

Die Rolle von SREBP2 und ferner INSIG  
während der Embryonalentwicklung von  
*Xenopus laevis*

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades  
*doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von Anne Corsing

Diplom-Biologin

geb. am 31.03.1980 in Cottbus

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Hollemann

2. Gutachter: PD Dr. Wolf-Rüdiger Grosse

3. Gutachter: Prof. Dr. Michael Kühl

verteidigt am 15.05.2013



Der unermesslich reichen, stets sich erneuernden Natur gegenüber wird der Mensch, soweit er auch in der wissenschaftlichen Erkenntnis fortgeschritten sein mag, immer das sich wundernde Kind bleiben und muss sich stets auf neue Überraschungen gefasst machen.

Max Planck  
(1858-1947), dt. Physiker (Quantentheorie)



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Cholesterin	1
1.2	Bereitstellung von Cholesterin in der Zelle	3
1.3	Regulation der Cholesterinbiosynthese auf transkriptioneller Ebene	4
1.3.1	<i>sterol regulatory element binding proteins</i> – SREBPs	4
1.3.2	<i>insulin induced genes</i> – INSIGs	5
1.3.3	Regulation der Cholesterinbiosynthese	6
1.4	Cholesterin im Embryo und Fehlregulation der Biosynthese	8
1.5	Ausbildung des Vertebraten Nervensystems	9
1.5.1	Neurogenese bei <i>Xenopus laevis</i>	10
1.5.2	Neuralrohrentwicklung (Neurulation) bei <i>Xenopus laevis</i>	10
1.5.3	Musterbildung durch Signalaustausch: laterale Inhibition	11
1.6	<i>Xenopus laevis</i> als Modellorganismus für die Entwicklungsbiologie	12
1.7	Zielsetzung der Arbeit	13
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1	Das Versuchstier <i>Xenopus laevis</i>	15
2.2	Bakterienstämme	15
2.3	Zelllinien	15
2.4	Chemikalien	15
2.5	Enzyme	17
2.6	Antikörper	17
2.7	Kits	18
2.8	Geräte und Verbrauchsmaterialien	18
2.8.1	Mikroliterpipetten	18
2.8.2	PCR Thermocycler	18
2.8.3	Histologie	18
2.8.4	Elektrophorese	19
2.8.5	Optik	19
2.8.6	Zentrifuge	19
2.8.7	Spektrophotometer	19
2.8.8	Elektroporator	19
2.8.9	Sterilbank/Inkubator/Thermoblock/Wasserbad	19
2.8.10	Mikroinjektion	20
2.8.11	Computer (Hardware)	20
2.8.12	Computer (Software)	20
2.9	Lösungen, Puffer, Medien	20
2.9.1	Immunfärbung	20
2.9.2	Antibiotika	21

2.9.3	Nährmedien . . . . .	21
2.9.4	Oligonukleotide und Konstrukte . . . . .	21
2.10	Präparation und Mikroinjektion der <i>Xenopus laevis</i> Embryonen . . . . .	21
2.10.1	Präparation einer Spermiesuspension aus <i>Xenopus laevis</i> Testis . . . . .	21
2.10.2	Stimulation der Eiablage . . . . .	21
2.10.3	<i>In vitro</i> Fertilisation . . . . .	21
2.10.4	Entfernen der Gallerte, Vitalfärbung und Entwicklung . . . . .	21
2.10.5	Fixierung und Färbung von <i>Xenopus laevis</i> Embryonen . . . . .	22
2.11	Mikromanipulation von <i>Xenopus laevis</i> Embryonen . . . . .	22
2.11.1	Mikroinjektion in <i>Xenopus laevis</i> Embryonen . . . . .	22
2.11.2	Mikroinjektion von induzierbaren Konstrukten in <i>Xenopus laevis</i> Embryonen . . . . .	23
2.11.3	Präparation und Kultivierung von animalen Gewebeexplantaten (animale Kappen) . . . . .	23
2.12	Whole mount <i>in situ</i> Hybridisierung von <i>Xenopus laevis</i> Embryonen . . . . .	23
2.12.1	Rehydrierung der Embryonen . . . . .	24
2.12.2	Proteinase K-Behandlung . . . . .	24
2.12.3	Acetylierung und Refixierung . . . . .	24
2.12.4	Hybridisierung . . . . .	25
2.12.5	Waschschritte . . . . .	25
2.12.6	Antikörper-Inkubation . . . . .	25
2.12.7	Farbentwicklung . . . . .	26
2.12.8	Abstoppen der Färbereaktion und Konservierung der Präparate . . . . .	26
2.13	Immunfärbung an ganzen Embryonen . . . . .	26
2.13.1	Nachweis apoptotischer Zellen durch TUNEL-Analyse . . . . .	26
2.13.2	Nachweis mitotisch aktiver proliferierender Zellen durch Detektion von phosphoryliertem Histon 3 (pH3) . . . . .	27
2.14	Anfertigung von Vibratomschnitten . . . . .	27
2.15	DNA Methoden . . . . .	28
2.15.1	Transformation von Bakterienzellen . . . . .	28
2.15.1.1	Chemische Transformation . . . . .	28
2.15.1.2	Elektrische Transformation . . . . .	28
2.15.2	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen . . . . .	28
2.15.2.1	Präparativer Maßstab, Mini-Präparation . . . . .	28
2.15.2.2	Analytischer Maßstab, Midi-Präparation . . . . .	29
2.15.3	Klonierung . . . . .	29
2.15.3.1	Klonierung von PCR-Fragmenten . . . . .	29
2.15.3.2	Umklonierung von Plasmid-DNA . . . . .	31
2.15.3.3	PCR-vermittelte <i>in vitro</i> -Mutagenese . . . . .	31
2.15.4	Restriktionsverdau . . . . .	31
2.15.5	Reinigung von DNA . . . . .	32
2.15.6	Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	32
2.15.7	Isolierung von PCR-Produkten aus Agarosegelen . . . . .	32
2.15.8	Sequenzierung . . . . .	32
2.16	RNA Methoden . . . . .	33
2.16.1	RNA-Extraktion . . . . .	33
2.16.1.1	Embryonalstadien, Oozyten und animale Gewebeexplantate . . . . .	33
2.16.1.2	Adulte Gewebe und Organe . . . . .	33
2.16.2	Reverse Transkription . . . . .	34
2.16.3	<i>In vitro</i> Synthese von Cap-mRNA für Mikroinjektionen . . . . .	34
2.16.4	<i>In vitro</i> Synthese markierter RNA-Sonden . . . . .	34

2.16.5	Aufreinigung synthetisch hergestellter RNA . . . . .	35
2.16.6	Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA . . . . .	35
2.17	Zellbiologische Methoden . . . . .	35
2.17.1	Kultivierung der Zelllinie . . . . .	35
2.17.2	Transfektion von Plasmid-DNA in HeLa-Zellen . . . . .	35
2.17.3	Ko-Transfektion von Plasmid-DNA in HeLa-Zellen . . . . .	36
2.17.4	Passagieren der Zellen . . . . .	36
2.17.5	Zellyse und Proteinisolation . . . . .	36
2.18	Biochemische Methoden . . . . .	37
2.18.1	<i>In vitro</i> Transkription/Translation . . . . .	37
2.18.2	Proteinbestimmung mit Bradford . . . . .	37
2.18.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	37
2.18.4	Western Blot-Analyse . . . . .	38
2.18.5	Ko-Immunpräzipitation . . . . .	38
2.18.6	Immunfluoreszenz . . . . .	39
2.18.7	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) . . . . .	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> . . . . .	<b>41</b>
3.1	Vergleich der abgeleiteten SREBP2-Proteinsequenzen von <i>Xenopus</i> , Huhn, Ratte, Maus und Mensch . . . . .	41
3.2	Vergleich der abgeleiteten INSIG-Proteinsequenzen von <i>Xenopus</i> , Huhn, Ratte, Maus und Mensch . . . . .	43
3.3	Räumliche und zeitliche Expression von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in <i>Xenopus</i> . . . . .	44
3.4	Einfluss der Inhibition von <i>Xenopus</i> -SREBP2, INSIG1 und INSIG2 auf die Entwicklung . . . . .	47
3.4.1	Inhibierung der Translation endogener RNA mit Hilfe von SREBP2 und INSIG-spezifischen Morpholinos . . . . .	47
3.4.2	Phänotypen nach Suppression der Funktion von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 . . . . .	48
3.4.3	Einfluss des SREBP2 Funktionsverlustes auf die Zellproliferation und Zellapoptose . . . . .	50
3.4.4	Untersuchungen zur Funktion von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in der primären Neurogenese . . . . .	50
3.4.5	Analyse von Gehirn-Markern sowie Markergenen des Notch-Signalweges bei Funktionsverlust von SREBP2, INSIG1 sowie INSIG2 . . . . .	55
3.4.6	Funktion von SREBP2 in der Augenentwicklung . . . . .	57
3.5	Überexpression von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in <i>Xenopus</i> . . . . .	59
3.5.1	Phänotypen durch Überexpression von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 . . . . .	59
3.5.2	Überexpression von induzierbaren SREBP2-Varianten in <i>Xenopus</i> Embryonen . . . . .	61
3.5.3	Einfluss von SREBP2 auf die Zellproliferation und Zellapoptose . . . . .	62
3.6	Untersuchungen zur Wirkung von <i>Xenopus</i> SREBP2 als Transkriptionsaktivator oder Transkriptionsrepressor . . . . .	63
3.7	Suche nach putativen SREBP2-Zielgenen . . . . .	65
3.8	Lokalisation von <i>Xenopus</i> SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in HeLa-Zellen . . . . .	66
3.8.1	Zelluläre Lokalisation von <i>Xenopus</i> SREBP2 . . . . .	67
3.8.1.1	<i>Xenopus</i> SREBP2 kann in HeLa-Zellen prozessiert werden . . . . .	67
3.8.1.2	Der N-terminale Teil von SREBP2 wird in den Zellkern transportiert . . . . .	68
3.8.2	Zelluläre Lokalisation von <i>Xenopus</i> -INSIG . . . . .	71
3.8.2.1	<i>Xenopus</i> INSIG-Proteine sind im Cytoplasma/ER lokalisiert . . . . .	71
3.8.2.2	Versuche zum Nachweis des Dimerisierungsverhalten der INSIG-Proteine mittels Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC) und Immunpräzipitation (IPP) . . . . .	71

3.8.2.3	INSIG ist in der Lage SREBP2 am ER zurückzuhalten . . . . .	74
3.8.3	Die Interaktion von SREBP2 mit INSIG-Proteinen ist Cholesterin-abhängig . . . .	74
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>77</b>
4.1	Sequenzhomologie und Expressionsverhalten von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 . . . . .	77
4.2	Der Einfluss eines SREBP2 sowie INSIG Funktionsverlustes auf <i>Xenopus</i> -Embryonen . . .	79
4.3	Der SREBP2, INSIG1 und INSIG2 Funktionsverlust führt zur Einschränkung der Neuroge- nese und hat im Falle von SREBP2 Einfluss auf Gehirnstrukturen . . . . .	81
4.4	Überexpression von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 . . . . .	83
4.5	Expression von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in HeLa-Zellen . . . . .	85
4.5.1	Lokalisierung und Dimerisierung von SREBP . . . . .	85
4.5.2	Lokalisierung und Dimerisierung von INSIG . . . . .	87
4.6	INSIG1 und INSIG2 Proteine sind in der Lage cholesterinabhängig auch die N-terminale Variante von SREBP2 am ER zurückzuhalten . . . . .	87
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>89</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>91</b>
A.1	Nukleotid- und Aminosäuresequenzen . . . . .	91
A.1.1	Darstellung der Nukleotid- und Aminosäuresequenz von <i>Xenopus</i> SREBP2 . . . . .	91
A.1.2	Darstellung der Nukleotid- und Aminosäuresequenz von <i>Xenopus</i> INSIG1 . . . . .	92
A.1.3	Darstellung der Nukleotid- und Aminosäuresequenz von <i>Xenopus</i> INSIG2 . . . . .	93
A.2	Verwendete Konstrukte . . . . .	93
A.3	Primer . . . . .	95

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Struktur und Funktion von Cholesterin . . . . .	2
1.2	Vereinfachtes Modell von <i>Lipid Rafts</i> in Zellmembranen . . . . .	2
1.3	Vereinfachtes Schema der Cholesterinbiosynthese . . . . .	4
1.4	Domänenstruktur von humanem SREBP2 . . . . .	5
1.5	Domänenstruktur von humanem INSIG1 (A) und INSIG2 (B) . . . . .	6
1.6	Regulation der Cholesterinbiosynthese in Zellen unter hohen und niedrigen Cholesterinbedingungen . . . . .	7
1.7	Modell der 2-Stufen-Prozessierung von SREBP . . . . .	8
1.8	Schematische Darstellung der Neurulation in <i>Xenopus laevis</i> . . . . .	11
1.9	Die Rolle von lateraler Inhibition für die neurale Entwicklung . . . . .	12
1.10	Proneurale Domänen bei <i>Xenopus laevis</i> . . . . .	12
1.11	Die embryonale Entwicklung von <i>Xenopus laevis</i> . . . . .	13
3.1	Homologievergleich sowie Domänenstruktur von <i>Xenopus</i> und humanem SREBP2 . . . . .	41
3.2	Vergleich der Aminosäuresequenzen von <i>Xenopus</i> -SREBP2 und SREBP2 anderer Vertebraten	42
3.3	Domänenstruktur von <i>Xenopus</i> und humanem INSIG1 (A) und INSIG2 (B) . . . . .	43
3.4	Vergleich der Aminosäuresequenzen von <i>Xenopus</i> -INSIG1 und INSIG1 anderer Vertebraten	44
3.5	Vergleich der Aminosäuresequenzen von <i>Xenopus</i> -INSIG2 und INSIG2 anderer Vertebraten	44
3.6	Expression von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in <i>Xenopus</i> -Embryonen . . . . .	45
3.7	RNA Expression von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in Frontalschnitten . . . . .	46
3.8	RNA Expression von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in den <i>Xenopus</i> -Oozytenstadien I–VI	46
3.9	RNA Expression von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in den <i>Xenopus</i> -Embryonalstadien .	47
3.10	RNA Expression von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in adultem Gewebe aus <i>Xenopus laevis</i>	47
3.11	Spezifitätstests der SREBP2, INSIG1 und INSIG2-Morpholinos . . . . .	48
3.12	Durch Funktionsverlust von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 entstandene Hauptphänotypen	49
3.13	Analyse der Apoptose- und Proliferationsrate in SREBP2-MØ injizierten Embryonen . . .	51
3.14	WMISH-Analyse der Expression von Sox3. . . . .	52
3.15	WMISH-Analyse der Expression von Olig3 . . . . .	53
3.16	WMISH-Analyse der Expression von N-Tubulin . . . . .	54
3.17	WMISH-Analyse der Expression von Markergenen des Notch-Signalweges . . . . .	56
3.18	WMISH-Analyse der Expression von En2 und Krox20 . . . . .	57
3.19	WMISH-Analyse der Expression von Pax6, Rx1 sowie Six3 in NF St. 14/15 Embryonen .	58
3.20	WMISH-Analyse der Expression von Pax6, Rx1 sowie Six3 in NF St. 30/36 Embryonen .	59
3.21	Test auf die richtige Proteingröße der für die Überexpressionsstudien verwendeten Konstrukte im gekoppelten Transkriptions- und Translationsassay . . . . .	60
3.22	Statistische Auswertung der Überlebensrate sowie Auswirkungen auf den Phänotyp . . . .	61
3.23	Aufbau und Mechanismus des induzierbaren Systems SREBP2-GR . . . . .	62
3.24	Analyse der Apoptose- und Proliferationsrate in SREBP2 überexprimierenden Embryonen	63
3.25	SREBP2 wirkt als Transkriptionsaktivator . . . . .	64

3.26	SREBP2 wirkt als Transkriptionsaktivator, statistische Auswertung des Phänotyps . . . . .	65
3.27	Effekte von induzierbarem SREBP2-GR auf pluripotente Vorläuferzellen . . . . .	66
3.28	Lokalisation von <i>Xenopus</i> -SREBP2 in transfizierten HeLa-Zellen . . . . .	67
3.29	Interaktionsverhalten unterschiedlich mutierter SREBP2-Proteine im BiFC-Assay . . . . .	69
3.30	Analyse zum Lokalisationsverhalten unterschiedlich mutierter SREBP2-Proteine . . . . .	70
3.31	Lokalisation von INSIG1 und INSIG2 in transfizierten HeLa-Zellen . . . . .	71
3.32	Interaktion der INSIG-Proteine im BiFC-Assay . . . . .	72
3.33	Interaktion der INSIG-Proteine in Co-Immunopräzipitationsstudien . . . . .	73
3.34	SREBP2aa430 wird von den INSIGs am ER lokalisiert . . . . .	74
3.35	Cholesterinabhängige Interaktion von INSIG1 mit dem N-terminalen Anteil von SREBP2 . . . . .	75
4.1	Modellhafte Darstellung des Interaktionsverhaltens unterschiedlicher SREBP2-Varianten und ihre Lokalisation in der Zelle . . . . .	86
A.1	Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens von <i>Xenopus</i> SREBP2 . . . . .	92
A.2	Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens von <i>Xenopus</i> INSIG1 . . . . .	92
A.3	Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens von <i>Xenopus</i> INSIG2 . . . . .	93

# Tabellenverzeichnis

1.1	Enzyme des humanen Cholesterinbiosyntheseweges . . . . .	9
2.1	Liste der Chemikalien . . . . .	15
2.2	Liste der Enzyme . . . . .	17
2.3	Liste der Antikörper . . . . .	17
2.4	Liste der Kits . . . . .	18
2.5	Liste der Mikroliterpipetten . . . . .	18
2.6	Liste der PCR-Geräte . . . . .	18
2.7	Liste der Histologie-Geräte . . . . .	18
2.8	Liste der Elektrophorese-Geräte . . . . .	19
2.9	Liste der optischen Geräte . . . . .	19
2.10	Liste der Zentrifugen . . . . .	19
2.11	Liste der Spektrophotometer . . . . .	19
2.12	Liste der Elektroporatoren . . . . .	19
2.13	Liste der Geräte . . . . .	19
2.14	Liste der Mikroinjektions-Geräte . . . . .	20
2.15	Liste der Hardware . . . . .	20
2.16	Liste der Software . . . . .	20
2.17	Rehydrierung der Embryonen . . . . .	24
2.18	Proteinase K-Behandlung . . . . .	24
2.19	Acetylierung und Refixierung . . . . .	24
2.20	Waschschritte . . . . .	25
2.21	Antikörper-Inkubation . . . . .	25
2.22	Farbentwicklung . . . . .	26
2.26	Zusammensetzung des jeweiligen Transfektionsansatzes . . . . .	36
2.27	Verdünnungen der Antikörper . . . . .	38
2.28	Verdünnungen der Fluoreszenz-markierten Antikörper . . . . .	40
3.1	Vergleich konservierter Domänen von <i>Xenopus</i> , Huhn, Ratte, Maus und Mensch . . . . .	43
A.1	Liste der Konstrukte für whole mount <i>in situ</i> Hybridisierung . . . . .	93
A.2	Liste der pCS2+ Plasmide . . . . .	93
A.3	Liste der pCMV-Sport6 Plasmide . . . . .	94
A.4	Liste der eGFP Plasmide . . . . .	94
A.5	Liste der Cherry Plasmide . . . . .	94
A.6	Liste der pVenus-Transfektionsplasmide . . . . .	94
A.7	Liste der generellen Oligonukleotide . . . . .	95
A.8	Liste der RT-PCR Oligonukleotide . . . . .	95
A.9	Liste der Oligonukleotide für Morpholinos . . . . .	96



