada, H. (1990). A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* **60**: 461-472

Okita, K., Ichisaka, T. und Yamanaka, S. (2007). Generation of germlinecompetent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**: 313-317

Ovitt, C.E. und Scholer, H.R. (1998). The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo. *Mol. Hum. Reprod.* **4**: 1021-1031

Palmieri, S.L., Peter, W., Hess, H. und Schöler, H.R. (1994). Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev. Biol.* **166**: 259-267

Pan, G., Li, J., Zhou, Y., Zheng, H. und Pei, D. (2006). A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal. *FASEB J.* **20**: 1730-1732

Pan, G., Qin, B., Liu, N., Schöler, H.R. und Pei, D. (2004). Identification of a nuclear localization signal in OCT4 and generation of a dominant negative mutant by its ablation. *J. Biol. Chem.* **279**: 37013-37020

Payer, B., Saitou, M., Barton, S.C., Thresher, R., Dixon, J.P., Zahn, D., Colledge, W.H., Carlton, M.B., Nakano, T. und Surani, M.A. (2003). Stella is a maternal effect gene required for normal early development in mice. *Curr. Biol.* **13**: 2110-2117

Pei, D. (2009). Regulation of pluripotency and reprogramming by transcription factors. *J. Biol. Chem.* **284**: 3365-3369

Pesce, M. und Schöler, H.R. (2000). Oct-4: control of totipotency and germline determination. *Mol. Reprod. Dev.* **55**: 452-457

Pesce, M. und Schöler, H.R. (2001). Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* **19**: 271-278

Pierre, A., Gautier, M., Callebaut, I., Bontoux, M., Jeanpierre, E., Pontarotti, P. und Monget, P. (2007). Atypical structure and phylogenomic evolution of the new eutherian oocyte- and embryo-expressed KHDC1/DPPA5/ECAT1/OOEP gene family. *Genomics* **90**: 583-594

Ramsdell, A. F. and Yost, H. J. (1998). Molecular mechanisms of vertebrate left-right development. *Trends Genet.* **14**: 459-465

Reim, G., Mizoguchi, T., Stainier, D.Y., Kikuchi, Y. und Brand, M. (2004). The POU domain spg (Pou2/Oct4) is essential for endoderm formation in cooperation with the HMG domain protein casanova. *Dev. Cell* **6**: 91-101

Rex, M., Hilton, E. und Old, R. (2002). Multiple interactions between maternally-activated signalling pathways control *Xenopus* nodal-related genes. *Int. J. Dev. Biol.* **46:** 217-226

Riddihough, G. (1994). More meanders and sandwiches. *Nat. Struct. Biol.* **1**: 755-757

Rideout, W.M., 3rd, Wakayama, T., Wutz, A., Eggan, K., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Yanagimachi, R. und Jaenisch, R. (2000). Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning. *Nat. Genet.* **24**: 109-110

Ring, C., Ogata, S., Meek, L., Song, J., Ohta, T., Miyazono, K. und Cho, K.W. (2002). The role of a

Williams-Beuren syndrome-associated helix-loop-helix domain-containing transcription factor in activin/nodal signaling. *Genes Dev.* **16**: 820-835

Ringrose, L. und Paro, R. (2004). Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu. Rev. Genet.* **38**: 413-443

Roberts, R.J. (1985). Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nucleic Acids Res*. **13**: 165-200

Roel, G., Hamilton, F.S., Gent, Y., Bain, A.A., Destree, O. und Hoppler, S. (2002). Lef-1 and Tcf-3 transcription factors mediate tissue-specific Wnt signaling during Xenopus development. *Curr. Biol.* **12**: 1941-1945

Rosner, M.H., Vigano, M.A., Ozato, K., Timmons, P.M., Poirier, F., Rigby, P.W. und Staudt, L.M. (1990). A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* **345**: 686-692

Rupp, R.A., Snider, L. und Weintraub, H. (1994). *Xenopus* embryos regulate the nuclear localization of XMyoD. *Genes Dev*. **8 (11)**: 1311-1323

Ryan, A.K. und Rosenfeld, M.G. (1997). POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes. *Genes Dev*. **11**: 1207-1225

Saiki, R.K., Bugawan, T.L., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1986). Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* **324**: 163-166

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. und Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354

Saitou, M., Barton, S.C. und Surani, M.A. (2002). A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* **418**: 293-300

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning - A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci.* USA **74**: 5463-5467