# Abkürzungsverzeichnis

## Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lycin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

## Abkürzungen

aa	<i>amino acid</i> , Aminosäure
Abb	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
APB	Alkalische Phosphatase-Puffer
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxidsulfat
$\beta$ -Gal	Galactosidase
bHLH	<i>basic Helix-Loop-Helix</i>
	basisches Helix-Schleifen-Helix Motiv
bHLHZ	<i>basic Helix-Loop-Helix Zipper</i>
	basisches Helix-Schleifen-Helix Reissverschluss-Motiv
BiFC	<i>bimolecular fluorescent complementation</i>
	bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMB	Boehringer Mannheim Blocking Reagenz
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
CHAPS	3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio-1-Propansulphat
cDNA	komplementäre DNA
COPII	<i>coat</i> Protein Komplex II
Cy3	Indocarbocyanin
Cy5	Indodicarbocyanin
Da	Dalton
dest.	destilliert
DAPI	4',6'-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dex	Dexamethason
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin-11-2'-deoxuridin-5'-triphosphat
DHCR7	7-Dehydrocholesterin-Reduktase

ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxy-ribonucleic-acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
E. coli	<i>Echerichia coli</i>
EngR	Repressordomäne des <i>Drosophila engrailed</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	fötale Kälberserum
g	Gravitationskonstante
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GR	Glucocorticoidrezeptor
h	Stunden
hCG	humanes Choriongonadotropin
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA-Reduktase
INSIGs	<i>insulin induced genes</i>
INSIG1	<i>insulin induced gene 1</i>
INSIG2	<i>insulin induced gene 2</i>
kB	kilo Base
kDa	kilo Dalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LDL	<i>low density lipoprotein</i> , Lipoprotein niederer Dichte
LDLR	<i>low density lipoprotein receptor</i>
m	milli
$\mu$	micro
M	Molar (mol/l)
MAB	Maleinsäurepuffer
MBS	modifizierte Bart's-Lösung
MEM	MOPS/EGTA/Magnesiumsulfat
MEMFA	MOPS/EGTA/Magnesiumsulfat/Formaldehyd
min	Minuten
MØ	<i>antisense</i> Morpholino-Oligonukleotide
MOPS	4-Morpholinpropanoschwefelsäure
n	<i>number</i> , Anzahl
NBT	<i>Nitro blue tetrazolium chloride</i>
NF	Stadieneinteilung nach Nieuwkoop und Faber
NICD	intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
ODC1	Ornithindecaboxylase 1
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SCAP	<i>SREBP cleavage activating protein</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Shh	<i>Sonic hedgehog</i>
sog.	sogenannt
SRE	<i>sterol response element</i>
SREBPs	<i>sterol regulatory element binding protein</i>
SREBP2	<i>sterol regulatory element binding protein 2</i>
SSC	Standard Salz-Citrat-Puffer
S1P	<i>site-1 protease</i>
S2P	<i>site-2 protease</i>

St.	Stadium
Tab.	Tabelle
TdT	<i>terminal deoxynucleotide transferase</i> Terminale Deoxynukleotidyltransferase
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP digoxigenin nick end-labeling</i>
U	Unit (Enzymaktivität)
UTR	untranslatierte Region
U/min	Umdrehungen pro Minute
UNIPROT	<i>universal protein resource</i> , Protein-Informationskatalog
UV	ultraviolett
ü. N.	über Nacht
Vol.	Volumen
VP16	Aktivator-domäne
WMISH	whole mount <i>in situ</i> Hybridisierung
WT	Wildtyp
Xbra	<i>Xenopus brachyury</i> Homolog
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-beta-D-Galactopyranosid



# Kapitel 1

## Einleitung

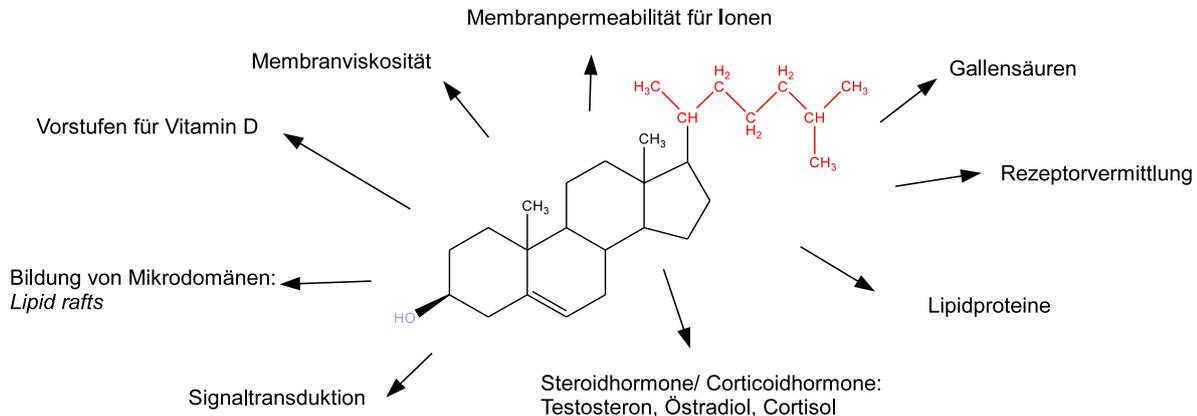
Die Entwicklung eines Organismus aus einer befruchteten Eizelle ist ein umfangreicher Prozess, der vielen komplexen Mechanismen unterliegt. Innerhalb dieses Entwicklungszeitraumes können Veränderungen im Lipidmetabolismus während der Organogenese zu einer abnormalen Entwicklung und angeborenen Defekten führen. Forscher entdeckten in den 1990er Jahren an Feten, die Cholesterin nur in geringen Mengen synthetisieren, eine Vielzahl von angeborenen Defekten. Sie stellten weiterhin fest, dass gerade der sich entwickelnde Embryo viel Cholesterin benötigt und seine Sterolsyntheserate verglichen mit dem adulten Organismus um ein Vielfaches erhöht ist (Dietschy *et al.*, 1993). Kommt es zu Mutationen an Komponenten des Cholesterinsyntheseweges, zeigen die Embryonen reproduzierbare Auswirkungen. Beispielsweise führt eine verminderte Enzymtätigkeit von DHCR7, das letzte Enzym bei der Umwandlung von 7-Dehydrocholesterin in Cholesterin, zum Smith-Lemli-Opitz-Syndrom. Dabei handelt es sich um ein angeborenes Fehlbildungs-Retardierungssyndrom, welches biochemisch mit verringerten Cholesterinwerten und erhöhten 7-Dehydrocholesterin-Werten einhergeht. Über die Rolle von Cholesterin und den Komponenten des Cholesterinsyntheseweges in der Embryonalentwicklung ist wenig bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Gene SREBP2, INSIG1 und INSIG2 analysiert und charakterisiert. Dabei stand weniger die Funktion dieser Proteine in der Regulation der Cholesterinbiosynthese im Vordergrund, da diese gut charakterisiert ist. Das Augenmerk richtet sich vielmehr auf die entwicklungsbiologische Rolle von SREBP2 und ferner INSIG1 und INSIG2 in Embryonen des Krallenfrosches *Xenopus laevis*.

### 1.1 Cholesterin

M. Poulletier de La Salles beschrieb 1769 erstmalig ein „Fettwachs“. Aber erst Michel Eugène Chevreul isolierte 1815 diese Substanz aus menschlicher und tierischer Galle und stellte fest, dass sich das Fett nicht verseifen ließ. Er benannte es Cholesterin, welches sich aus den Wörtern „chol“ (Galle) und „sterin“ (Wachs) zusammensetzt. Die exakte Formel für Cholesterin ( $C_{27}H_{46}O$ ) wurde 1880 von Reinitzer vorgeschlagen und die chemische Identifizierung gelang Windhaus, wofür er 1928 einen Nobelpreis erhielt. Dieses Molekül übt immer noch eine große Faszination auf Forscher unterschiedlichster naturwissenschaftlicher und medizinischer Disziplinen aus. Bis heute wurden 13 Nobelpreise für die Erforschung dieses kleinen Moleküls verliehen (Kramer, 2005).

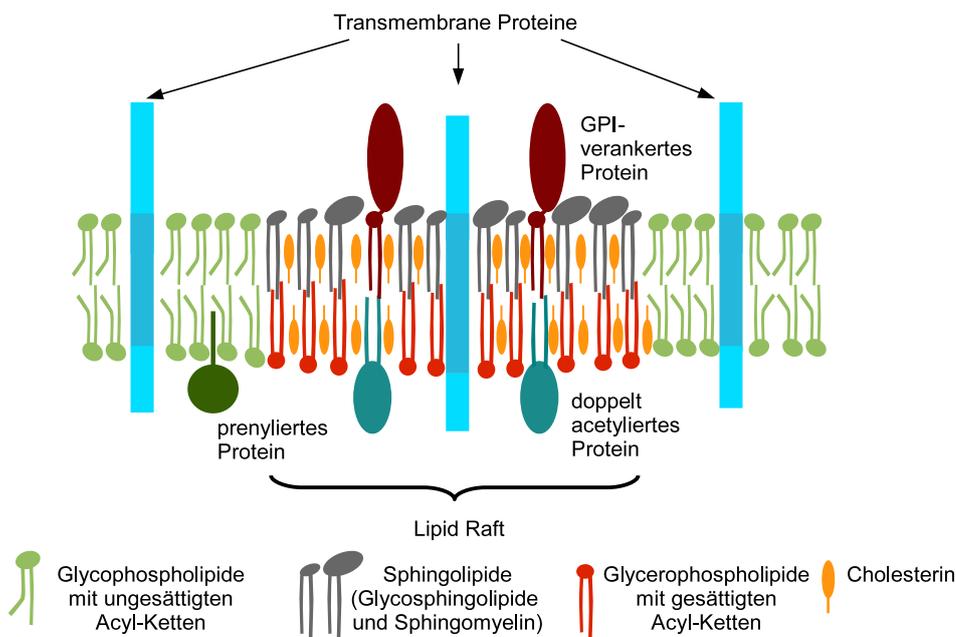
Pflanzen enthalten kein Cholesterin, besitzen aber cholesterinverwandte Steroide – die Phytosterine. In tierischen Zellen kommt Cholesterin frei oder in Form von Estern mit ungesättigten bzw. gesättigten langkettigen Fettsäuren und als Schwefelsäurehalbestoff vor. Als lebenswichtiges Molekül ist Cholesterin essenzieller Bestandteil eukaryontischer Membranen. Mehr als 80 % des zellulären unveresterten Pools von Cholesterin befinden sich in Plasmamembranen (Hoekstra & van Ijendoorn, 2000). Das Cholesterinmolekül besteht aus drei Teilen (Abbildung 1.1): einem starren lipophilen Steroidgerüst, wodurch es sich in der Lipiddoppelschicht bewegen kann; einer polaren Hydroxygruppe, welche an unterschiedlichen Esterifikationen beteiligt ist; sowie einem unpolaren Kohlenwasserstoffrest, der Oxidationsprozessen unterliegen kann.

Chemisch wird Cholesterin zu den polyzyklischen Alkoholen gerechnet. Aufgrund seiner 3 $\beta$ -Hydroxygruppe an einem und einer flexiblen Kohlenwasserstoffkette am anderen Ende des Steroidgerüsts ist es in der Lage, die physikalischen Eigenschaften von Membranen zu beeinflussen (Yeagle, 1989). Dadurch trägt es entscheidend zur Membranstabilität und -viskosität bei. Zusätzlich erhöht Cholesterin die Dicke von Lipiddoppelschichten und hat einen kondensierenden Effekt auf sie (Yeagle, 1985). Cholesterin ist auch Vorläufer von Steroidhormonen, Gallensäuren (Chang *et al.*, 2006) und als Vorstufe an der Bildung von Geschlechtshormonen wie Testosteron, Östradiol, Progesteron sowie der Nebennierenhormone Cortisol und Aldosteron beteiligt (Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1: Struktur und Funktion von Cholesterin.** Die molekulare Formel für Cholesterin ist C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O. Das Cholesterinmolekül besteht aus einer flexiblen Kohlenwasserstoffkette (aliphatischer Rest, rot), einem starren Steroidgerüst bestehend aus vier Ringen (schwarz) und einer polaren 3 $\beta$ -Hydroxygruppe (blau).

Durch *Lipid Rafts* (Lipid-Flöße) ist Cholesterin außerdem in der Signaltransduktion involviert, denn diese Mikrodomänen sind Zentren für Rezeptoren und dienen unter anderem als Andockstelle für Proteine an die Membran (Simons & van Meer, 1988). Als *Lipid Rafts* werden cholesterinreiche laterale Mikrodomänen in Zellmembranen bezeichnet (Simons & Ikonen, 1997). Sie verdanken ihren Namen der Eigenschaft, wie Flöße auf der Lipidmembran zu schwimmen (Abbildung 1.2).



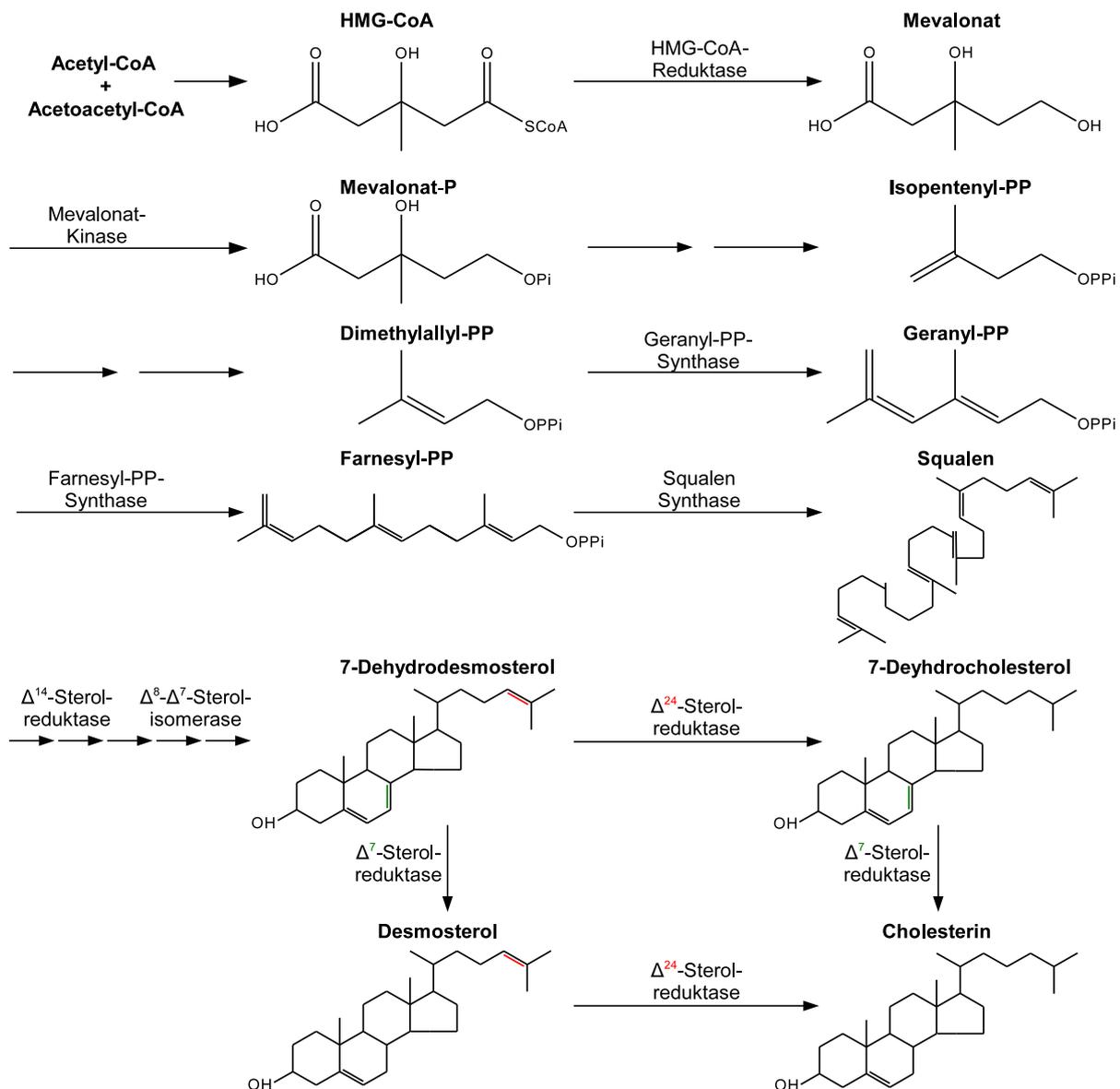
**Abbildung 1.2: Vereinfachtes Modell von Lipid Rafts in Zellmembranen.** Die Phospholipide (grün und rot) und Cholesterin (orange) sind in beiden Membranteilen, während die Sphingolipide (grau) im äußeren Teil des Bilayers angeordnet sind. Die Acyl-Ketten des *Lipid Rafts* sind lang und gesättigt (grau und rot), während außerhalb des *Lipid Rafts* kürzer und einzelne bzw. mehrere ungesättigte Acyl-ketten (grün) dominieren. *Lipid Rafts* besitzen doppelt-acetylierte (türkis-blau) und prenylierte (dunkelgrün) Proteine, während transmembrane (hellblau) und prenylierte (dunkelgrün) Proteine meistens nicht *Lipid Raft* assoziiert sind. Abbildung modifiziert nach Waheed & Freed, 2009.

In den *Lipid Rafts* reichern sich Cholesterin, Glycolipide und Sphingolipide (Thomas *et al.*, 2004; Korade & Kenworthy, 2008) so an, dass sie zwar noch beweglich aber mehr geordnet und dichter gepackt als die umliegende Doppelschicht sind (Simons & Ehehalt, 2002). Cholesterin fungiert dabei als Abstandhalter zwischen den Wasserstoffketten der Sphingolipide und wirkt quasi als dynamischer Klebstoff, der den *Lipid Raft* zusammenhält (Simons & Ehehalt, 2002). Wesentliche *Lipid Raft* Proteine sind Glycophosphatidylinositol-verankerte (GPI-verankerte), doppelt acetylierte, Cholesterin-verknüpfte und Palmitat-verankerte sowie transmembrane Proteine (Simons & Ehehalt, 2002).

## 1.2 Bereitstellung von Cholesterin in der Zelle

Cholesterin kann prinzipiell von jeder Zelle synthetisiert werden. Die Hauptbildungsorte im menschlichen Organismus sind die Leber und die Darmschleimhaut. Der menschliche Körper enthält etwa 150 g Cholesterin. Dabei wird in der Zelle der aktive Vorrat an Cholesterin über zwei Quellen abgedeckt: etwa 0,8–1 g werden im menschlichen Organismus über die *de novo* Synthese aus Acetyl-CoA synthetisiert und weitere 0,6–0,8 g je nach Nahrungszusammensetzung von außen zugeführt (Dettmer *et al.*, 2005). Ein Großteil der Zellen ist in der Lage, beide Prozesse parallel ablaufen zu lassen. Die Zellen können allerdings das synthetisierte Cholesterin nicht abbauen, sodass der Körper versucht Cholesterin zu eliminieren. Eine Möglichkeit der Ausscheidung von Cholesterin erfolgt über die Galle in den Darm, wobei Cholesterin selbst als auch sein Stoffwechselprodukt, die Gallensäuren, dorthin ausgeschieden werden. Ein Teil dieses mit der Galle in den Darm ausgeschiedene Cholesterin wird zum Teil wieder in den Körper aufgenommen. Des Weiteren können Steroidhormone gebildet und ihre Abbauprodukte anschließend renal ausgeschieden werden. Weiterhin erfolgt die Ausscheidung über die natürliche Zellmauserung von Haut und intestinalen Epithelien (Dettmer *et al.*, 2005).