Sato, M., Kimura, T., Kurokawa, K., Fujita, Y., Abe, K., Masuhara, M., Yasunaga, T., Ryo, A., Yamamoto, M. und Nakano, T. (2002). Identification of PGC7, a new gene expressed specifically in preimplantation embryos and germ cells. *Mech. Dev.* **113**: 91-94

Schier, A. F. (2003). Nodal signaling in vertebrate development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**: 589-621

Schier, A. F. und Shen, M. M. (2000). Nodal signalling in vertebrate development. *Nature* **403**: 385-389

Schier, A. F. und Talbot, W. S. (2005). Molecular genetics of axis formation in zebrafish. *Annu. Rev. Genet.* **39**: 561-613

Schöler, H.R., Ruppert, S., Suzuki, N., Chowdhury, K. und Gruss, P. (1990). New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* **344**: 435-439

Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B. und Cavalli, G. (2007). Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* **128**: 735-745

Schuff, M., Rössner, A., Wacker, S.A., Donow, C., Gessert, S. und Knöchel, W. (2007). FoxN3 is required for craniofacial and eye development of Xenopus laevis. *Dev. Dyn*. **236**: 226-239

Seo, S., Herr, A., Lim, J.W., Richardson, G.A., Richardson, H. und Kroll, K.L. (2005). Geminin regulates neuronal differentiation by antagonizing Brg1 activity. *Genes Dev.* **19**: 1723-1734

Shaw, G. (1993). Identification of novel pleckstrin homology (PH) domains provides a hypothesis for PH domain function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**: 1145-1151

Shen, M.M. (2007). Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development* **134**: 1023-1034

Shen, M. M. und Schier, A. F. (2000). The EGF-CFC gene family in vertebrate development. *Trends Genet.* **16**: 303-309

Shivdasani, R.A. (2002). Molecular regulation of vertebrate early endoderm development. *Dev. Biol.* **249:** 191-203

Siegel, D., Schuff, M., Oswald, F. und Knöchel, W. (2009). Functional dissection of XDppa2/4 structural domains in Xenopus development. *Mech. Dev.*, in press

Siomi, H., Choi, M., Siomi, M.C., Nussbaum, R.L. und Dreyfuss, G. (1994). Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome. *Cell* **77**: 33-39

Slack, J. (1994). Role of fibroblast growth factors as inducing agents in early embryonic development. *Mol. Reprod. Dev.* **39**: 118-124

Slack, J.M., Darlington, B.G., Heath, J.K. und Godsave, S.F. (1987). Mesoderm induction in early *Xenopus* embryos by heparin-binding growth factors. *Nature* **326**: 197-200

Smith, J.C. (1998). Mesoderm induction and mesoderm-inducing factors in early amphibian development. *Development* **105**: 665-677

Smith, J.C., Price, B.M., Van Nimmen, K. und Huylebroeck, D. (1990). Identification of a potent *Xenopus* mesoderm-inducing factor as a homologue of activin A. *Nature* **345**: 729-731

Smith, W.C. und Harland, R.M. (1992). Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in Xenopus embryos. *Cell* **70**: 829-840

Smith, W.C., Knecht, A.K., Wu, M. und Harland, R.M. (1993). Secreted noggin protein mimics the Spemann organizer in dorsalizing Xenopus mesoderm. *Nature* **361**: 547-549

Snir, M., Ofir, R., Elias, S. und Frank, D. (2006). Xenopus laevis POU91 protein, an Oct3/4 homologue, regulates competence transitions from mesoderm to neural cell fates. *EMBO J.* **25**: 3664-3674

Sokol, S., Christian, J.L., Moon, R.T. und Melton, D.A. (1991). Injected Wnt RNA induces a complete body axis in Xenopus embryos. *Cell* **67**: 741-752

Solter, D. (2000). Mammalian cloning: advances and limitations. *Nat. Rev. Genet*. **1(3)**: 199-207

Southern, E. (1979). Gel electrophoresis of restriction fragments. *Methods Enzymol.* **68**: 152-176

Spemann, H. und Mangold, H. (1924). Über die Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Roux´s Arch. Entw. Mech.* **100**: 599-638

Steinbeisser, H., DeRobertis, E.M., Ku, M., Kessler, D.S. und Melton, D.A. (1993). Xenopus axis formation: induction of goosecoid by injected Xwnt-8 and activin mRNAs. *Development* **118**: 499-507

Stennard, F., Carnac, G. und Gurdon, J.B. (1996). The Xenopus T-box gene, Antipodean, encodes a vegetally localised maternal mRNA and can trigger mesoderm formation. *Development* **122**: 4179-4188

Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. und Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**: 60-89

Suri, C., Haremaki, T. und Weinstein, D.C. (2005). Xema, a foxi-class gene expressed in the gastrula stage Xenopus ectoderm, is required for the suppression of mesendoderm. *Development* **132**: 2733-2742

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. und Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**: 861-872

Takahashi, K. und Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**: 663-676

Takahashi, S., Yokota, C., Takano, K., Tanegashima, K., Onuma, Y., Goto, J. und Asashima, M. (2000). Two novel nodal-related genes initiate early inductive events in *Xenopus* Nieuwkoop center. *Development* **127**: 5319-5329

Ten Dijke, P. und Hill, C.S. (2004). New insights into TGF-β-Smad signalling. *Trends in Biochem. Sciences* **29**: 265-273

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S. und Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**: 1145-1147

Thorne, H.V. (1966). Electrophoretic characterization and fractionation of polyoma virus DNA. *J. Mol. Biol.* **24**: 203-211

Tolkunova, E., Malashicheva, A., Parfenov, V.N., Sustmann, C., Grosschedl, R. und Tomilin, A. (2007). PIAS Proteins as Repressors of Oct4 Function. *J. Mol. Biol.* **374**: 1200-1212

Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76(9)**: 4350-4354

Tsunoda, Y., Yasui, T., Shioda, Y., Nakamura, K., Uchida, T. und Sugie, T. (1987). Full-term development of mouse blastomere nuclei transplanted into enucleated two-cell embryos. *J. Exp. Zool.* **242(2)**: 147-151

Veenstra, G.J.C., Peterson-Maduro, J., Mathu, M.T., van der Vliet, P.C. und Destree O.H.J. (1998). Non-cell autonomous induction of apoptosis and loss of posterior structures by activation domain-specific interactions of Oct-1 in the Xenopus embryo. *Cell Death Differ.* **5**: 774-784

Vize, P.D. (1996). DNA sequences mediating the transcriptional response of the Mix.2 homeobox gene to mesoderm induction. *Dev. Biol.* **177**: 226-231

Vogt, C.C. (1842). Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricians*) Solothurn: Jent und Gassmann, pp130

Wang, J., Rao, S., Chu, J., Shen, X., Levasseur, D.N., Theunissen, T.W. und Orkin, S.H. (2006). A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* **444**: 364-368

Watabe, T., Kim, S., Candia, A., Rothbacher, U., Hashimoto, C., Inoue, K. und Cho, K.W. (1995). Molecular mechanisms of Spemann´s organizer formation: conserved growth factor synergy between Xenopus and mouse. *Genes Dev.* **9**: 3038-3050

Wegner, M., Drolet, D.W. und Rosenfeld, M.G. (1993). POU-domain proteins: structure and function of developmental regulators. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **5**: 488-498

Weissman, I.L. (2000). Stem Cells: Units of Development, Units of Regeneration, and Units in Evolution. *Cell* **100**: 157-168

Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E. und Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* **448**: 318-324

Wessely, O., Agius, E., Oelgeschlager, M., Pera, E.M. und DeRobertis, E.M. (2001). Neural induction in the absence of mesoderm: βCatenin dependent expression of secreted BMP antagonists at the blastula stage in *Xenopus. Dev. Biol.* **234**: 161-173

White, R.J., Sun, B.I., Sive, H.L. und Smith, J.C. (2002). Direct and indirect regulation of derriere, a *Xenopus* mesoderm-inducing factor, by VegT. *Development* **129**: 4867-4876

Whitfield, T., Heasman, J. und Wylie, C. (1993). XLPOU-60, a *Xenopus* POU-domain mRNA, is oocyte-specific from very early stages of oogenesis, and localised to presumptive mesoderm and ectoderm in the blastula. *Dev. Biol.* **155**: 361-370

Whitfield, T.T., Heasman, J. und Wylie, C.C. (1995). Early embryonic expression of XLPOU-60, a *Xenopus* POU-domain protein. *Dev. Biol.* **169**: 759-769

Whitman, M. (2001). Nodal signaling in early vertebrate embryos: themes and variations. *Dev. Cell* **1**: 605-617

Willadsen, S.M. (1986). Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* **320**: 63-65