Die Gewinnung von Cholesterin über die *de novo* Synthese ist von besonderer Bedeutung (Abbildung 1.3). Die Ausgangssubstanz für die Synthese ist die aktivierte Essigsäure Acetyl-CoA. Sie wird zu Acetoacetyl-CoA und später zu  $\beta$ -Hydroxymethylglutaryl-CoA ( $\beta$ -HMG-CoA) metabolisiert. In weiteren Stoffwechselschritten wird dieses Molekül zu Mevalonat reduziert und zu den aktivierten Isopren-Derivaten Isopentenyl-Pyrophosphat und Dimethylallyl-Pyrophosphat umgewandelt. Weitere Zwischenprodukte sind Geranyl- und Farnesyl-Pyrophosphat, welche die zyklische Struktur des Squalens bilden. Nach dem Ringschluss folgen mehrere enzymatische Reaktionen, bis schließlich Cholesterin entsteht. Aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften befinden sich über 95 % des Cholesterins innerhalb der Zellen. Für den Transport in der Blutbahn wird es an Lipoproteine gebunden. Diese können von unterschiedlicher Dichte sein und werden in Chylomikronen, VLDL, IDL, LDL, HDL und Lipoprotein (A) unterteilt.



**Abbildung 1.3: Vereinfachtes Schema der Cholesterinbiosynthese.** Endogenes Cholesterin wird aus Acetyl-CoA synthetisiert. Die Schritte von Mevalonat bis Farnesyldiphosphat finden in den Peroxisomen statt. Die restliche Synthese bis zum Cholesterin wird in ER-Membranen vollzogen. Insgesamt sind 30 Enzyme an der Synthese beteiligt. Anschließend wird Cholesterin zur Hormonsynthese in die Mitochondrien transportiert. Abbildung modifiziert nach Hollemann, 2007.

## 1.3 Regulation der Cholesterinbiosynthese auf transkriptioneller Ebene

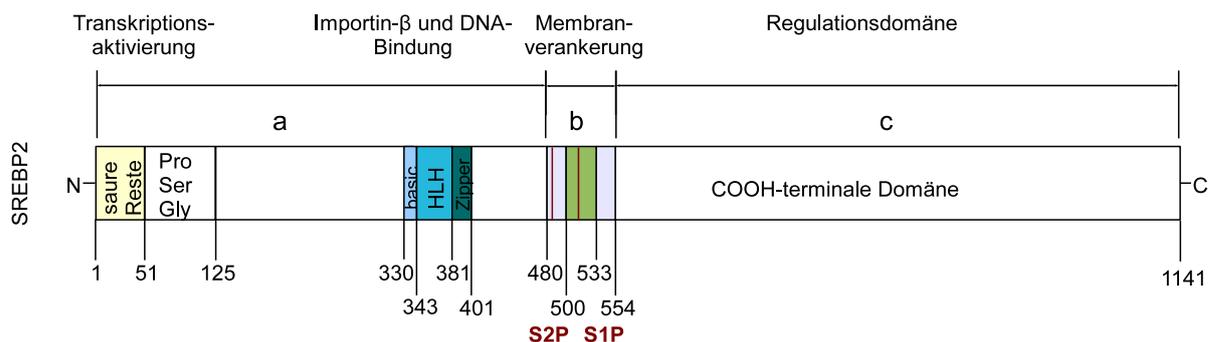
### 1.3.1 *sterol regulatory element binding proteins* – SREBPs

Die Regulation des Cholesterinspiegels erfolgt in der Zelle über einen streng regulierten Feedbackmechanismus (Turley *et al.*, 1988), der über das Zusammenspiel verschiedener Faktoren ermöglicht wird. Eine entscheidende Rolle spielen dabei die zur Familie der bHLHZ (*basic Helix-Loop-Helix Zipper*)-Transkriptionsfaktoren gehörigen SREBPs (*sterol regulatory element binding proteins*), welche die Cholesterinbiosynthese auf transkriptioneller Ebene steuern. Sie unterscheiden sich von anderen bHLHZ Proteinen dadurch, dass sie als inaktive Vorläufer synthetisiert und am ER gebunden vorliegen (Brown & Goldstein, 1997; Goldstein *et al.*, 2002). SREBPs wurden erstmalig durch Wang *et al.*, 1993 und Briggs *et al.*, 1993 beschrieben. Alle sequenzierten vielzelligen Tiere (Metazoa) besitzen SREBP-Homologe, wodurch eine feste Zuordnung getroffen werden kann. Chordaten-Genome besitzen zwei SREBP-Homologe, während

Invertebraten nur ein SREBP-Homolog aufweisen (Rawson, 2003). Rawson begründet es damit, dass Invertebraten (*Drosophila* und *Caenorhabditis elegans*) Sterine nicht *de novo* synthetisieren können und daher nur ein Homolog benötigen (Rawson, 2003).

Die zwei separaten Gene des Säugetiergenoms codieren für drei unterschiedliche SREBP-Isoformen: SREBP1a, SREBP1c und SREBP2. SREBP1a und SREBP1c unterscheiden sich in ihrem ersten Exon, wodurch sie unterschiedliche Translationsstart-Stellen im SREBP1-Gen ermöglichen (Horton *et al.*, 2002). Die dominanten Isoformen in der tierischen Leber sind allerdings SREBP1c und SREBP2. Die SREBP Gene teilen zwar eine 80 %ige Identität in ihrer DNA-bindenden Domäne, haben aber unterschiedliche Zielgene. SREBP1c reguliert hauptsächlich Gene der Fettsäuresynthese, während SREBP2 vor allem bei der Cholesterinbiosynthese eine entscheidende Rolle spielt. Bekannt ist, dass SREBPs die Transkription von mehr als 30 Genen des Cholesterin-, Fettsäure-, Triglyzerid- und des Phospholipidstoffwechsels steuern (Brown *et al.*, 1999; Osborne, 2000; Horton *et al.*, 2003).

In der Zelle wird SREBP (mit einer Molekularmasse von  $\sim 120$  kDa) an der Membran des ER synthetisiert und liegt dort als inaktiver Vorläufer vor. Es besteht aus drei Domänen (Abbildung 1.4): (a) einer NH<sub>2</sub>-terminalen Domäne mit der bHLHZ-Region; (b) zwei hydrophoben, transmembran durchziehenden Segmenten, die durch eine kurze Schleife (*Loop*) unterbrochen sind, welche in das Lumen des ER ragt; und (c) einer COOH-terminalen Domäne, die essenziell für die regulatorische Funktion von SREBP ist. So wird über dieser C-terminalen Domäne die Bindung an SCAP (SREBP *cleavage activating protein*) ermöglicht, den Sterolsensor des Systems (Brown & Goldstein, 1997; Sakai *et al.*, 1997). SREBPs weisen eine Haarnadelstruktur auf, sodass sich sowohl die N- als auch die C-terminale Domäne im Cytoplasma befindet (Abbildung 1.7).



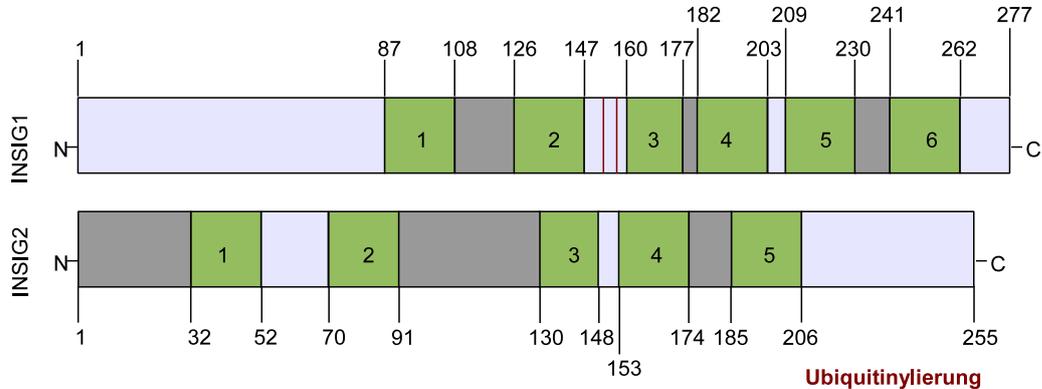
**Abbildung 1.4: Domänenstruktur von humanem SREBP2.** SREBP2 besitzt drei Domänen. Die erste Domäne ist durch (a) N-terminal säurehaltige Aminosäuren (aa1–51) gekennzeichnet, sowie den Bereich des bHLHZ, der für das Importin- $\beta$ -Signal und die DNA-Bindung notwendig ist. Die zweite Domäne (b) enthält zwei hydrophobe Membran-durchziehende Segmente (grau), die für die Membranverankerung notwendig sind. Die dritte Domäne (c) die sog. COOH-Domäne ist für die regulatorische Funktion von SREBP2 essenziell. Mit roten Linien ist die Erkennungsstelle der S1 und S2-Protease markiert.

### 1.3.2 *insulin induced genes* – INSIGs

Weitere wichtige Faktoren für die Steuerung der Cholesterinbiosynthese sind die zur INSIG (*insulin induced genes*)-Familie gehörigen INSIGs (Yang *et al.*, 2002; Yabe *et al.*, 2002a). Sie verdanken ihren Namen der Tatsache, dass ihre Transkription durch Insulin in hepatischen Zellen stark angeregt werden kann (Peng *et al.*, 1997). Obwohl INSIG-Homologe während der Evolution in allen Vertebraten vorhanden sind, wurden interessanterweise bisher keine bei den Invertebraten *Drosophila* und im *Caenorhabditis*-Genom entdeckt. Als kleine Proteine (Molekularmasse von humanem INSIG1  $\sim 25$  kDa und von INSIG2  $\sim 30$  kDa) sind INSIGs durch 6 Membranhelices in der ER-Membran verankert (Abbildung 1.5; Feramisco *et al.*, 2004). Die Membrandomänen von humanem INSIG1 und INSIG2 sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 85 % identisch (Lee & DeBose-Boyd, 2010) und leisten ähnliche Aufgaben in der Regulation der Cholesterin-Homöostase (Yabe *et al.*, 2002a). So verhindern sie bei Cholesterinüberschuss in der Zelle die Prozessierung von SREBPs und somit die Transkription von SREBP-Zielgenen, die für die Cholesterinbiosynthese entscheidend sind.

Außerdem bewirken die INSIGs Sterol-abhängig die Degradation des Biosynthese-Schrittmacherenzym HMG-CoA-Reduktase (Espenshade & Hughes, 2007).

INSIG1 und INSIG2 unterscheiden sich in zwei Punkten. Erstens ist INSIG1 nicht aber INSIG2 in Säugerzellen Zielgen von SREBP. Zweitens ist INSIG1 auch in Abwesenheit von Sterinen in der Lage den SREBP/SCAP-Komplex am ER zurückzuhalten, wenn es in hohen Konzentrationen exprimiert wird (Yang *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu benötigt INSIG2 Sterole (Yabe *et al.*, 2002a).



**Abbildung 1.5: Domänenstruktur von humanem INSIG1 (A) und INSIG2 (B).** Die einzelnen Domänen wurden farblich wie folgt unterlegt: grün = helikale Inter-ER-Membran, grau = ER-Lumen, hellgrau = Cytoplasma, rote Linien = Ubiquitynylierung. Quelle auf Grundlage von UNIPROT.

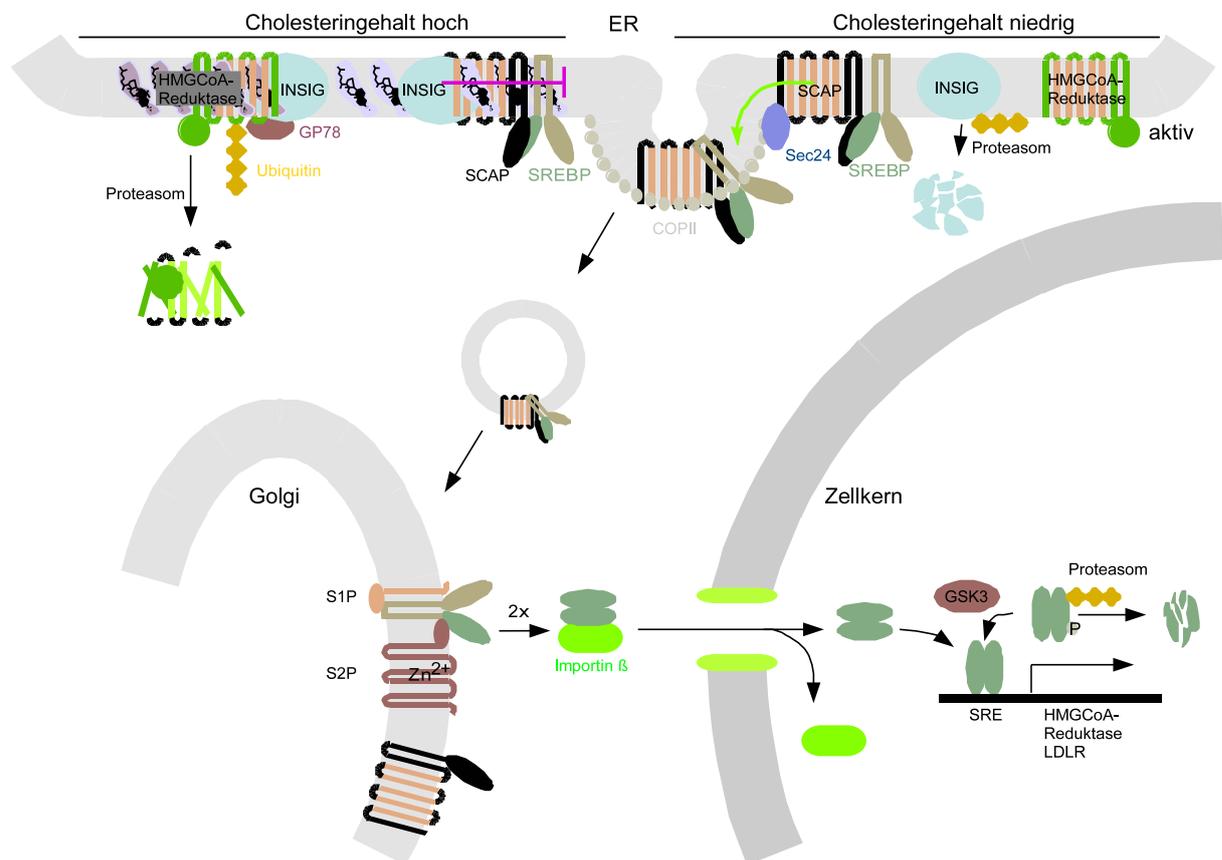
### 1.3.3 Regulation der Cholesterinbiosynthese

Die ständige Aufnahme und Abgabe von Sterolen durch Endo- und Exozytose sowie die intrazelluläre Verteilung von Cholesterin auf Organellen, Membransubdomänen und Einzelschichten der Doppelmembranen setzt ein hochdynamisches und streng reguliertes System voraus. Wesentliche Pionierarbeiten bei der Erforschung der Regulation der Cholesterinbiosynthese im menschlichen Organismus wurden durch Michael Braun und Joseph Goldstein geleistet, wofür sie 1985 den Nobelpreis erhielten.

In tierischen Zellen wird der zelluläre Cholesterinspiegel durch die Transkriptionsfaktoren LXR (*Liver X Receptor*) und SREBPs kontrolliert (Brown *et al.*, 1999). SREBPs binden kurz nach ihrer Synthese an der ER-Membran an SCAP. Die Bindung der beiden Proteine erfolgt dabei über die COOH-terminale regulatorische Domäne von SREBP an die COOH-terminale WD-repeat Region von SCAP (Sakai *et al.*, 1997). Dadurch entsteht ein sog. SREBP/SCAP-Komplex. SCAP fungiert in diesem System unter anderem als Sterolsensor, der auf sich verändernde Sterolkonzentrationen in der Zelle reagiert (Goldstein *et al.*, 2002). SCAP-Proteine besitzen zwei definierte Regionen: (1) N-terminal 8 Transmembransegmente, welche zwischen der Helix 2-6 die Sterin-sensitive Domäne (sterol sensing domain, SSD) beinhalten (Hua *et al.*, 1996; Nohturfft *et al.*, 1998a) und (2) C-terminal multiple WD repeats, welche die SREBP-SCAP Bindung vermitteln (Sakai *et al.*, 1997; Nohturfft *et al.*, 1998a; Nohturfft *et al.*, 1998a). Studien zeigen, dass die Bildung des SREBP/SCAP-Komplexes für den Regulationsmechanismus von sehr hoher Bedeutung ist. So führen Mutationen (Y298C, L315F, D443N) in der SSD-Domäne von SCAP zur Sterolresistenz (Hua *et al.*, 1996; Nohturfft *et al.*, 1998a; Yabe *et al.*, 2002b). Das heißt, diese mutierten SCAPs sind nicht mehr in der Lage unter Sterol-induzierten Bedingungen an INSIG-Proteine zu binden (Yabe *et al.*, 2002b).

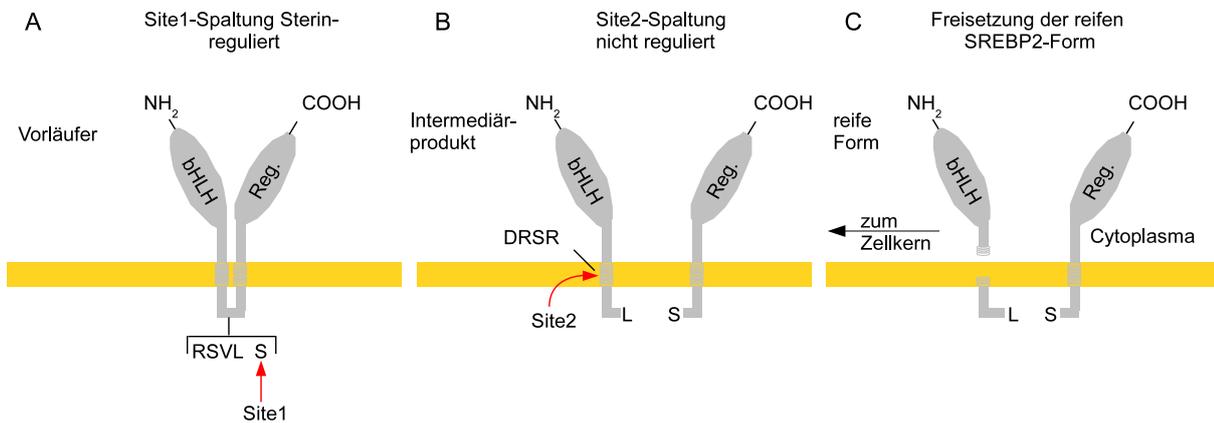
SCAP fungiert aber nicht nur als Sterinsensor. Es ist außerdem in der Lage unter Sterol-reduzierten Zellbedingungen (Abbildung 1.6, rechts), die SREBPs in COPII-Vesikeln zum Golgi-Apparat zu eskortieren (Nohturfft *et al.*, 2000; Espenshade *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2005) (Abbildung 1.6). Dieser Transport wird durch Sec23/24 vermittelt, welches die Hexapeptid-Sequenz MELADL innerhalb der cytoplasmatischen Schleife zwischen Transmembran Helix 6 und 7 von SCAP erkennt (Espenshade *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2005). Nach Fusionierung des SCAP/SREBP Komplexes am Golgi-Apparat (Lee *et al.*, 2004) erfolgt in einem 2-Stufen-Prozess die Sterin-regulierte Prozessierung von SREBP durch zwei membrangebundene Proteasen (Wang *et al.*, 1994; Hua *et al.*, 1996b; Sakai *et al.*, 1996) (Abbildung 1.7). Im ersten Schritt

spaltet die Serin-Protease Site1 der Subtilisin-Familie (Espenshade *et al.*, 1999), die Verbindung Leu-Ser in der Mitte der lumenalen Schleife von SREBP (Duncan *et al.*, 1997; Sakai *et al.*, 1996). Erst nach dieser Spaltung von SREBP kann die zweite hydrophobe Protease Zn<sup>2+</sup> Site2 Metalloprotease (Zelenski *et al.*, 1999) wirken. Sie erkennt die Sequenz DRSR von SREBP (Sakai *et al.*, 1996) und spaltet in der Mitte des ersten Transmembransegments (Sakai *et al.*, 1996). Das führt zur Freisetzung des N-terminalen SREBP-Anteils in das Cytoplasma (Rawson, 2003; Sakai *et al.*, 1998). Da SREBPs kein klassisches Kernlokalisierungssignal besitzen (*nuclear localisation signal*, NLS), wird der Transport in den Kern über Importin- $\beta$  vermittelt (Lee *et al.*, 2003). Im Zellkern binden SREBPs spezifisch an E-Box Elemente (5'-CANNTG-3', wobei N für jede beliebige Base steht) in den Promotoren von Zielgenen. Zusätzlich sind SREBPs noch in der Lage, an SRE-Elemente (*sterol regulatory elements*) mit der Konsensussequenz 5'-TCACNCCAC-3' (N = jede beliebige Base) zu binden. SRE-Elemente sind in zahlreichen Promotoren von Genen des Lipidstoffwechsels vorhanden (Kim *et al.*, 1995). Auch die Promotorregionen von SREBP1 und SREBP2 besitzen jeweils ein SRE-Element, wodurch sie ihre eigene Transkription induzieren können (Sato *et al.*, 1996). SREBPs aktivieren Gene, welche die Synthese und Aufnahme von Cholesterin und ungesättigten Fettsäuren in tierischen Zellen kontrollieren (Brown *et al.*, 1999).