Wilmzig, M. (1985). LiCl-boiling method for plasmid mini-preps. *Trends Genet*. **1**: 158

Wodarz, A. und Nusse, R. (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**: 59-88

Xanthos, J.B., Kofron, M., Tao, Q., Schaible, K., Wylie, C. und Heasman, J. (2002). The roles of three signaling pathways in the formation and function of the Spemann Organizer. *Development* **129**: 4027-4043

Xanthos, J.B., Kofron, M., Wylie, C. und Heasman, J. (2001). Maternal VegT is the initiator of a molecular network specifying endoderm in *Xenopus laevis*. *Development* **128**: 167-180

Xi, R. und Xie, T. (2005). Stem cell self-renewal controlled by chromatin remodeling factors. *Science* **310**: 1487-1489

Yeo, S., Jeong, S., Kim, J., Han, J.S., Han, Y.M. und Kang, Y.K. (2007). Characterization of DNA methylation change in stem cell marker genes during differentiation of human embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **359**: 536-542

Yeom, Y.I., Fuhrmann, G., Ovitt, C.E., Brehm, A., Ohbo, K., Gross, M., Hübner, K. und Schöler, H.R. (1996). Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development* **122**: 881-894

Yeom, Y.I., Ha, H.S., Balling, R., Schöler, H.R. und Artzt, K. (1991). Structure, expression and chromosomal location of the Oct-4 gene. *Mech. Dev.* **35**: 171-179

Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M. und Beppu, T. (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* **265**: 17174-17179

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I.I. und Thomson J.A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**: 1917-1920

Zaehres, H., Lensch, M.W., Daheron, L., Stewart, S.A., Itskovitz-Eldor, J. und Daley, G.Q. (2005). High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells. *Stem Cells* **23**: 299-305

Zhang, J., Houston, D.W., King, M.L., Payne, C., Wylie, C. und Heasman, J. (1998). The role of maternal VegT in establishing the primary germ layers in Xenopus embryos. *Cell* **94**: 515-524

Zhang, J. und King, M.L. (1996). Xenopus VegT RNA is localized to the vegetal cortex during oogenesis and encodes a novel T-box transcription factor involved in mesodermal patterning. *Development* **122**: 4119-4129

Zhou, Q., Chipperfield, H., Melton, D.A. und Wong, W.H. (2007). A gene regulatory network in mouse embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 16438-16164

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Alkalische Phosphatase
ARE	Activin Response Element
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bp	base pairs (Basenpaare)
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-Indoyl-Phosphat-p-Tuloidinsalz
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	copy DNA
Chaps	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio] -l-Propansulfonsäure
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
Ci	Curie
CP	Crossing Point
CtrlMO	Control-MO (Kontrollmorpholino Oligonukleotid)
dATP	2'Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'Desoxycytidin-5'-triphosphat
ddNTP	Didesoyribonukleosid-5´-triphosphat
DE	Distales Element
d.h.	das heißt
DIG	Digoxygenin
DMPC	Dimethyl Pyrocarbonat
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
Dnmt	DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase
dNTP	2'Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dpc	days post-coitum (Tage nach der Befruchtung)
Dppa	Developmental pluripotency associated
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
dUTP	2'Desoxyuridin-5'-triphosphat
ECAT	ES cell-associated transcript
ECSA	Embryo Cancer Sequence A
Edd	Endodermin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EGTA	Ethylenglycol-bis (2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ES	Embryonale Stammzellen
EST	expressed sequence tag
et al.	et alii
FAB	Fragment antigen binding
FAST	Forkhead activin signal transducer
FBS	Fetal Bovine Serum (Fötales Rinderserum)
FGF	Fibroblast Growth Factor (Fibroblasten Wachstumsfaktor)
g	Gramm
g	Gravitationskonstante (9,81 m/s^2)