**Abbildung 1.6: Regulation der Cholesterinbiosynthese in Zellen unter hohen und niedrigen Cholesterinbedingungen.** Hohe Cholesterinbedingungen in der Zelle (links): Bindung von INSIGs an den SREBP/SCAP-Komplex und Rückhaltung am ER. Außerdem Aktivierung der Sterin-abhängigen Degradierung der HMGR (HMGC<sub>o</sub>A-Reduktase) durch INSIGs. Diese Degradierung setzt die Bindung der INSIGs an die Transmembranregion der HMGR voraus, wodurch INSIGs die Ubiquitin-Ligase (GP78) rekrutieren. Die Ubiquitinierung führt zur Erkennung durch das Proteasom, welches daraufhin die HMGR degradiert. Unter niedrigen Cholesterinbedingungen in der Zelle (rechts): Transport des SREBP/SCAP-Komplexes in COPII Vesikeln zum Golgi, vermittelt durch Sec-Proteine (Sec23/24). Am Golgi-Apparat Prozessierung von SREBP in einem 2-Stufen-Prozess durch die Proteasen Site1 (S1P) und anschließend durch die Zn<sup>2+</sup> Metalloprotease Site2 (S2P). Freisetzung des transkriptionsaktiven Teiles von SREBP in das Cytoplasma und Verpackung als Dimer (2x). Anschließend Kerntransport durch Importin- $\beta$ . Im Zellkern Bindung von SREBP an SRE-Elemente von Zielgenen (z. B. HMGC<sub>o</sub>A-Reduktase, LDLR) und Anschließung von deren Transkription. Nukleares SREBP ist hochgradig instabil. Seine Ubiquitinierung und anschließende Degradierung wird durch GSK3 vermittelt. Abbildung modifiziert nach Hollemann, 2007.

Herrscht in der Zelle ein Überschuss an Sterolen (Abbildung 1.6, links), dann unterzieht sich SCAP einer Konformationsänderung die durch seine SSD-Domäne vermittelt wird (Brown *et al.*, 2002). Das führt dazu, dass INSIG-Proteine an den SCAP/SREBP Komplex binden und diesen am ER zurückhalten. Somit wird die Beladung von SREBP/SCAP auf COPII Vesikel verhindert (Adams *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2005). Eine Prozessierung am Golgi-Apparat kann nicht stattfinden (Debose-Boyd *et al.*, 1999; Brown & Goldstein, 1997; Sakai *et al.*, 1997). Die reifen, im Zellkern befindlichen SREBPs werden ubiquitinyliert und über das 26S Proteasom degradiert (Hirano *et al.*, 2001). Damit kommt es nicht zur Aktivierung von SREBP Ziel-Genen im Zellkern (Goldstein *et al.*, 2002; Debose-Boyd *et al.*, 1999; Nohturfft *et al.*, 2000).



**Abbildung 1.7: Modell der 2-Stufen-Prozessierung von SREBP.** (A) Sterin-regulierte Spaltung durch Site1-Protease zwischen Leucin und Serin in der Sequenz RSVLS; dadurch Aufbruch der kovalenten Bindung zwischen den beiden Transmembranhelices; beide Hälften bleiben mit der Membran verbunden; (B) Daraufhin Spaltung durch Site2-Protease innerhalb der ersten Transmembranhelix (abhängig von Sequenz DRSR); Spaltung ist nicht Sterin-reguliert, erfordert aber vorherige Spaltung durch Site1; (C) Entlassung des N-terminalen transkriptionsaktiven Teiles von SREBP in den Zellkern. Abbildung modifiziert nach Brown & Goldstein, 1997.

## 1.4 Cholesterin im Embryo und Fehlregulation der Biosynthese

Die Regulation der fötalen Cholesterinbiosynthese ist bisher wenig untersucht. Bekannt ist aber, dass Cholesterin für die Entwicklung, Funktion und Aufrechterhaltung des Zentralnervensystems notwendig ist. Das sich entwickelnde Gehirn benötigt gerade für die Myelinisierung viel Cholesterin (Turley *et al.*, 1996; Turley *et al.*, 1998), sodass während dieses Entwicklungsprozesses eine hohe Cholesterinsyntheserate verzeichnet werden kann (Cavender *et al.*, 1995). Beim Mensch ist das Gehirn aufgrund der Blut-Hirn-Schranke nicht in der Lage im Blut transportiertes Cholesterin zu nutzen, sodass es das benötigte Cholesterin selbst *de novo* synthetisieren muss. Somit wird der größte Teil des Bedarfes an Cholesterin im Embryo über die *de novo* Synthese abgedeckt (Belknap & Dietschy, 1988; Woollett, 1996; Jurevics *et al.*, 1997).

Cholesterin hat ein umfassendes Wirkungsspektrum, sodass seine Fehlregulation zu ernsthaften Störungen des biologischen Gleichgewichtes führen würde. Die Komponenten der Cholesterinbiosynthese und damit im Zusammenhang stehende genetische Defekte wurden durch Funktionsverluststudien mit Maus-Modellen, spontane Mutationen im humanen System und durch Applikation von spezifischen Inhibitoren erforscht (Tabelle 1.1). So zeigte sich, dass im menschlichen Fötus Defekte im Cholesterinbiosyntheseweg unter anderem zu vermindertem Wachstum, eingeschränkter Differenzierung des Gehirns bis hin zu mentaler Retardierung führen können (Chen & Salen, 1994). Die genetischen Defekte in Enzymen unterschiedlicher Individuen zeigten vergleichsweise heterogene Phänotypen (Hennekam, 2005; Herman, 2003), die nahelegen, dass Fehlfunktionen des Biosyntheseweges potenziell teratogen sind (Herman, 2003; Waterham, 2006; Yu & Patel, 2005). Bei Mutationen der Mevalonat-Kinase (Mevalonazidurie; Mandey *et al.*, 2006) und der 7-Dehydrocholesterin-Reduktase (Smith-Lemli-Opitz-Syndrom; Yu & Patel, 2005) konnte häufig eine Trübung der Linse festgestellt werden. Ebenso traten auch Missbildungen der embryonalen Mittellinie auf, die aus Mutationen oder durch Mangel der 7DHCR (Kolf-Clauw *et al.*, 1996; Wassif *et al.*, 2001),

Lanosterol-Reduktase (OMIM 600909; Mori *et al.*, 2006; Roessler *et al.*, 1999) oder Squalen-Synthase (OMIM 194420; Tozawa *et al.*, 1999) resultierten.

**Tabelle 1.1:** Enzyme des humanen Cholesterinbiosyntheseweges und ihre Auswirkungen bei Fehlregulation im menschlichen Organismus. Bei den klinischen Eigenschaften sind exemplarische Beispiele erfasst.

humanes Enzym	humanes Gen	Gen-Locus	Erkrankung	OMIM-Nr.	klinische Eigenschaften
3 $\beta$ -Hydroxysteroid- $\Delta^24$ -Reduktase	DHCR24	1p31.1-1p33	Desmosterolose	603398, 606418	Retardation, Gesichtsdysmorphie, Mikrozephalie
3 $\beta$ -Hydroxysteroid- $\Delta^7$ -Reduktase	DHCR7	11q13	Smith-Lemli-Opitz-Syndrom (SLOS)	270400, 268670, 602858	ZNS-Missbildung, Holoprosenzephalie, Retardation
3 $\beta$ -Hydroxysteroid- $\Delta^5$ -desaturase	SC5DL	11q23	Lathosterolose	607330, 602286	Dysmorphie im Gesicht, Retardation
3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase	NSDHL	Xq28	CHILD-Syndrom	308050, 300275	Dysmorphie im Gesicht, meist normale Intelligenz, Minderwuchs
Mevalonat Kinase	MVK	12q24	Mevalonatkinase-Mangel, Hyperimmunoglobulinämie	610377	Enzephalopathie Retardation, grauer Star

Bisher ist zwar noch wenig über den Zusammenhang zwischen Cholesterin und embryonaler Entwicklung bekannt, allerdings scheinen die Mitglieder der Hedgehog-Proteinfamilie von großer Bedeutung zu sein. Studien zeigen, dass angeborene Fehler in der Cholesterinbiosynthese den gleichen Holoprosenzephalie-Phänotyp aufweisen, wie Mutationen im Shh (*Sonic hedgehog*)-Signalweg. Cholesterin wird kovalent an Mitglieder der Hedgehog-Proteinfamilie gebunden. Diese Hedgehog-Proteine bauen im Gewebe einen Konzentrationsgradienten auf. Innerhalb dieses Gradienten sind sie in der Lage ihre Zielgene konzentrationsabhängig zu aktivieren oder zu reprimieren. Beispielsweise baut Shh unter anderem im sich entwickelnden Vertebraten Nervensystem dosisabhängig verschiedene Zelltypen entlang der dorso-ventralen Achse des Neuralrohres auf, indem es Regionen mit spezifischen Transkriptionsfaktoren wie Nkx, Pax und Dbx-Familienmitgliedern etabliert (Ho & Scott., 2002; Ho *et al.*, 2002). Diese wirken an der Spezifizierung der neuralen Identität mit, indem sie zur Proliferation und Differenzierung von neuronalen und nicht-neuronalen Zelltypen beitragen. Mutationen im Shh-Gen können bei Menschen und Mäusen zu Holoprosenzephalie führen. Dabei handelt es sich um einen Gehirndefekt, der darauf zurückzuführen ist, dass sich der embryonale Vorderhirnventrikel nicht in die beiden Großhirnhemisphären teilt.

Tadjuidje und Hollemann zeigten an Studien der 7-Dehydrocholesterin-Reduktase (Tadjuidje & Hollemann, 2006), einem wichtigen Enzym der Cholesterinbiosynthese, dass die primäre Neurogenese und die Cholesterinsynthese stark miteinander verknüpft sind. Die 7-Dehydrocholesterin-Reduktase zeigte in diesen Untersuchungen ein auf die Neurulation beschränktes Expressionsmuster und die durchgeführten Funktionsverlust- und Funktionsgewinnstudien lassen vermuten, dass für eine geregelte neuronale Entwicklung eine strikte Kontrolle der *de novo* Cholesterinbiosynthese unerlässlich ist (Tadjuidje & Hollemann, 2006). Diese Studien legen die Vermutung nahe, dass auch andere Komponenten im Cholesterinbiosyntheseweg (beispielsweise SREBP2, INSIG1 und INSIG2) Einfluss auf die neurale Entwicklung haben.

## 1.5 Ausbildung des Vertebraten Nervensystems

Die Entwicklung des Nervensystems zu verstehen und zu beschreiben stellt für Wissenschaftler noch immer eine große Herausforderung dar. So ist das Nervensystem der Vertebraten an zahlreiche Prozesse,

wie Neuralinduktion, Zellproliferation, Zellzyklusaustritt und Differenzierung mit begleitender neuron-spezifischer Genexpression, gebunden.

Für das Studium embryonaler Prozesse hat sich der südafrikanische Krallenfrosch, *Xenopus laevis*, als guter Modellorganismus herausgestellt (Abschnitt 1.6). An ihm wird in den kommenden Kapiteln die Neurogenese und die Bildung des Nervensystems erklärt.

### 1.5.1 Neurogenese bei *Xenopus laevis*

Als Neurogenese versteht man die Bildung von neuronalen Zellen (Neurone und Gliazellen) aus Stamm- oder Vorläuferzellen. Bei *Xenopus laevis* unterscheidet man zwischen primärer Neurogenese, bei der ein frühes Nervensystem für Bewegungen und Antworten der Larve etabliert wird (Hartenstein, 1989) und sekundärer Neurogenese. Diese startet vor der Metamorphose, im Kaulquappenstadium, und ersetzt primäre Neurone durch Neurone die im adulten Frosch benötigt werden.

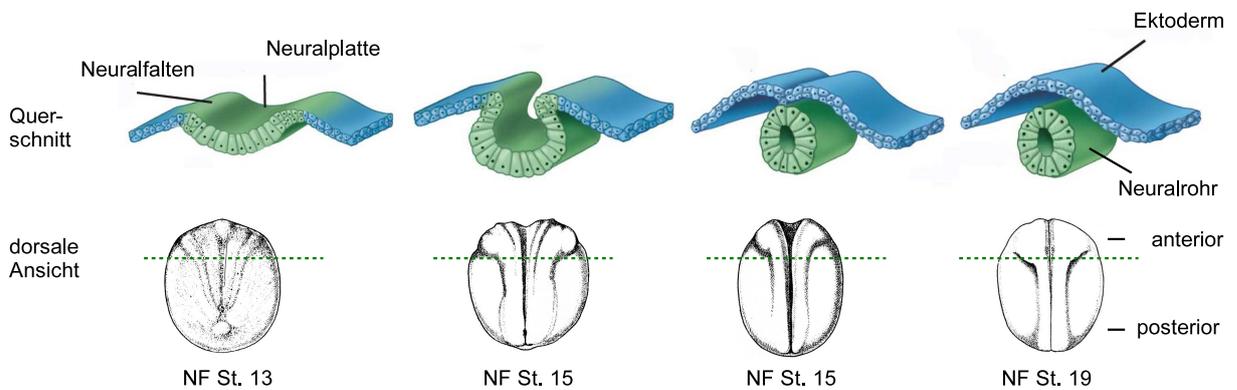
Der auslösende Schritt für die Entstehung des Nervensystems der Vertebraten ist die Entscheidung der ektodermalen Zellen, ein neurales oder ein epidermales Zellschicksal einzugehen (De Robertis & Kuroda, 2004). Die Abgrenzung der zukünftigen Neuralplatte von nicht-neuralem Ektoderm (als neurale Induktion bezeichnet) gliedert sich in mehrere extra- und intrazelluläre Signalkaskaden. Wichtig für die Festlegung des neuronalen Schicksals ist die Inhibierung des BMP (*bone morphogenic protein*) Signals im präsumtiven neuronalen Ektoderm des Gastrula Embryos. Sie wird extrazellulär durch Faktoren (z. B. Chordin, Noggin, Follistatin) ausgelöst die von einer Stelle des Mesoderms ausgesandt werden, welche als Spemann-Organisator bezeichnet wird (Wilson & Edlund., 2001). Neben dem Spemann-Organisator ist ein weiteres Signalzentrum unter dem Namen BCNE (*blastula chordin and noggin expressing center*) bekannt, welches sich in der dorsalen animalen Kappe von prä-Gastrula-Embryonen befindet, und ebenfalls entscheidend bei der BMB-Inhibierung ist (Kuroda *et al.*, 2004). Intrazellulär wird die Inhibierung durch FGF (*fibroblast growth factor*) und IGF (*insulin growth factor*) Signale unterstützt. Sie regulieren die Smad1-Aktivität herunter, einem Signalgeber des BMB-Signals (Richard-Parpaillon *et al.*, 2002; Pera *et al.*, 2003). Trotzdem ist die Inhibierung des BMP-Signals nicht hinreichend für die neurale Induktion in Vertebraten (Launay *et al.*, 1996; Sasai *et al.*, 1996). Im Huhn (Wilson *et al.*, 2000), Zebrafisch (Kudoh *et al.*, 2004) und *Xenopus* wurde gezeigt, dass entscheidend für die Festlegung des neuronalen Zellschicksals ein geringes Level an FGF-Signal ist, unabhängig von der Rolle von FGF als Inhibitor der BMB-Signals (Delaune *et al.*, 2005; Henningfeld *et al.*, 2007).

Viele Gene werden durch die Aktivitäten innerhalb der neuronalen Induktion induziert. In *Xenopus* wird die Induktion des neuronalen Ektoderms unter anderem durch Gene wie Sox2 und Sox3 auf der dorsalen Seite des Embryos aktiviert (Bylund *et al.*, 2003; Graham *et al.*, 2003; Miyagi *et al.*, 2004). Diese neuronalen Vorläufer proliferieren, um die Zellzahl zu erzeugen, welche für die Bildung des Nervensystems benötigt werden. Gleichzeitig beginnen Untergruppen dieser Zellen, sogenannte proneurale (neurogene) Gene zu exprimieren. Das früheste proneurale Gen ist der *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH) Transkriptionsfaktor Neurogenin (X-ngnr1). Viele proneurale Gene codieren für Transkriptionsfaktoren, die eine DNA-bindende Domäne des bHLH-Typs aufweisen und zukünftige neurale Zellen auf ihr Schicksal vorbereiten, indem sie andere bHLH Gene wie NeuroD induzieren. NeuroD ist ein neuronales Differenzierungsgen, welches den Zellzyklusaustritt und die terminale Differenzierung reguliert (Bertrand *et al.*, 2002).

### 1.5.2 Neuralrohrentwicklung (Neurulation) bei *Xenopus laevis*

Der Begriff der Neurulation beschreibt die Bildung des Zentralnervensystems aus der Neuralplatte. Die Neurulation wird bei Amphibien in der späten Blastula eingeleitet. Äußerlich erkennt man die Bildung der Neuralplatte an der Wölbung im Bereich des äußeren Keimblattes. Die Neuralplatte faltet sich in der Mittellinie ein, sodass eine Neuralrinne entsteht, während sich an den Rändern die Neuralfalten aufwölben. Die Neuralfalten wandern aufeinander zu und schließen sich zum Neuralrohr (Abbildung 1.8).