GDF	Growth Differentiation Factor (Wachstumsdifferenzierungsfaktor)
GFP	Green Fluorescent Protein
Gsc	Goosecoid
grhl2	grainyhead like 2
GST	Glutathion-S-Transferase
h	hora (Stunde)
HA	Hemagglutinin
HCG	humanes Choriongonadotropin
HDAC	Histone Deacetylase Complex (Histon Deacetylase Komplex)
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
His	Histidin
HMG	High Mobility Group
ICM	Inner Cell Mass
INT	Iodonitrotetrazolium
iPSC	induced Pluripotent Stem Cells
IPTG	Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilo Basen
kDa	Kilodalton
KHDC	K Homology Domain Containing Protein
KoIP	Koimmunopräzipitation
konz.	konzentriert
l	Liter
lac	Lactose
LB	Luria-Bertani
LEF	Lymphoid Enhancer-Binding Factor
LIF	Leukemia Inhibitory Factor (Leukämie inhibierender Faktor)
M	Mol
mA	Milliampere
MAB	maleic acid buffer (Maleinsäure Puffer)
MBT	Midblastula Transition
MBSH	modified Barth's saline solution/ HEPES
MEM(P)FA	MOPS/ EGTA/MgSO4/(Para)Formaldehyd
mg	Milligramm
min	Minuten
mind.	mindestens
Mix	Mif(Mesoderm inducing factor) inducible homeobox
ml	Milliliter
mM	millimolar (mMol/l)
MO	Morpholino Oligonukleotid
MOPS	N-Morpholino-Propansulfonsäure
MORE	mehr PORE
mRNA	messenger RNA (Boten RNA)
MT	Myc-Tag (Myc-Markierung)
NBT	Nitroblau Tetrazoliumchlorid
Ncam	Neural cell adhesion molecule
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
OCM	Oocyte Culture Medium
Oct	Oktamer
OD	Optische Dichte
ODC	Ornithin-Decarboxylase
OOEP	Oozyten-exprimiertes Protein
ORF	Open reading frame (Offener Leserahmen)
p.a.	pro analysis

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline
PBT	Phosphate-buffered saline/Tween
PCG	Polycomb-Gruppe
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PE	Proximales Element
pg	Picogramm
PGC	Primordial germ cell (Urkeimzelle)
PIAS	Protein Inhibitor of Activated STATs
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PORE	Palindromes Oct Regulatorisches Element
POU	Pit-Oct-Unc
PRC	Polycomb Repression Complex
PVPP	Polyvinylpyrrolidon
RLU	relative light units (relative Lichteinheiten)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction
s	Sekunde
SAP	Scaffold-attachment factor A/B, Acinus und PIAS
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natrium-dodecylsulfat)
Sox	Sry(sex determining region Y) box
St.	Stadium
TAE	Tris-Acetat/EDTA
Tap	tobacco acid pyrophosphatase
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tcf	Transcription Factor
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
TE	Tris-HCl/EDTA
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
TGF	Transforming growth factor (transformierender Wachstumsfaktor)
Tm	Melting Temperature (Schmelztemperatur)
TSA	Trichostatin A
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
ü.N.	über Nacht
U	Unit (Einheit Enzymaktivität)
UTR	Untranslated Region (Untranslatierter Bereich der Boten RNA)
UV	Ultraviolett
V	Volt
VegT	Vegetal T-box transcription factor
WBSCR	Williams-Beuren Syndrome Critical Region 11-like Protein
Wnt	Wingless und Int-1
% v/v	Volumenprozent in Lösung
% w/v	Gewichtsprozent in Lösung
Xbra	Xenopus brachyury
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-ß-D-galaktosid
X.l.	Xenopus laevis
X.t.	Xenopus tropicalis
Xhex	Xenopus hematopoietically expressed homeobox
Xlim	Xenopus lim (lin-11, Isl-1 und mec-3)
Xnr	Xenopus nodal related
XVent	Xenopus ventral expressed homeobox
z.B.	zum Beispiel

Lebenslauf

Name:	Doreen, Siegel (geb. Ullmann)
Anschrift:	Mastenweg 2 89197 Weidenstetten
Geburtsdatum:	23.07.1979
Geburtsort:	Erlabrunn im Erzgebirge
Staatsangehörigkeit:	Deutsch

Schulausbildung:

1986 - 1991	Besuch der Robert-Koch-Oberschule in Erlabrunn
1991 - 1998	Besuch des Johann-Heinrich Pestalozzi-Gymnasiumms in Johanngeorgenstadt Hauptfächer: Biologie und Mathematik
1998	Abitur

Hochschulausbildung:

10/1998 - 02/2004	Studium der Biologie an der Universität Bayreuth Hauptfach: Genetik Nebenfächer: Tierphysiologie und Biochemie
06/2003 - 02/2004	Diplomarbeit „Untersuchungen zur Regulation der Meiose in *Drosophila melanogaster*“, angefertigt am Lehrstuhl der Genetik, Universität Bayreuth, Abt. Prof. Dr. C.F. Lehner

Berufstätigkeit:

Seit 04/2004	wissenschaftlicher Mitarbeiter der AG Prof. Dr. Dr. W. Knöchel, Institut für Biochemie der Universität Ulm, experimentelle Arbeiten zur Dissertation
11/2006-6/2007	Unterbrechung der Dissertation wegen der Geburt meines Sohnes

Praktika:

06/2001- 09/2001 Praktikum am Lehrstuhl der Genetik, Universität Bayreuth, Abt. Prof. Dr. C.F. Lehner
Thema: Hat Fizzy related eine essentielle Funktion in der Mitose?