Gleichzeitig beginnen Neuralleistenzellen, die in der dorsalen Region des entstehenden Neuralrohrs lokalisiert sind, beidseitig nach lateral in die Peripherie zu wandern. Diese multipotenten Neuralleistenzellen können zu einer Vielzahl verschiedener Zellen wie Neuronen, Glia-, Knorpel-, Knochen- oder Pigmentzellen differenzieren, um somit das periphere Nervensystem zu bilden. Nach Absenkung des entstandenen Neuralrohres, wird es vom epidermalen Ektoderm bedeckt. Mit fortschreitender Entwicklung gliedert sich das Neuralrohr im vorderen anterioren Abschnitt in drei blasenartige Ausstülpungen: Prosencephalon (Vorderhirn), Mesencephalon (Mittelhirn) und Rhombencephalon (Hinterhirn).



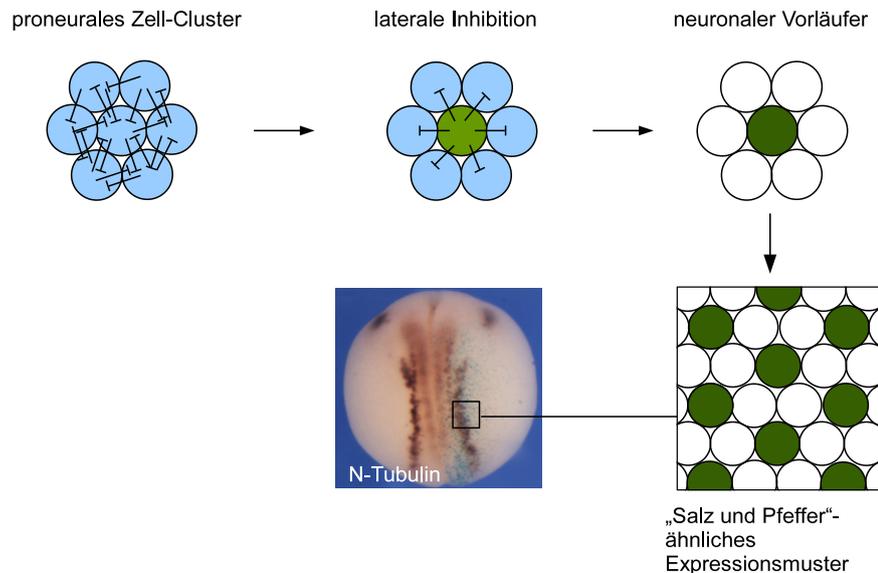
**Abbildung 1.8:** Schematische Darstellung der Neurulation in *Xenopus laevis*. Entstehung des Neuralrohrs. Abbildung modifiziert nach Murphy, 2010.

### 1.5.3 Musterbildung durch Signalaustausch: laterale Inhibition

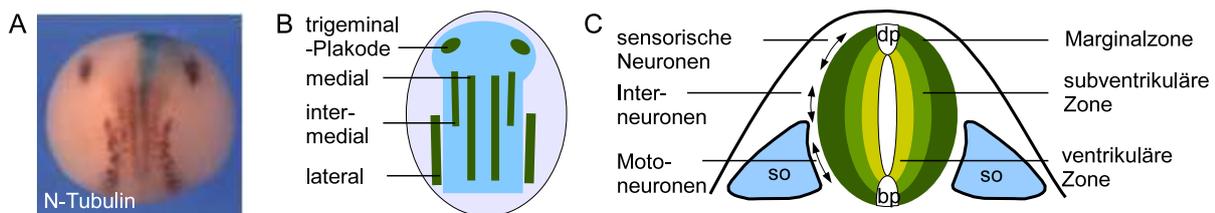
In Vertebraten wie auch Invertebraten differenzieren nicht alle neurale Zellen in Neuronen. Mit Hilfe des Notch-Delta Signalweges können sich die noch undifferenzierten primären Neuroblasten von ihrer Nachbarzelle abgrenzen und zu Neuronen oder Gliazellen differenzieren (Beatus & Lendahl, 1998). Der Notch-Signalweg hilft somit einer Zelle sich aus einer Ansammlung zunächst gleicher Zellen auszusondern. Dieser Vorgang wird laterale Inhibition genannt (Ghysen *et al.*, 1993).

Der Determinierungsfaktor *X-ngnr1* aktiviert in der Zelle, die laut ihrer Zellbestimmung ein Neuron werden soll, die Transkription des Liganden *X-Delta1* (Chitnis & Kintner, 1996). *X-Delta1* bindet daraufhin an den Notch-Rezeptor seiner Nachbarzelle (Chitnis *et al.*, 1995), was zu einer Reihe von proteolytischen Spaltungen im Notch-Rezeptor der Nachbarzelle führt (Lai, 2004). Dadurch entsteht NICD – die intrazelluläre Domäne von Notch. Sie ist in der Lage in den Zellkern zu translozieren. Dort bindet sie an das *Xenopus*-Homolog des Co-Repressor-Komplexes von Hairless *XSu(H)* und wandelt diesen in einen Co-Aktivator-Komplex um, sodass die Transkription von Notch-abhängigen Genen angeschaltet wird (Wettstein *et al.*, 1997).

Die Neuronen können durch die Expression von Neuronen-spezifischen Typ II  $\beta$ -Tubulin (N-Tubulin) sichtbar gemacht werden (Hartenstein, 1989; Oswald *et al.*, 1991), was sich in einem „Salz und Pfeffer“-ähnlichen Expressionsmuster widerspiegelt (Abbildung 1.9). Niedere Vertebraten wie *Danio rerio* und *Xenopus laevis* erzeugen ein einfaches Muster von primären Neuronen, welche in der offenen Neuralplatte kurz nach der Gastrulation in drei Längsstreifen beiderseits der dorsalen Mittellinie gebildet werden (Abbildung 1.10, A und B). Die Zellen, welche in diesen Domänen differenzieren, entsprechen drei Klassen von primären Neuronen: Motoneuronen, Interneuronen und sensorische Neuronen (Abbildung 1.10, C).



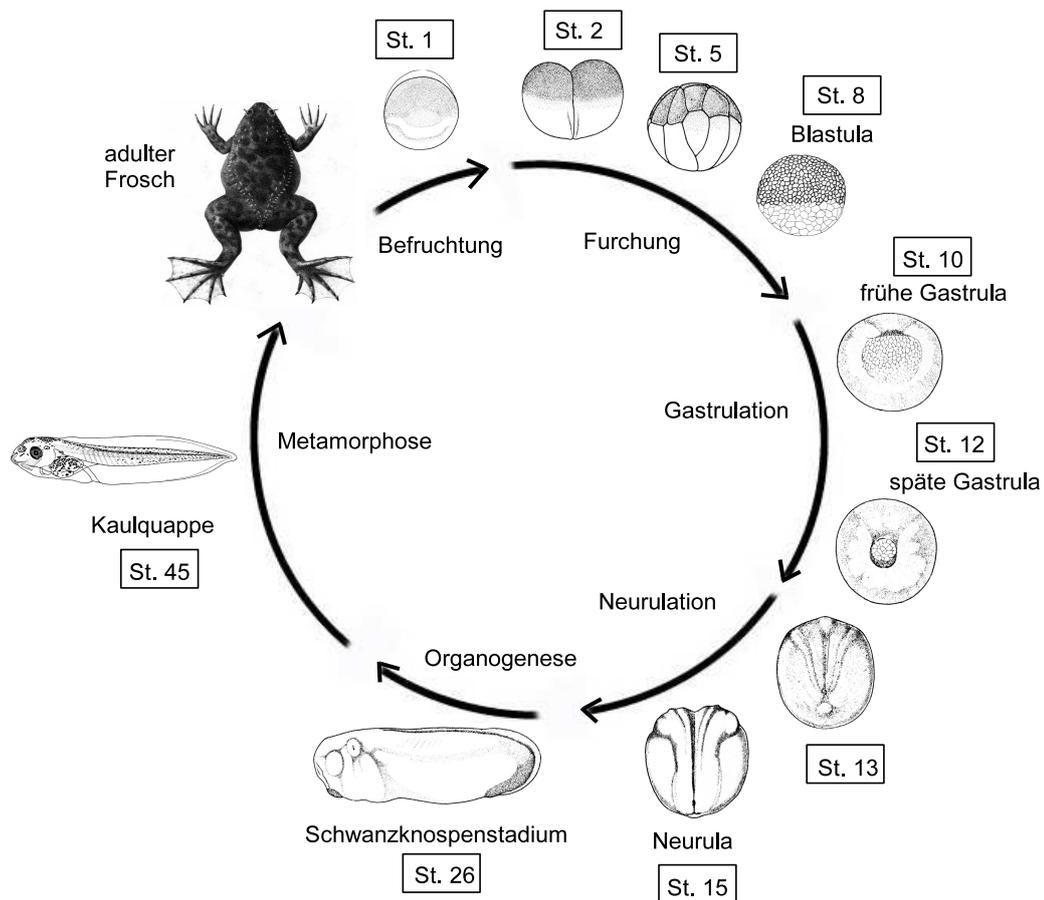
**Abbildung 1.9: Die Rolle von lateraler Inhibition für die neurale Entwicklung.** Ursprünglich teilen alle Zellen eines Zellclusters ein bestimmtes, noch nicht festgelegtes Zellschicksal, indem sie Notch-Signale senden und empfangen. In späterer Entwicklung führt die laterale Inhibition dazu, dass in der Gruppe ursprünglich gleicher Zellen nur eine Zelle zum Neuroblast wird, ihre Nachbarn sich hingegen zu Epidermiszellen entwickeln. Ein Resultat des Notch-Signalweges ist das „Salz und Pfeffer“-ähnliche Expressionsmuster von N-Tubulin. Abbildung modifiziert nach Lai, 2004.



**Abbildung 1.10: Proneurale Domänen bei *Xenopus laevis*.** (A) Whole mount *in situ* Hybridisierung für N-Tubulin im offenen Neuralplattenstadium (NF St. 15), dorsale Ansicht, anterior oben. (B) Schematische Abbildung der Domänen der primären Neurogenese im offenen Neuralplattenstadium (dunkelblau). Das charakteristische Muster (grün) zeigt sich in drei longitudinalen Streifen beidseits der dorsalen Mittellinie im Neuroektoderm als auch in der Zone der Trigeminalplakode in der anterioren Neuralplatte. (C) Querschnitt durch die posteriore Neuralplatte. Das Neuralrohr besteht aus drei Zonen: aus der inneren ventrikulären Zone, die proliferierende Zellen enthält; der mittleren subventrikulären Zone mit postmitotischen Zellen und der Marginalzone, in der bereits differenzierte Zellen vorliegen. Motoneuronen entstehen im ventralen Neuralrohr; sensorische Neuronen entstehen in dorsalen Regionen und Interneuronen zwischen dorsalen und ventralen Regionen. bp = Bodenplatte, dp = Dachplatte, so = Somiten. Abbildung modifiziert nach Klisch, 2006.

## 1.6 *Xenopus laevis* als Modellorganismus für die Entwicklungsbiologie

Um embryonale Entwicklungsprozesse zu studieren, hat sich der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* als exzellenter Modellorganismus erwiesen. Die Eier sind groß und können zu jedem Zeitpunkt durch Stimulation der weiblichen Frösche mit humanem Gonadotropin entnommen werden. Durch die externe Entwicklung der Eier kann man selbst frühe embryonale Prozesse direkt unter dem Binokular verfolgen (Abbildung 1.11). Durch klassische Experimente, wie Zellschicksalsanalysen (*fate mapping*), Transplantations- sowie Explantversuche, konnten schon einige Mysterien der Vertebraten-Entwicklung aufgedeckt werden. Im Laufe der Zeit, als die Molekularbiologie immer bedeutender wurde, konnten viele Fragestellungen auf molekularer Ebene geklärt werden. Mikroinjektionen synthetisch hergestellter DNA, RNA oder von Proteinen direkt nach Befruchtung der Eier ermöglichen schnell und leicht Überexpressionsstudien. Funktionsverluststudien lassen sich einfach durch die Injektion eines *antisense* Oligonukleotid Morpholinos (MO), welcher die Proteinsynthese der entsprechenden mRNA blockiert, durchführen. Die Expression von Genen in *Xenopus* kann durch *in situ* Hybridisierung und Immunocytochemie auf RNA- und Proteinlevel an ganzen Embryonen analysiert werden.



**Abbildung 1.11:** Die embryonale Entwicklung von *Xenopus laevis*. Das Blastulastadium ist schon ca. 5–6 Stunden nach der Befruchtung erreicht. Nach ca. 13 Stunden beginnt die Gastrulation und ca. 7 Stunden später wird das Neurulastadium erreicht. Anschließend beginnt die Organogenese. 4 Tage nach der Befruchtung hat sich der Embryo schon zu einer freischwimmenden Kaulquappe (St. 45) entwickelt und nach ca. 60 Tagen und einer Metamorphose entsteht der Frosch. Abbildung digitalisiert nach Nieuwkoop & Faber, 1967.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist ein besseres Verständnis zu erlangen, wie SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in der Entwicklung zusammenspielen und welche Aufgaben sie im Embryo übernehmen. Mit Hilfe des Modellorganismus *Xenopus laevis* soll (1) eine detaillierte Expressionsanalyse von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 durch whole-mount *in situ* Hybridisierung und RT-PCR vorgenommen; (2) eine funktionelle Charakterisierung dieser Gene durch Funktionsgewinn- und Verluststudien vollzogen; (3) eine Identifizierung von SREBP2-Zielgenen durch Animale-Kappen-Experimente umgesetzt; (4) HeLa-Zelltransfektionsexperimente mit SREBP2, INSIG1 und INSIG2 für Lokalisations- und mögliche Interaktionsstudien durchgeführt; und (5) die Wirkung von SREBP2 in *Xenopus* als Transkriptionsaktivator- oder Repressor überprüft werden.



# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Das Versuchstier *Xenopus laevis*

Als Versuchstier diente der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis*. Dieser gehört zur Familie der zungenlosen Froschlurche (*Pipidae*), zur Ordnung der Anura. Pigmentierte und Albinofrösche wurden gemäß den Tierschutzbestimmungen kultiviert (Süßwasseraquarien mit Länge 120 cm, Breite 50 cm und Höhe 25 cm; Wassertemperatur 19 °C). Die Ernährung bestand aus roten Mückenlarven (aufgetaut) und Lebendfutter. Die Bestimmung der einzelnen Embryonalstadien erfolgte nach Nieuwkoop & Faber, 1967.

### 2.2 Bakterienstämme

*E. coli* (Stratagene GmbH, Heidelberg), recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F' proAB, lacIqZΔM15, Tn10(Tetr)], XL1-Blue.

### 2.3 Zelllinien

Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um die von einem humanen Gebärmutterhalskarzinom abstammenden HeLa-Zellen (Gey *et al.*, 1952) und B35-Neuroblastomzellen aus der Ratte.

### 2.4 Chemikalien

*Tabelle 2.1:* Liste der Chemikalien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Acryl/Bisacrylamid	Sigma
Acetanhydrid	Sigma
Agarose	Roth
Albumin, Bovine Serum (BSA)	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Ampicillin	Applichem
Blockierungsreagenz ( <i>Blocking Reagent</i> )	Roche
Bradford-Reagenz	Biorad
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP)	Fermentas
Bromphenolblau	Merck
CHAPS	Roth
Chloroform	Merck
L-Cysteinhydrochloride	Roth
10 mM dNTP mix	Fermentas
DAPI	Roth

Dexamethason	Sigma
DIG RNA Labeling Mix	Roche
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dimethyl-Formamid (DMF)	Roth
Dimethyl-Sulfoxid(DMSO)	Roth
<i>Dulbecco 's modified Eagle 's medium</i> (DMEM)	GIBCO
DNA Ladder, O'GeneRuler™ 1kb, 500bp	Fermentas
Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure (EDTA)	Sigma
Ethylen-Glycol-Tetra-Essigsäure (EGTA)	Sigma
Essigsäure	Roth
Ethanol (99 %)	Roth
Ethidiumbromid	Q-Biogene
Formaldehyd	Roth
Formamid	Roth
Gelatin	Roth
Glutardialdehyd-Lösung	Sigma
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom AG
Glukose	Merck
Glycerol	Roth
HEPES Na-Salz	Sigma
Humanes Choriongonadotropin (HCG)	Sigma
Isopropanol	Roth
Isopropyl-b-D-thiogalaktosid (IPTG)	Fermentas
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kalium hexacyano-ferrate (III) ( $K_3Fe(CN)_6$ )	Sigma
Kalium hexacyano-ferrate (II), trihydrate ( $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ )	Sigma
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumhydrogenphosphat	Roth
Kalziumdichlorid	Roth
Kalziumsulfat	Roth
LB Broth Base	Invitrogen
LB Agar	Invitrogen
Lithiumchlorid	Roth
L-Cystein	Applichem
L-[ $^{35}S$ ]-Methionin	Amersham Bioscience
Magnesiumchlorid	Roth
Magnesiumsulfat	Sigma
Maleinsäure	Roth
Methanol	Roth
Mowiol	Calbiochem
MOPS	Q-Biogene
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natriumhydrogenphosphatdodecahydrat $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	Merck
Natriumbicarbonat	Sigma
Natriumcitrat	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Alkalische Phosphat Substrat Lösung (NBT)	Fermentas
Nitrocellulose	Sartorius AG
Nilblau	Fluka
PageRuler™ pre-stained protein ladder	Fermentas
Paraformaldehyd	Fermentas
Pferdeserum, hitzeinaktiviert (HS)	Biochrom KG
Protein A-Sepharose TM	GE Healthcare
Protein G-Agarose	Biovision
ProteinaseK	Merck
Red-Gal (5-Bromo-6-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside)	Sigma
RNase OUT TM Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen
RNase A	Sigma

RNase T1	Sigma
Rose-Gal (6-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside)	AppliChem
Rinderserumalbumin (BSA)	Biochrom KG
[ $^{35}$ S]-Methionin	Perkin Elmer
Sucrose	Roth
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka
Torula RNA	Sigma
Triethanolamin	Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Ferax Laborat GmbH
Trizol <sup>®</sup> Regent	Invitrogen
Tween-20	Roth
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Roth
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside)	Q-Biogene
Xylen	Sigma

## 2.5 Enzyme

*Tabelle 2.2:* Liste der Enzyme

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Alkalische Phosphatase	Roche
Deoxyribonuclease I (DNaseI, RNase-free)	Fermentas
DNA-PolymeraseI, large Fragment (Klenow)	New England BioLabs
Restriktionsenzyme	New England BioLabs
RNase A	Sigma-Aldrich
RNase T1	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Merck
T3 RNA-Polymerase	Stratagene
T4 DNA-Ligase	Fermentas
T7 RNA-Polymerase	Stratagene
Taq DNA-Polymerase	Fermentas
Turbo Pfu DNA-Polymerase	Fermentas
SP6 RNA-Polymerase	Stratagene
Shrimp-Phosphatase (SAP)	Fermentas

## 2.6 Antikörper

*Tabelle 2.3:* Liste der Antikörper

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
$\alpha$ -Digoxigenin/AP	Roche Diagnostics GmbH
$\alpha$ -GFP	Miltenyi, Invitrogen
$\alpha$ -goat-HRP	Invitrogen
$\alpha$ -goat-Alexa488	Invitrogen
$\alpha$ -goat-DL649 (Dylight)	Rockland
$\alpha$ -rabbit-DL649 (Dylight)	Rockland
$\alpha$ -INSIG1	Santa Cruz
$\alpha$ -INSIG2	Santa Cruz
$\alpha$ -mouse-alexa647	Invitrogen
$\alpha$ -mouse-Cy3	Invitrogen
$\alpha$ -mouse-Alexa488	Invitrogen
$\alpha$ -myc-HRP	Miltenyi
$\alpha$ -myc-tag	Abcam
$\alpha$ -rabbit-PH3	Upstate Biotechnology
$\alpha$ -rabbit-GNE	AG Horstkorte, Halle (Saale)

$\alpha$ -rabbit-Alexa594  
 $\alpha$ -rabbit-AP  
 $\alpha$ -rabbit-FITC  
 $\alpha$ -rabbit-HRP  
 $\alpha$ -SREBP2

Invitrogen  
Sigma  
Miltenyi  
Santa Cruz  
Abcam

## 2.7 Kits

*Tabelle 2.4:* Liste der Kits

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
AccuPrime™ Pfx Super Mix	Invitrogen
mMESSAGE mMACHINETM SP6	Ambion
pGEM <sup>®</sup> -T Vector System	Promega
RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
RevertAid™ Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
TnT <sup>®</sup> -Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega
Technovit 7100	Heraeus Kulzer
QIAGEN <sup>®</sup> PCR Purification Kit	QIAGEN
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN
QIAEX Gel Extraction Kit	QIAGEN
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene

## 2.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien

### 2.8.1 Mikroliterpipetten

*Tabelle 2.5:* Liste der Mikroliterpipetten

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Pipetman P10	Gilson S.A.S., France
Pipetman P20	Gilson S.A.S., France
Pipetman P200	Gilson S.A.S., France
Pipetman P1000	Gilson S.A.S., France

### 2.8.2 PCR Thermocycler

*Tabelle 2.6:* Liste der PCR-Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
TThermocycler	Biometra, Deutschland
TGRADIENT Thermocycler	Biometra, Deutschland

### 2.8.3 Histologie

*Tabelle 2.7:* Liste der Histologie-Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Vibratom Leica VT1000 S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Gastromaster Mikrodisektionsgerät	Xenotek Engineering, Belleville (USA)
Deckgläser (24 x 60 mm)	Menzel-Gläser, Deutschland
Kunststoffform zum Einbetten (Peel-A-Way <sup>®</sup> )	Polysciences Inc.

## 2.8.4 Elektrophorese

*Tabelle 2.8:* Liste der Elektrophorese-Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Elektrophorese Netzteil	E844 Consort, Belgien
Power Pack P25	Biometra, Deutschland
Bio-Rad Gel Doc 2000	Bio-Rad Laboratorien, USA

## 2.8.5 Optik

*Tabelle 2.9:* Liste der optischen Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse E600	Nikon, Japan
Leica DMR	Leica Microsystem, Deutschland
Olympus SZX12	Olympus Microscopy, Japan
Zeiss Stemi 2000	Carl Zeiss, Deutschland

## 2.8.6 Zentrifuge

*Tabelle 2.10:* Liste der Zentrifugen

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Biofuge pico	Heraeus, Deutschland
SIGMA 2K15	Sigma Laborzentrifugen, Deutschland
Sorvall RC-5B	Thermo Scientific, USA

## 2.8.7 Spektrophotometer

*Tabelle 2.11:* Liste der Spektrophotometer

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
NanoDrop <sup>®</sup> Spectrophotometer ND-100	peQlab Biotechnology, Deutschland
Bio photometer	Eppendorf, Deutschland

## 2.8.8 Elektroporator

*Tabelle 2.12:* Liste der Elektroporatoren

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Electro Square Porator	TM ECM830 BTX, Deutschland

## 2.8.9 Sterilbank/Inkubator/Thermoblock/Wasserbad

*Tabelle 2.13:* Liste der Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Sterilbank KS12	Thermo Scientific, USA
Inkubator	Heraeus Instruments, Deutschland
Inkubatorschüttler Innova TM 4300	New Brunswick Scientific, USA
Thermomixer	Eppendorf, Deutschland

Thermomixer HTMR-131  
Wasserbad DIN 40050-IP20  
Brutschrank (BM400)

HLC-Haep Labor Consult, Deutschland  
Memert, Deutschland  
Memert, Deutschland

### 2.8.10 Mikroinjektion

*Tabelle 2.14:* Liste der Mikroinjektions-Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Mikroinjektor	World Precision Instruments PV820
Nadelzieher	Narishige Japan PN-30
Glaskapillaren	Kwik-Fil TM
Schraubdeckelgläser	Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen

### 2.8.11 Computer (Hardware)

*Tabelle 2.15:* Liste der Hardware

Laptop IBM Thinkpad R400	IBM Deutschland GmbH, Ehningen
--------------------------	--------------------------------

### 2.8.12 Computer (Software)

*Tabelle 2.16:* Liste der Software

Bezeichnung	Hersteller
Aida Image Analyzer v450	raytest GmbH, Straubenhardt
BAS Reader 3.14	raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt
BLAST	Datenbanken-Suchsystem (Altschul <i>et al.</i> , 1997) <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST</a>
DissOnline-Tutor 2.1	Freie Universität Berlin, Universität Duisburg-Essen, Deutsche Nationalbibliothek
GIMP	<a href="http://www.gimp.org">http://www.gimp.org</a>
L <sup>A</sup> T <sub>E</sub> X 2 <sub>ε</sub>	<a href="http://www.ctan.org">http://www.ctan.org</a>
Microsoft® Excel 2000	Microsoft GmbH, Unterschleißheim
NIS-Elements AR	NIKON INSTRUMENTS INC., USA
OpenOffice 3.1 Draw	Oracle Inc., USA
Primer3	Whitehead Institute for Biomedical Research, USA (Steve Rozen and Helen J. Skaletsky, 2000)
UNIPROT	<a href="http://www.uniprot.org">http://www.uniprot.org</a>

## 2.9 Lösungen, Puffer, Medien

### 2.9.1 Immunfärbung

**8 % Paraformaldehyd (PFA)** 8 % Paraformaldehyd in 2 x PBS bei 65 °C solange Rühren bis die Lösung klar wird; pH 7,2. Aliquots werden bei -20 °C gelagert, Gebrauchslösung: auf 4 % verdünnen.

**Permeabilisierungs- und Blockierungslösung** 20 mg/ml BSA und 0,5 % (v/v) Triton X-100 in 1 x PBS.

**Antikörper Puffer** 10 mg/ml BSA und 0,05 % Triton X-100 in 1 x PBS.

**PBS-TB** 0,05 % (v/v) Tween-20 und 0,2 % BMB in 1 x PBS.

**PBS-TBN** 0,05 % (v/v) Tween-20; 0,2 % BMB und 0,3 M NaCl in 1 x PBS.

## 2.9.2 Antibiotika

**Ampicillin** Endkonzentration 100 ng/ $\mu$ l Ampicillin.

**Kanamycin** Endkonzentration 30 ng/ $\mu$ l Kanamycin.

## 2.9.3 Nährmedien

**Luria-Bertani (LB)-Medium** Luria-Bertani (LB)-Medium: 2 % (w/v) LB Broth Base (Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

**LB-Agar** LB-Agar: 3,2 % (w/v) LB Agar (Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

## 2.9.4 Oligonukleotide und Konstrukte

Die für diese Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Abschnitt A.3) und Konstrukte (Abschnitt A.2) sind im Anhang aufgeführt.

# 2.10 Präparation und Mikroinjektion der *Xenopus laevis* Embryonen

## 2.10.1 Präparation einer Spermien suspension aus *Xenopus laevis* Testis

Zur Gewinnung der Spermien wurde ein *Xenopus laevis* Männchen nach Betäubung dekapitiert und ventral aufgeschnitten. Die Hoden wurden entnommen, in eiskaltes 1 x MBS überführt und anschließend ca.  $\frac{1}{5}$  eines Hodens mit einer Mikroschere in 1000  $\mu$ l 1 x MBS mazeriert. Die Spermien suspension kann 1 Woche bei 4 °C gelagert werden.

## 2.10.2 Stimulation der Eiablage

Zur Stimulation der Eiablage wurde einem *Xenopus laevis* Weibchen 12 h vor Experimentbeginn circa 600–800 U humanes Gonadotropin in den dorsalen Lymphsack injiziert und das Tier ü. N. bei 16 °C gehalten. War ein späterer Beginn der Eiablage erwünscht, wurde die Hormoninjektion dementsprechend zeitlich verschoben.

**Humanes Choriongonadotropin (HCG)** 10.000 U/Glasröhrchen HCG (Sigma) wurden in 10 ml ddH<sub>2</sub>O für eine Stocklösung von 1000 U/ml aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

## 2.10.3 *In vitro* Fertilisation

Zur Aktivierung der Spermien wurden 100  $\mu$ l der Spermien suspension mit 900  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O in einer Petrischale verdünnt und sofort über das Gelege gegeben. Die Eier wurden zu einer Einzelschicht ausgebreitet und 3 min zur Befruchtung inkubiert. Anschließend wurde die Petrischale mit 0,1 x MBS überschichtet und ca. 45 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.

**5 x MBS** 50 mM HEPES, pH 7,4; 440 mM NaCl; 5 mM KCl; 12 mM NaHCO<sub>3</sub>; 4,1 mM MgSO<sub>4</sub>; 2,05 mM CaCl<sub>2</sub>; 3,3 mM KNO<sub>3</sub>; pH 7,4; steril filtrieren.

## 2.10.4 Entfernen der Gallerte, Vitalfärbung und Entwicklung

Nach einer 45-minütigen Inkubationszeit der Eier wurde die Gallerthülle nach 3-minütiger Behandlung mit 2 % Cysteinlösung entfernt. Anschließend wurden die Albinoembryonen in 0,01 %iger Nilblaulösung für 5 min angefärbt und anschließend 2 mal mit 0,1 x MBS gewaschen. Die Kultivierung der Embryonen fand

in 0,1 x MBS bis zum gewünschten Stadium statt. Die Stadienbestimmung folgte dabei der Einteilung nach Nieuwkoop & Faber, 1967.

**2 % Cystein-HCl** 2 % (w/v) L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat, pH 7,8-8,0.

**Nilblaulösung** 1 l Phosphatpuffer wurde durch Zugabe von 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und Zugabe von 0,011 % (w/v) Nilblaulchlorid gewonnen. Das Salz wurde ü. N. bei 60 °C auf dem Schüttler gelöst und am nächsten Tag filtriert.

### 2.10.5 Fixierung und Färbung von *Xenopus laevis* Embryonen

Hatten die Embryonen das gewünschte NF Embryonalstadium erreicht, wurden sie in 5 ml Schraubdeckelglasröhrchen auf einer Wippe für 1 h in 1 x MEMFA inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen durch eine aufsteigende Ethanolreihe (25 % EtOH; 50 % EtOH; 75 % EtOH; 100 % EtOH) dehydriert. Embryonen ab NF St. 15 wurden unter Zuhilfenahme von Mikropinzetten aus ihrer Vitellinmembran vor der Fixierung befreit. Für whole-mount *in situ* Hybridisierung erfolgte die Lagerung der Embryonen in 100 % EtOH (p.A.) und für die Immunfärbung in Dent´s bei -20 °C.

**Dent´s** 20 ml DMSO (20 %) mit 80 ml Methanol (80 %).

**10 x MEM** 1 M MOPS; 20 mM EGTA; 10 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7,4; steril filtrieren.

**MEMFA** 1 x MEM; 3,7 % Formaldehydlösung.

**10 x PBS (Phosphat-gelöste Saline)** 1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in dH<sub>2</sub>O, pH 7,4 autoklaviert.

## 2.11 Mikromanipulation von *Xenopus laevis* Embryonen

### 2.11.1 Mikroinjektion in *Xenopus laevis* Embryonen

Für Funktionsverluststudien wurden Morpholino-*Antisense*-Oligonukleotide verwendet. Dabei handelt es sich um kurze Oligonukleotide, die sich durch spezielle Morpholino-Gruppen von herkömmlichen Nukleotidketten unterscheiden. Sie besitzen eine zum Bereich der Translationsinitiationsstelle komplementäre Sequenz und bilden zusammen mit der jeweiligen RNA ein doppelsträngiges Hybrid aus. Die Translation der RNA wird gestoppt, sodass keine Proteinsynthese stattfinden kann. Für die Überexpression im Rahmen von Funktionsgewinnstudien wurde entsprechende synthetisierte RNA in eine Blastomere des Zwei-Zell-Stadiums von *Xenopus laevis* injiziert.

Für die Injektion wurden Glaskapillaren mit dem Nadelziehgerät dünn ausgezogen und mit der Morpholino- bzw. synthetischen mRNA befüllt. Die Glaskapillaren wurden in den Mikromanipulator eingespannt und die Spitze der Kapillare mittels einer Uhrmacherpinzette so weit geöffnet, bis das zu injizierende Volumen (5 nl) auf einer Messskala eingestellt war. Es wurde mit einem möglichst hohen Injektionsdruck (~2000 hPa) gearbeitet, um den Durchmesser der Glaskapillare möglichst gering zu halten. Zur Injektion wurden die Embryonen auf Glas-Objektträger in 1 x MBS überführt und in Reihe ausgerichtet. Nach der Injektion wurden die Embryonen in Petrischalen mit 1 x MBS überführt und nach einstündiger Inkubation wurde der Puffer gegen 0,1 x MBS ausgetauscht. Die Unterscheidung der injizierten und nicht-injizierten Seite im Embryo ermöglicht die Co-Injektion von  $\beta$ -Gal als Zelllinienmarker (Blaufärbung) zusammen mit dem Morpholino- bzw. der synthetischen RNA. Anschließend kultivierten die Embryonen bis zum gewünschten Embryonalstadium im Klimaschrank bei 16 °C.

### 2.11.2 Mikroinjektion von induzierbaren Konstrukten in *Xenopus laevis* Embryonen

Um SREBP2 zeitlich besser kontrollieren zu können, wurden drei induzierbare SREBP2-Konstrukte generiert (Abschnitt A.2). Bei SREBP2 aa430-VP16-GR wurde C-terminal *in frame* an SREBP2aa430 die Aktivierungsdomäne VP16 (Transkriptionsaktivator) aus dem Virus Protein VP16 fusioniert. Um die Proteinaktivität zeitlich kontrollieren zu können, wurde die Glucocorticoidrezeptor-Liganden-Bindungsdomäne (GR) an SREBP2-VP16 fusioniert, was eine Aktivierung durch die Zugabe des Steroidhormons Dexamethason ermöglichte. Bei SREBP2aa430-EngR-GR wurde die Repressordomäne (EngR) aus *Drosophila in frame* und ebenfalls GR an SREBP2aa430 fusioniert. Als drittes Konstrukt wurde SREBP2aa430-GR generiert, bei dem C-terminal *in frame* an SREBP2aa430 die Glucocorticoidrezeptor-Liganden-Bindungsdomäne (GR) fusioniert wurde. Die Konstrukte sind im TnT-Test (Abschnitt 2.18.1) kontrolliert und konnten anschließend zusammen mit  $\beta$ -Gal als Zelllinienmarker, im Zwei-Zell-Stadium in eine Blastomere in die Embryonen injiziert werden (Kultivierung in Petrischalen in 0,1 x MBS). Das Gelege wurde im NF St. 11,5 halbiert und ein Teil mit Dexamethason (1:500 Verdünnung von 500 x DEX) induziert, während der andere Teil als nicht-induzierte Kontrolle diente. Diese Embryonen kultivierten bis zu ihrer Fixierung im NF St. 30–32.

**500 x DEX** 20 mM Dexamethason in Ethanol; Lagerung unter Lichtausschluss bei -20 °C.

### 2.11.3 Präparation und Kultivierung von animalen Gewebeexplantaten (animale Kappen)

Synthetische mRNA wurde in beide Blastomeren des animalen Pols von *Xenopus laevis* Embryonen im Zwei-Zell-Stadium injiziert. Nach Erreichen des Blastula-Stadiums (NF St. 9–9,5) wurden die injizierten Embryonen sowie nicht-injizierte Kontrollembryonen in 0,5 x MBS überführt und mittels Uhrmacherpinzetten von der Vitellinmembran befreit. Aus dem am animalen Pol befindlichen Dach des Blastocoels erfolgte unter Zuhilfenahme eines Mikrodisektionsgeräts (Gastromaster) ein Explantatausschnitt mit einem Durchmesser von ca. 400  $\mu$ m. Pro experimentellem Ansatz wurden 15–20 Kappen im Blastulastadium (NF St. 8,5–9) präpariert und in Plastik Kulturschalen mit einer Beschichtung aus 1 % Agarose in 0,5 x MBS überführt. Die Embryonen wurden 30 min nach der Entnahme des Explantates mit Dexamethason (1:500 Verdünnung von 500 x DEX) induziert und die Kappen sowie induzierte Kontrollembryonen 4 h bei 16–18 °C kultiviert. Parallel wurden unbehandelte uninduzierte Kontrollembryonen und Kappen mitgeführt. Bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte eine Einlagerung der Kappen bei -80 °C.

**5 x MBS (animale Kappen)** 50 mM HEPES, pH 7,4; 440 mM NaCl; 5 mM KCl; 12 mM NaHCO<sub>3</sub>; 4,1 mM MgSO<sub>4</sub>; 2,05 mM CaCl<sub>2</sub>; 1,65 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, pH 7,4; steril filtrieren.

**0,5 x MBS + Penicillin + Streptomycin** 0,5 x MBS; 100 U/ml Penicillin; 100  $\mu$ g/ml Streptomycin.

**500 x DEX** Stammlösung 20 mM Dexamethason in Ethanol; Lagerung unter Lichtausschluss bei -20 °C.

## 2.12 Whole mount *in situ* Hybridisierung von *Xenopus laevis* Embryonen

Die whole mount *in situ* Hybridisierung ermöglicht es die räumliche und zeitliche Expression von Genen in *Xenopus laevis* Embryonen zu analysieren. Die hierbei verwendeten Dig-markierten *antisense*-RNA Sonden sind komplementär zur endogenen mRNA, sodass diese miteinander hybridisieren können. Eine vermittelte Färbereaktion ermöglichte die Visualisierung des Expressionsmusters. *Sense*-Sonden hybridisieren dementsprechend nicht und dienen als Negativkontrolle.

### 2.12.1 Rehydrierung der Embryonen

Wenn nicht anders erwähnt, kultivierten die Embryonen in 5 ml fassenden Schraubdeckelgläsern. Pro Experiment wurden nie mehr als 50 Embryonen pro Röhrchen behandelt. Im ersten Schritt erfolgte die schrittweise Rehydrierung der Embryonen über eine abnehmende Alkoholreihe und im zweiten Schritt die Überführung wieder in das wässrige Medium.

*Tabelle 2.17:* Rehydrierung der Embryonen

Ethanol	Puffer	Dauer (in min)	Anzahl
100 %	-	5	1 x Wippe
75 %	dH <sub>2</sub> O 25 %	5	1 x Wippe
50 %	dH <sub>2</sub> O 50 %	5	1 x Wippe
25 %	PTw 75 %	5	1 x Wippe
-	PTw 100 %	5	1 x Wippe

**Ethanol Reihe** 100 %; 75 % und 50 % (v/v) Ethanol in dH<sub>2</sub>O; 25 % Ethanol in PTw.

### 2.12.2 Proteinase K-Behandlung

Um die Embryonen durchlässiger für die RNA-Hybridisierungssonden zu machen, wurden sie abhängig von ihrem jeweiligen Entwicklungsstadium bei RT in 1 ml PTw-Puffer mit 10 µg/ml Proteinase K inkubiert. Die Inkubationszeiten waren den Stadien entsprechend angepasst. Zeigten sich leichte Schäden am Embryo, erfolgte ein sofortiger Abbruch der Behandlung.

*Tabelle 2.18:* Proteinase K-Behandlung

NF Stadium	5	10	15	20	25	30	35
Inkubationszeit (in min)	2	10	12	14	15	16	17

### 2.12.3 Acetylierung und Refixierung

Die Embryonen wurden in 0,1 M Triethanolamin (pH 7,5) umgepuffert, und durch zweimalige Zugabe von Acetanhydrid acetyliert. Es folgte die Refixierung der Embryonen in PTw + 4 % Formaldehyd (FA) und Behandlung mit Proteinase K, sowie anschließend Acetylierung und Inkubation in PTw/Formaldehydlösung. Die Embryonen wurden in 0,1 M Triethanolamin-Lösung (pH 7,5) umgepuffert, durch zweimalige Zugabe von Acetanhydrid acetyliert, anschließend in PTw gewaschen und in PTw + 4 % PFA refixiert.