02/2002 – 04/2002 Praktikum in der Abteilung der Molekularbiologie bei MDS Pharma Services Switzerland AG unter Betreuung von Dr. L.-C. Bennett
Thema: Quantitativer Nachweis von Markerbakterien bei Paradontitis

Publikationen

Cao, Y.*, **Siegel, D.*** und Knöchel, W. (2006). Xenopus POU factors of subclass V inhibit activin/nodal signaling during gastrulation. *Mech. Dev*. **123**: 614-625

Cao, Y., **Siegel, D.**, Donow, C., Knöchel, S., Yuan, L. und Knöchel, W. (2007). POU-V factors antagonize maternal VegT activity and beta-Catenin signaling in Xenopus embryos. *EMBO J.* **26**: 2942-2954

Cao, Y., **Siegel, D.**, Oswald, F. und Knöchel, W. (2008). Oct25 represses transcription of nodal/activin target genes by interaction with signal transducers during Xenopus gastrulation. *J. Biol. Chem.* **283(49)**: 34168-34177

Siegel, D., Schuff, M., Oswald, F. und Knöchel, W. (2009). Functional dissection of XDppa2/4 structural domains in Xenopus development. *Mech. Dev.*, **126**: 974-989

Schuff, M., **Siegel, D.**, Bardine, N., Oswald, F., Donow, C. und Knöchel, W. (2009). *FoxO* genes are dispensable during gastrulation but required for late embryogenesis in *Xenopus laevis*. Dev. Biol., **337(2)**: 259-273

* geteilte Erstautorenschaft

Danksagung

Zuerst möchte ich mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die mich während dieser Arbeit unterstützt und zum Gelingen beigetragen haben.

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. W. Knöchel für die Bereitstellung der interessanten Thematik, aufmerksamen Betreuung und kritischen Anmerkungen aussprechen.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Ying Cao für die gute Betreuung und anregenden Diskussionen während meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei Herrn Dr. Maximilian Schuff bedanken, der mir in wissenschaftlichen Fragen stets hilfreich zur Seite stand, mich in jeglicher Hinsicht unterstützt hat und guten Diskussionen nie abgeneigt war und ist.

Ebenso gilt mein Dank Frau Cornelia Donow, Frau Nicole Heymann und Frau Antje Rößner für ihre fachliche Unterstützung, guten Tipps und seelische Unterstützung.

Des Weiteren möchte ich mich namentlich bei Frau Dr. Sigrun Knöchel, Herrn Dr. Stephan A.Wacker, Herrn Dr. Franz Oswald, Frau Dr. Petra Pandur, Herrn Dr. Ovidiu Sirbu, Frau Dr. Nabila Bardine, Frau Brigitte Korte, Herrn Dr. Daniel Maurus, Herrn Prof. Dr. Hans Jörg Fehling und Herrn C. Pernstich für ihre Anregungen, ihre große Hilfsbereitschaft, moralische Unterstützung und den überaus nützlichen Diskussionsbeiträgen danken.

Allen anderen Kollegen und Mitgliedern des Instituts für Biochemie, sowie Herrn Prof. Dr. M. Kühl und den anderen Mitgliedern des Instituts für Biochemie und Molekulare Biochemie möchte ich ebenso meinen herzlichen Dank für die Unterstützung und hilfreichen Diskussionen aussprechen.

Weiterhin möchte ich auch besonders meinen Eltern und Herrn R. Siegel für die Hilfe und aufmunternden Worte während meines Studiums und meiner Promotion danken.

Letztendlich gilt mein Dank auch meinem kleinen Lichtblick, Tristan, der mich ab und an zum notwendigen Innehalten zwingt und es immer vermag mich zum Lächeln zu bringen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt und die verwendeten Hilfsmittel und Quellen vollständig aufgeführt worden sind.

Doreen Siegel