*Tabelle 2.19:* Acetylierung und Refixierung

Puffer	Zugabe von	Dauer (in min)	Anzahl
0,1 M Triethanolamin	-	5	2 x Wippe
0,1 M Triethanolamin	12,5 µl Acetanhydrid	5	1 x Wippe
-	12,5 µl Acetanhydrid	5	1 x Wippe
PTw	-	5	2 x Wippe
PTw + 4 % PFA	-	20	1 x Wippe
PTw	-	5	5 x Wippe

**Triethanolamin Lösung** 0,1 M Triethanolaminehydrochlorid in dH<sub>2</sub>O, pH 7,5.

**PTw** 0,1 % Tween-20 in 1 x PBS.

**PTw/MEMFA** 4 % (v/v) Formaldehyd in PTw.

### 2.12.4 Hybridisierung

Anschließend wurde der PTw-Puffer bis auf 1 ml entfernt und 250  $\mu$ l Hybridisierungs-Lösung zugegeben. Nach dem Absinken der Embryonen in die Hybridisierungslösung wurde der Überstand abgenommen, durch 500  $\mu$ l Hybridisierungslösung ersetzt und die Röhrchen 10 min in der Dampfphase eines Wasserbades bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung erneuert und die Embryonen für die Dauer von 6 h unter Schwenken in der Dampfphase prähybridisiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes und Zugabe der RNA-Sonde (Endkonzentration je 1  $\mu$ g/ml) in 2 ml Hybridisierungslösung erfolgte die Hybridisierung ü. N. in der beschriebenen Dampfphase unter leichtem Schwenken.

**Hybridisierungsmix** 50 % deionisiertes Formamid; 1 mg/ml Torula-RNA; 10  $\mu$ g/ml Heparin; 1 x Denhardt's; 0,1 % Tween-20; 0,1 % CHAPS und 10 mM EDTA in 5 x SSC; Lagerung bei -20 °C.

**100 x Denhart 's Lösung** 2 % BSA; 2 % PVP und 2 % Ficoll 400 in dH<sub>2</sub>O; Lagerung bei -20 °C.

**DEPC (Diethylpyrocarbonat) H<sub>2</sub>O** 0,1 % (v/v) DEPC in ddH<sub>2</sub>O wird bei 37 °C für 2 h inkubiert und anschließend autoklaviert.

**TE Puffer (Tris/EDTA Puffer)** 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 mit 1 mM EDTA.

### 2.12.5 Waschschritte

Die Sonden-RNA wurde abgenommen und für weitere Verwendungen bei -20 °C gelagert. Um nicht gebundene, einzelsträngig vorliegende Sonden-RNA zu entfernen, sind hierzu die Embryonen zu waschen und mit 20  $\mu$ g/ml RNase A und 10 U/ml RNase T1 zu verdauen.

*Tabelle 2.20:* Waschschritte

Puffer	Temperatur	Dauer (in min)	Anzahl
Hybridisierungspuffer (1000 $\mu$ l)	60 °C	10	1 x
2 x SSC	60 °C	20	3 x
2 x SSC mit RNasen	37 °C	60	1 x
2 x SSC	RT	10	1 x
0,2 x SSC	60 °C	30	2 x
1 x MAB	RT	15	2 x

**RNase A Stammlösung** 10 mg/ml RNase A gelöst in TE Puffer bei 100 °C für 10 min und anschließend bei -20 °C gelagert.

**Torula RNA (10 mg/ml)** 10 mg/ml Torula RNA geschüttelt bei 37 °C ü. N. in DEPC H<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend Zentrifugation der Lösung bei 6000 U/min für 10 min; Überstand aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

**5 x MAB (Maleinsäure Puffer)** 500 mM Maleinsäure; 750 mM NaCl in dH<sub>2</sub>O, pH 7,5; autoklaviert.

**20 x SSC** 3 M NaCl und 0,3 M Na-Citrat in dH<sub>2</sub>O, pH 7,2–7,4.

### 2.12.6 Antikörper-Inkubation

Die Hybride aus Digoxigenin-markierter Sonden-RNA und endogener mRNA an denen alkalische Phosphatase gekoppelt waren, konnten mittels eines Digoxigenin spezifischen Antikörpers (Fab-Fragment) nachgewiesen werden. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die Embryonen vor Zugabe des Detektions-Antikörpers in 2 % BMB und 20 % hitzeinaktiviertem Pferdeserum inkubiert.

*Tabelle 2.21:* Antikörper-Inkubation

Puffer	Temperatur	Dauer	Anzahl
MAB + 2 % BMB	RT	60 min	1 x Wippe

MAB + 2 % BMB + 20 % Serum	RT	60 min	1 x Wippe
MAB + 2 % BMB + 20 % Serum + Antikörper (1:5000)	4 °C	ü. N.	1 x Wippe
MAB	RT	30 min	4 x Wippe

**Boehringer Mannheim Blocking Reagent (BMB), Stammlösung** 10 % BMB wird in 1 x MAB bei 60 °C gelöst; anschließend autoklaviert und bei -20 °C gelagert.

**MAB/BMB** 2 % BMB in 1 x MAB.

**MAB/BMB/HS** 2 % BMB; 20 % hitzeinaktiviertes Pferdeserum in 1 x MAB.

### 2.12.7 Farbentwicklung

Alkalische Phosphatase setzt die Substrate NBT/BCIP zu einem dunkelvioletten Farbstoff um. Die Färbereaktion erfolgte unter Lichtabschluss bis der gewünschte Kontrast einer hohen Signalintensität bei schwacher Hintergrundfärbung erreichte.

*Tabelle 2.22: Farbentwicklung*

Puffer	Temperatur (in °C)	Dauer	Anzahl
APB	4 (auf Eis)	5 min	2 x Wippe
APB + NBT/BCIP	4 (auf Eis)	5 min bis 3 Tage	1 x Wippe

**APB (Alkalische Phosphatase Puffer)** 100 mM Tris-HCl, pH 9,0; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM NaCl und 0,1 % Tween-20 in dH<sub>2</sub>O.

**BCIP Lösung** 50 mg/ml in 100 % DMF; Lagerung bei -20 °C.

**Färbereaktion** 1,75 µl/ml NBT und 3,5 µl/ml BCIP in APB.

**NBT Lösung** 100 mg/ml NBT in 70 % DMF; Lagerung bei -20 °C.

### 2.12.8 Abstoppen der Färbereaktion und Konservierung der Präparate

Nach dem Erreichen der gewünschten Farbintensität wurden die Embryonen in 1 x PBS gespült, in einer absteigenden Methanolreihe (100 %; 75 %; 50 %; 25 %) rehydriert und anschließend in MEMFA fixiert. Die whole mount *in situ* Hybridisierung mit pigmentierten Embryonen erforderte ein anschließendes Bleichen. Der abschließenden Auswertung folgte die Lagerung der Embryonen bei 4 °C.

**Methanolreihe** 100 %; 75 %; 50 % und 25 % (v/v) Methanol in dH<sub>2</sub>O.

**Bleichlösung für Embryonen** 50 % (v/v) Formamid und 1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 5 x SSC.

## 2.13 Immunfärbung an ganzen Embryonen

### 2.13.1 Nachweis apoptotischer Zellen durch TUNEL-Analyse

Die TUNEL-Analyse erfolgte mit kleinen Änderungen nach Hensey und Gautier, 1998. Während der Apoptose kommt es zur Fragmentierung der DNA. Dadurch entstehen freie DNA-Abbruchfragmente sogenannte „nick-ends“. Unter Zuhilfenahme der TUNEL-Analyse (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP digoxigenin nick end labeling*) wird an deren Enden durch die Aktivität einer terminalen-Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT) Digoxigenin-markiertes dUTP angelagert. Dieses kann durch spezifische Antikörper detektiert werden. Nach der Kultivierung bis zum gewünschten Entwicklungsstadium wurden die Embryonen 1 h in MEMFA fixiert, in 100 % Ethanol überführt und zur Permeabilisierung in Dent's ü. N. bei -20 °C gelagert. Nach Rehydrierung für jeweils 5 min in 100 %; 70 %; 50 % Methanol/H<sub>2</sub>O

und 30 % Methanol/1 x PBS wurden folgende Waschschritte durchgeführt: 2 x 5 min in 1 x PBS, 2 x 15 min in PBTw und 2 x 15 min in 1 x PBS. Nach Äquilibrierung der Embryonen in TdT-Puffer für 1 h wurden diese in 200  $\mu$ l TdT-Puffer mit 0,5  $\mu$ M Digoxigenin-11-dUNP (Roche) ü. N. bei 4 °C umgepuffert. Um die Reaktion abzustoppen, inkubierten die Embryonen 2 x 1 h in PBS/EDTA bei 65 °C, nach 4-maligem Waschen in 1 x PBS für jeweils 1 h und Blockieren in 20 % Pferdeserum/PBS für 1 h in 20 % Pferdeserum in 1 x PBS und einer 1:5000 Verdünnung von anti-Digoxigenin/AP (Roche) ü. N. bei 4 °C. Um den nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde 6 x 1 h in 1 x PBS gewaschen und anschließend noch ü. N. in 1 x PBS inkubiert. Die nachfolgende Färbereaktion erfolgte wie für die WMISH beschrieben.

**Dent's** 20 % DMSO mit 80 % Methanol.

**PBTw** 1 x PBS + 0,05 % Tween 20.

**TdT-Puffer mit 0,5  $\mu$ M dUTP** 1:100 (2  $\mu$ l) terminale Desoxynucleotidyltransferase + 0,4  $\mu$ l Digoxigenin UTP + 40  $\mu$ l 5 x Reaktionspuffer; auf 200  $\mu$ l 1 x PBS.

### 2.13.2 Nachweis mitotisch aktiver proliferierender Zellen durch Detektion von phosphoryliertem Histon 3 (pH3)

Zur Untersuchung von Zellproliferation macht man sich das Vorkommen von phosphoryliertem Histon H3 während der späten G2-Phase bis zur Telophase im Zellzyklus zunutze (Hendzel *et al.*, 1997; Paulson und Taylor, 1982). Durch einen spezifischen Antikörper gegen die phosphorylierte Form des Histon H3 (pH3) können mitotische Zellen nachgewiesen werden (Saka und Smith, 2001). Nach Fixierung der Embryonen in MEMFA wurden diese in einer aufsteigenden Methanolreihe (25 %, 50 %, 75 % Methanol in dH<sub>2</sub>O, 100 % Methanol) dehydriert und anschließend in Dent's transferiert und ü. N. inkubiert. Die Rehydrierung der Embryonen erfolgte in einer absteigenden Methanolreihe (100 %, 75 %, 50 % Methanol in dH<sub>2</sub>O und 25 % Methanol in 1 x PBS, 5 min jeder Schritt), gefolgt von 3 x 5 min Waschen in 1 x PBS. Anschließend wurde für 4 h mit 20 % Pferdeserum in 1 x PBS blockiert und über Nacht bei 4 °C in 1:200 Anti-Histo-Phospho3 (anti-rabbit-PH3) in 20 % Pferdeserum/5 % DMSO in 1 x PBS inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Embryonen 2 x 2 h in PBS-TB, 1 x 2 h in PBS-TBN, 3 x 5 min in PBS-TB und anschließend ü. N. in PBS-TB bei 4 °C gewaschen. Die Inkubation des Zweitantikörpers (anti-rabbit, Sigma, mit einer 1:1000 Verdünnung in 20 % Pferdeserum/5 % DMSO in 1 x PBS erfolgte über 5 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Embryonen intensiv gewaschen (2 x 30 min PBS-TB, 1 x 30 min PBS-TBN, 3 x 5 min PBS-TB) und abschließend ü. N. bei 4 °C aufbewahrt. Die Färbereaktion erfolgte wie für die WMISH beschrieben.

**PBS-TB** 1 x PBS; 0,05 % Tween-20; 0,2 % BMB.

**PBS-TBN** 1 x PBS; 0,05 % Tween-20; 0,2 % BMB; 0,3 M NaCl.

## 2.14 Anfertigung von Vibratomschnitten

Mittels eines Vibratoms wurden 30  $\mu$ m Gewebeschnitte angefertigt. Dazu waren 1,5 ml Gelatin/Albumin-Einbettungsmedium in einem Wägeschälchen auf Eis mit 105  $\mu$ l 25 % Glutardialdehyd-Lösung zu vermischen und luftblasenfrei in eine Kunststoffform einzugießen. Die ausgewählten Embryonen wurden für ca. 10 min in Einbettungsmedium äquilibriert und auf den in der Zwischenzeit verfestigten Sockel gebettet. Überschüssiges Medium war zu entfernen und der Embryo musste mit 1,5 ml Einbettungsmedium, vermischt mit 105  $\mu$ l 25 % Glutardialdehyd-Lösung, überschichtet werden. Der so verfestigte Block wurde aus der Kunststoffform herausgelöst. Unter dem Stereomikroskop konnte er mit einer Rasierklinge trapezförmig getrimmt werden. Das Objekt wurde anschließend mit Sekundenkleber so auf einen Metallträger geklebt, dass der Embryo in der benötigten Orientierung ausgerichtet war. Der Metallträger wurde in das Vibratom

eingespannt, unter Wasser gesetzt, sodass 30  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt und letztere mit einem Pinsel auf mit Wasser und Tween benetzte Objektträger überführt werden konnten. Nach kurzem Antrocknen standen die Schnitte mit Mowiol-Lösung eingebettet für die mikroskopische Auswertung bereit.

**Gelatine/Albumin Einbettungsmedium** 1 x PBS; 4,88 mg/ml Gelatine; 0,3 g/ml Albumin; 0,2 mg/ml Sucrose. Die Gelatine wurde durch Erhitzen auf ca. 60 °C gelöst, nach dem Abkühlen wurden Albumin und Sucrose zugefügt. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

**Mowiol-Lösung** 9,6 g Mowiol in 19,35 ml 100 % Glycerin lösen; 1 h rühren. Zugabe von 24 ml dH<sub>2</sub>O, 2 h rühren. Zugabe von 48 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5); 10 min erhitzen auf 50 °C; 15 min bei 5000 U/min abzentrifugieren. Überstand aliquotieren und bei -20 °C lagern.

## 2.15 DNA Methoden

### 2.15.1 Transformation von Bakterienzellen

#### 2.15.1.1 Chemische Transformation

Zur Transformation von Plasmiden in *E. coli* XL1-Blue-Zellen wurde ein 60  $\mu\text{l}$  Aliquot chemisch kompetenter Bakterienzellen (Lagerung bei -80 °C) auf Eis aufgetaut, bis zu 5  $\mu\text{l}$  (50–500 ng) DNA hinzugegeben und der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Durch Hitzeschock bei 42 °C, 45 s und Inkubation für 3 min auf Eis nahmen die Zellen das Plasmid auf. Dem Ansatz wurden 800  $\mu\text{l}$  LB-Medium hinzugefügt und die Bakterien für 30 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln angezogen. Auf vorher angewärmte LB-Agarplatten, die das entsprechende Resistenz-tragende Antibiotikum enthielten, wurden 200  $\mu\text{l}$  der Bakteriensuspension mittels steriler Glaskügelchen ausplattiert und ü. N. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

#### 2.15.1.2 Elektrische Transformation

Zur Elektrottransformation fand das Elektroporationsgerät „*E. coli* Pulser“ Verwendung. Vor der Pulsgabe erfolgten alle Schritte auf Eis. Dazu wurde ein Aliquot mit 40  $\mu\text{l}$  elektrokompenten Bakterien in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß auf Eis aufgetaut und mit 1–2  $\mu\text{l}$  (50–500 ng) DNA vermischt. Der Transformationsansatz wurde anschließend vollständig in eine Elektroporationsküvette (Eurogentec; d = 0,1 cm) überführt und luftblasenfrei an den Boden der Küvette geklopft. Zur Elektroporation fand ein Puls von 2,4 kV Anwendung. Sofort nach der Pulsgabe wurden 0,5 ml LB-Medium in die Küvette pipettiert und gut mit der Bakteriensuspension vermischt. 200  $\mu\text{l}$  dieses Ansatzes wurden mittels steriler Glaskügelchen auf zuvor bei 37 °C angewärmte LB-Agarplatten ausplattiert. Die Platten enthielten ein der Plasmidresistenz entsprechendes Selektivantibiotikum. Des Weiteren bei Verwendung des pGEM-T-Plasmids, je 60  $\mu\text{l}$  IPTG und X-Gal, welche eine spätere „Blau-Weiß-Selektion“ zur Kontrolle einer erfolgreichen Insertion ermöglichten. Die mit Bakteriensuspension benetzten Kügelchen wurden außerdem zusätzlich auf eine zweite LB-Agarplatte mit gleichen Zusätzen wie oben gegeben, um einen weniger dichten Koloniebewuchs zu erzielen. Die Platten inkubierten ü. N. bei 37 °C im Brutschrank.

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

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

### 2.15.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

#### 2.15.2.1 Präparativer Maßstab, Mini-Präparation

Für den präparativen Maßstab wurden 3 ml LB-Medium, 3  $\mu\text{l}$  Selektionsantibiotikum (100 mg/ml) und ein mit einem sterilen Zahnstocher gepickten Klon in ein 12 ml Eppendorfgefäß ü. N. bei 37 °C im

Schüttler kultiviert und am nächsten Tag 1,5 ml der Übernachtskultur in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und bei 14000 U/min für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 150  $\mu$ l TELT-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von 15  $\mu$ l Lysozymlösung wurden die Zellen bei RT für 5 min inkubiert und danach 2 min bei 95 °C lysiert. Nach 15-minütigem Zentrifugieren bei 14000 U/min wurden die Zelltrümmer, genomische DNA und Proteine in Form eines Pellets entnommen und verworfen. Durch Zugabe von 100  $\mu$ l Isopropanol und 200  $\mu$ l 70 %igem Ethanol erfolgte die Fällung der Plasmid-DNA und das nach Zentrifugation entstandene Pellet trocknete an der Luft. Das Pellet wurde anschließend in 30  $\mu$ l TE-Puffer (versetzt mit RNase) aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Die mittels der Plasmidminipräparation erhaltene Plasmid-DNA diente zur Überprüfung des korrekten Einbaus des Inserts in den entsprechenden Vektor durch Restriktionsanalyse (Abschnitt 2.15.4).

**TELT Puffer** 2,5 M LiCl; 62,5 mM EDTA und 0,4 % (v/v) Triton X-100 in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; Lagerung bei 4 °C.

**Lysozym Lösung** 10 mg/ml Lysozym in dH<sub>2</sub>O.

**RNase Puffer** Stammlösung 10 mg/ml von RNase A gelöst in in TE Puffer, erwärmt bei 100 °C für 10 min und gelagert bei -20 °C.

### 2.15.2.2 Analytischer Maßstab, Midi-Präparation

Für den analytischen Maßstab von DNA fand das QIAGEN Plasmid Midi Kit Verwendung. Die Präparation erfolgte hierbei nach dem Protokoll des Herstellers durch die Trennung der Plasmid-DNA von den übrigen Zellbestandteilen unter Zuhilfenahme einer Säulenmatrix. Die Analyse der Reaktionsansätze erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (Abschnitt 2.15.6).

## 2.15.3 Klonierung

### 2.15.3.1 Klonierung von PCR-Fragmenten

Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wurde das gewünschte DNA-Fragment durch PCR mit dem Primer für das 5' Ende (*sense*) und einem Primer für das 3' Ende (*antisense*) der Sequenz amplifiziert. Zur mutationsfreien Vermehrung von DNA-Fragmenten fand die Pfx-Polymerase Anwendung mit *proofreading* Funktion. Für die Klonierung in den Vektor erhielten beide Primer zusätzliche Restriktionsschnittstellen.

Reaktionsansatz mit Pfx-Polymerase für präparative Zwecke:

Reaktionsansatz:

- x  $\mu$ l 100 ng DNA-Template
- 0,5  $\mu$ l 200 nM 5' Primer
- 0,5  $\mu$ l 200 nM 3' Primer
- 22,5  $\mu$ l Pfx SuperMix (Pfx-Polymerase, Puffer, Magnesium, dNTPs)

Reaktionsprogramm:

- Initialisierung 95 °C für 5 min
- Denaturierung 95 °C für 15 s
- Annealing 60–65 °C für 30 s, 35 Zyklen
- Elongation 68 °C für 1 min/1 kb

Reaktionsansatz mit Taq-Polymerase für analytische Zwecke:

## Reaktionsansatz:

- x  $\mu\text{l}$  100 ng DNA-Template
- 1  $\mu\text{l}$  10 pmol 5' Primer
- 1  $\mu\text{l}$  10 pmol 3' Primer
- 0,5  $\mu\text{l}$  0,2 mM dNTP-Mix
- 2,5  $\mu\text{l}$  2,5 mM  $\text{MgCl}_2$
- 2,5  $\mu\text{l}$  10 x Taq-Puffer
- 0,5  $\mu\text{l}$  Taq-Polymerase (0,5 U)
- auf 25  $\mu\text{l}$  mit  $\text{H}_2\text{O}$  auffüllen

## Reaktionsprogramm:

- Initialisierung 95 °C für 2 min
- Denaturierung 95 °C für 45 s
- Annealing 55–60 °C für 45 s, 25–35 Zyklen
- Elongation 72 °C für 1 min

**dNTPs** dATP; dGTP; dCTP; dTTP; je 100 mM zu gleichen Anteilen vermischt (Endkonzentrationen jeweils 25 mM).

Nach der PCR wurden zum PCR-Ansatz 20 U der Endonuklease DpnI gegeben, um die methylierte DNA-Matrix (Mutterstrang) zu verdauen (37 °C, 1,5 h). Anschließend erfolgte die Aufreinigung des PCR-Ansatzes mit dem PCR-Purification Kit (QIAGEN), sowie nach vorheriger Verdauung mit den entsprechenden Endonukleasen (nach Angaben des Herstellers, NEB, Fermentas), die Überprüfung des PCR-Ansatzes im Agarosegel (Abschnitt 2.15.2.2). Die geschnittene DNA wurde nach den Restriktionen gereinigt (PCR-Purification Kit, QIAGEN) und mit dem Vektor ligiert. Der Vektor, in welchen das PCR-Fragment kloniert werden sollte, wurde ebenfalls mit den entsprechenden Endonukleasen geschnitten (10  $\mu\text{g}$  Vektor-DNA, nach Angaben des Herstellers, NEB, Fermentas), gereinigt (PCR-Purification Kit, QIAGEN) und mit dem PCR-Fragment ligiert. Konnte nur ein Enzym für die Ligation des 5'- und 3'-Endes verwendet werden, verhinderte die Dephosphorylierung (alkalische Phosphatase, Roche, nach Herstellerangaben) die Religation des geschnittenen Vektors.

Ansatz für die Ligation 10  $\mu\text{l}$ : Die Ligation erfolgte mittels T4-Ligase, die neue Phosphodiesterbrücken zwischen den klebrigen Enden von DNA-Fragmenten katalysiert und sie somit verknüpft.

- 300–400 ng Insert
- 50 ng Vektor
- 1  $\mu\text{l}$  T4 DNA-Ligase Puffer (10 x)
- 1  $\mu\text{l}$  T4 DNA-Ligase (5 U/ $\mu\text{l}$ )
- auf 10  $\mu\text{l}$  mit  $\text{H}_2\text{O}$  auffüllen

Die Ligation erfolgte ü. N. bei 16 °C. 3  $\mu\text{l}$  des Ansatzes wurden zur Transformation in chemokompetente XL1 blue *E. coli*-Zellen auf Eis gehalten. Zur Kontrolle der Vektorpräparation erfolgte die Mitführung eines Ligationsansatzes ohne Insert. Kontrollen für die Aktivität der Ligase, die Aufnahmefähigkeit der chemokompetenten *E. coli*-Zellen und deren Resistenzen folgten. Die chemische Transformation erfolgte wie in Abschnitt 2.15.1.1 beschrieben. Pro Konstrukt wurden zwischen 3 und 15 Kolonien in jeweils 3 ml LB-Antibiotika-Medium (30 ng/ $\mu\text{l}$  Kanamycin, 100 ng/ $\mu\text{l}$  Ampicillin) überimpft und eine Plasmid-Mini Präparation (Abschnitt 2.15.2.1) durchgeführt. Die Klone wurden durch Restriktion mit Endonukleasen (Abschnitt 2.15.4) oder unter Zuhilfenahme der DNA Sequenzierung (Abschnitt 2.15.8) untersucht. Enthielt ein Klon das erwartete Konstrukt, erfolgte die erneute Transformation der DNA in XL1 blue *E. coli*-Zellen, welche anschließend auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen wurden. Es folgte die Animpfung einer Vorkultur (100 ml) mit anschließender Inkubation für eine Midi-Plasmid-Präparation (Abschnitt 2.15.2.2).

### 2.15.3.2 Umklonierung von Plasmid-DNA

Für unterschiedliche Untersuchungen des gleichen Proteins in verschiedenen Organismen konnte teilweise die entsprechende DNA aus einem Vektor in einen anderen umkloniert werden. Enthielten sowohl der Ausgangsvektor als auch der Ziel-Vektor geeignete Restriktionsschnittstellen, erfolgte die Umklonierung durch Spaltung mit Restriktionsenzymen. Das Ausgangskonstrukt mit dem Insert (10  $\mu\text{g}$  DNA, 20 U, 1 h) und ebenso der Zielvektor (10  $\mu\text{g}$  DNA, 20 U, 1 h) wurden mit zwei Endonukleasen entsprechend der Herstellerangaben verdaut. Die Abtrennung des Inserts vom ursprünglichen Vektor erfolgte durch Agarosegel-Elektrophorese (Abschnitt 2.15.6). Das Insert wurde ausgeschnitten, aus dem Gel eluiert (Gel Extraction-Kit), mit dem Ziel-Vektor ligiert und die Klone wurden anschließend wie beschrieben (mittels Restriktionsverdau) überprüft.

### 2.15.3.3 PCR-vermittelte *in vitro*-Mutagenese

Mutationen eines bereits bestehenden Konstrukts erfolgten durch gerichtete Mutagenese mit dem Quik-Change™ Site-Directed Mutagenesis Kit nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde bei der gerichteten Mutagenese in den Primern ein selektiver Basen- bzw. Aminosäureaustausch im Vergleich zur Matrix vorgenommen. Hierbei wurden in einer PCR-Amplifikation des gesamten Matrizenplasmids mit Pfu-Polymerase zwei komplementäre Oligonukleotide, welche die gewünschte Mutation enthielten, direkt eingebaut und zu zwei zirkulären, nicht verknüpften DNA Strängen, elongiert. Die methylierte Matrizen-DNA degradierte anschließend mit dem methylierungsabhängigen Restriktionsenzym DpnI, während das mutierte, unmethylierte PCR-Syntheseprodukt erhalten blieb. Nach Transformation von XL1-Blue Zellen, wurden die Strangbrüche im Vektor durch bakterielle Reparaturenzyme repariert. Der Erfolg der Mutagenese erfolgte im präparativen Verdau (Abschnitt 2.15.4) mit sich anschließender Überprüfung durch DNA-Sequenzierung (Abschnitt 2.15.8).

## 2.15.4 Restriktionsverdau

Mittels Restriktionsendonukleasen wurde die DNA an spezifischen palindromen Erkennungssequenzen geschnitten. Je nach Restriktion erfolgte die Spaltung entweder in der Mitte der Erkennungsstelle (d. h. glatte *blund* Enden) oder versetzt (d. h. klebrige *sticky* Enden). Diese Eigenschaft wurde zur Analyse von DNA, zum Ausschneiden bestimmter DNA-Fragmente oder zur Linearisierung von Vektoren vor Klonierungen genutzt. Für den präparativen sowie den analytischen Verdau wurde die DNA mit der gewünschten Endonuklease in dem für das Enzym empfohlenen Restriktionspuffer für 1–16 h bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle der vollständigen Spaltung erfolgte anschließend eine Auftrennung der Fragmente mittels Gelelektrophorese (Abschnitt 2.15.6).

Ansatz für den präparativen Verdau:

- 100–200 ng Plasmid-DNA
- 1  $\mu\text{l}$  10 x Restriktionspuffer
- 1  $\mu\text{l}$  Restriktionsendonukleasen (1:1; je 50 U/ $\mu\text{l}$ )
- auf 10  $\mu\text{l}$  mit dH<sub>2</sub>O auffüllen

Nach 1,5–2 h Inkubationszeit erfolgte die Auftrennung des kompletten Ansatzes mittels Agarosegelelektrophorese (Abschnitt 2.15.6). Zur Vorbereitung auf eine Ligation von DNA-Fragmenten wurde sowohl das Insert als auch der Vektor mittels der gleichen Restriktionsendonukleasen verdaut.

Ansatz für den analytischen Verdau:

- 0,5–5  $\mu\text{g}$  DNA
- 5  $\mu\text{l}$  10 x Restriktionspuffer

- 1  $\mu\text{l}$  Restriktionsendonukleasen (1:1; je 50 U/ $\mu\text{l}$ )
- auf 50  $\mu\text{l}$  mit  $\text{dH}_2\text{O}$  auffüllen

Das Reaktionsgemisch wurde ü. N. bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels präparativer Agarosegelelektrophorese (Abschnitt 2.15.6) aufgereinigt.

### 2.15.5 Reinigung von DNA

Gereinigt wurde der PCR-Reaktionsansatz bzw. der Restriktionsverdau unter Zuhilfenahme des High Pure PCR cleanup Micro Kits von Roche. Hierbei bindet in Anwesenheit des chaotropen Salzes Guanidinthiocyanat die DNA selektiv an einer Silikamatrix und wird anschließend durch eine Reihe von Wasch- und Zentrifugationsschritten von noch vorhandenen Primern, Nukleotiden, Proteinen und Salzen gereinigt. Die DNA wurde letztendlich durch Zugabe von 20  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$  nach 15-minütiger Einwirkzeit eluiert.

### 2.15.6 Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente aufzutrennen, wurden diese in einer Agarosematrix einem horizontalen elektrischen Feld ausgesetzt. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden Gele aus 0,8-2,2 % (w/v) Agarose in TBE-Puffer verwendet und zum Nachweis der DNA-Banden 0,5  $\mu\text{l}/\text{ml}$  Ethidiumbromid zugegeben. Vor dem Auftragen der DNA-Proben in die Geltaschen müssen diese mit 1 Vol. DNA-Probenpuffer versetzt werden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 70 V. Die auf diese Weise erhaltenen Bandenmuster sind unter Zuhilfenahme eines UV-Transilluminators visualisiert und fotografisch festgehalten worden. Die Größe der Fragmente konnte anhand eines mitgeführten Molekulargewichtsmarkers ermittelt werden.

**2 x DNA-Probenpuffer** 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,025 % Bromphenolblau; 0,025 % Xylencyanol; 30 % (v/v) Glycerin.

**DNA-Molekulargewichtsstandard one kb Ladder** 1 x DNA-Probenpuffer; 1/20 Vol. 10 x Boehringer Puffer H; 0,4 Vol. 1 x TE; 50 ng/ $\mu\text{l}$  One kb Ladder (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , Invitrogen).

**10 x TBE Puffer (Tris/boric acid/EDTA buffer)** 0,89 M Tris; 0,89 M Borsäure und 20 mM EDTA in  $\text{dH}_2\text{O}$ .

**Glycerol Ladepuffer** 10 mM EDTA; 30 % Glycerol (v/v); 0,025 % Bromphenolblau und 0,025 % Xylencyanol in 10mM Tris-HCl, pH 7,5.

### 2.15.7 Isolierung von PCR-Produkten aus Agarosegelen

Erhielt man PCR Produkte verschiedener Längen, so erfolgte die Isolation eines oder mehrerer Fragmente durch Gelextraktion unter Zuhilfenahme des QIAEX<sup>®</sup> Gel Extraction Kit. Hierzu wurden die betreffenden Banden nach Auftrennung des gesamten Reaktionsansatzes in einem 1–1,5 %igen Agarosegel über einem UV-Leuchttisch bei einer Wellenlänge von 366 nm ausgeschnitten und in 1,5 ml Eppendorfgefäßen aufgenommen. Zur Isolierung dienten die Angaben des Herstellers. Die gebundene DNA konnte mit 30  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$  und Zentrifugation für 1 min bei 16000 x g eluiert werden. Die Lagerung des Eluats erfolgte bei -20 °C.

### 2.15.8 Sequenzierung

Bei der hierbei verwendete Methode des Cycle Sequencing handelt es sich um eine Modifikation des traditionellen Kettenabbruch-Verfahrens nach Sanger *et al.*, 1977. Im Ansatz sind Didesoxyanaloga der vier verschiedenen dNTPs (ddNTPs) enthalten, welche je nach Base mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind und in die neusynthetisierten DNA-Stränge eingebaut werden. Aufgrund des Fehlens der 3'-Hydroxylgruppe bei der Didesoxyribose kommt es zu statistisch verteilten Kettenabbrüchen, wodurch ein Gemisch unterschiedlicher Kettenlängen erzeugt wird.

Der Reaktionsansatz betrug 10  $\mu\text{l}$  und beinhaltete:

Reaktionsansatz:

- 200-400 ng Plasmid
- 8 pmol Primer (SP6, T7, CMV)
- 1,5  $\mu\text{l}$  Sequenzierungspuffer
- 1,5  $\mu\text{l}$  Sequenzierungsmix (dNTPs, fluoreszenzmarkierte ddNTPs, Taq-DNA-Polymerase)
- auf 10  $\mu\text{l}$  mit  $\text{H}_2\text{O}$  auffüllen

Reaktionsprogramm:

- Initialisierung 96 °C für 2 min
- Denaturierung 96 °C für 10 s
- Annealing 55 °C für 15 s, 25 Zyklen
- Elongation 60 °C für 4 min

Das Sequenzierprodukt wurde mit 0,5  $\mu\text{l}$  EDTA (0,25 M), 1  $\mu\text{l}$  Natrimacetat (3 M) und 50  $\mu\text{l}$  100 % Ethanol gefällt und nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 14000 U/min das Pellet mit 70  $\mu\text{l}$  70 % Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 15  $\mu\text{l}$  Formamid-Mix (Hi-Dye) aufgenommen. Die Auftrennung der markierten Fragmente erfolgte automatisch unter Zuhilfenahme des ABI Prism<sup>TM</sup>-Sequenziergerätes im ZMG-Labor der Uniklinik Halle. Computergestützte Sequenzanalysen konnten mittels der Programme Lasergene und des BLAST-Suchsystems für Datenbanken durchgeführt werden.

## 2.16 RNA Methoden

Zur Inaktivierung von RNasen wurden die zum Arbeiten mit RNA bestimmten Gefäße und Lösungen autoklaviert. Hitzelabile Substanzen wurden in DEPC-dH<sub>2</sub>O gelöst.

**DEPC-dH<sub>2</sub>O** 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat in dH<sub>2</sub>O; Inkubation für 4-12 h bei 37 °C und anschließendes Autoklavieren für 30 min bei 121 °C.

### 2.16.1 RNA-Extraktion

#### 2.16.1.1 Embryonalstadien, Oozyten und animale Gewebeexplantate

Zur Extraktion von Gesamt-RNA aus *Xenopus laevis* mussten ca. 20-30 Embryonen des gewünschten Alters (bzw. bei Oozyten oder animalen Kappen die Spitze eines 1,5 ml Eppendorfgefäßes) in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte über das RNeasy Mini Kit der Firma QIAGEN. Dieses Säulensystem beruht auf dem Prinzip, dass nach Zugabe von Ethanol die RNA selektiv an die Silicagel-Matrix bindet und Kontaminanten wie DNA und Proteine effektiv ausgewaschen werden können. Das Gewebe wurde hierzu mittels Spritzen verschiedener Kanülengröße in 600  $\mu\text{l}$  Lysispuffer (RLT) homogenisiert und anschließend bei 14000 U/min für 3 min zentrifugiert. Das gereinigte Lysat wurde mit 600  $\mu\text{l}$  70 % Ethanol versetzt, auf die Säule gegeben und für 15 s bei 10000 U/min zentrifugiert. Daran schlossen sich mehrere Waschstritte mit 700  $\mu\text{l}$  RW1-Puffer und zweimaliges Waschen mit 500  $\mu\text{l}$  RPE-Puffer und jeweiliger Zentrifugation an. Auf die an der Säulenmembran gebundene RNA wurde 30  $\mu\text{l}$  RNase freies Wasser gegeben und die RNA durch Zentrifugation für 1 min bei 10000 U/min in ein steriles Eppendorfgefäß eluiert.

#### 2.16.1.2 Adulte Gewebe und Organe

Nach der Präparation von Testis aus *Xenopus laevis* Männchen und Ovar aus Weibchen wurden den Tieren alle Gewebe und Organe entnommen und mit 1 x MBS blutfrei gewaschen. Die zur RNA-Extraktion bestimmten Gewebe und Organe wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und mit einem in Flüssigstickstoff gekühlten Mörser pulverisiert. Das Pulver wurde in vorgekühlten 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäßen

in 50  $\mu\text{l}$  Aliquots aufgeteilt und bis zur Extraktion bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die anschließende RNA-Extraktion erfolgte wie in Abschnitt 2.16.1.1 beschrieben.

### 2.16.2 Reverse Transkription

Mittels Enzyms Reverse Transkriptase konnte die isolierte Gesamt-RNA in komplementäre cDNA umgewandelt und anschließend in einer PCR als Matrix eingesetzt werden. Der Reaktionsansatz beinhaltete:

- 250-300 ng RNA
- 1  $\mu\text{l}$  Random Hexamer Primer (0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
- auf 12  $\mu\text{l}$  RNase freies Wasser auffüllen

Die Inkubation erfolgte für 10 min bei  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  und anschließender Lagerung direkt auf Eis. Folgende Komponenten wurden hinzu pipettiert:

- 4  $\mu\text{l}$  5 x Reverse Transkriptase Reaktionspuffer
- 1  $\mu\text{l}$  RNase Out Ribonuclease Inhibitor
- 2  $\mu\text{l}$  dNTPs (10 mM)
- 1  $\mu\text{l}$  Reverse Transkriptase

Es folgte eine Inkubation über 12 min bei  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  und anschließend über 60 min bei  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die Inaktivierung des Enzyms geschieht über 10 min bei  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die synthetisierte cDNA konnte nun für die semiquantitative PCR eingesetzt werden.

### 2.16.3 *In vitro* Synthese von Cap-mRNA für Mikroinjektionen

Die Herstellung der synthetischen mRNA für Mikroinjektionen gelang unter Zuhilfenahme des mMACHINE<sup>TM</sup> SP6 Reaktionssystems (Ambion). Dabei wird der RNA während der *in vitro* Synthese am 5'-Ende eine 7-Methylguanosin-“Kappe“ angefügt.

- 10  $\mu\text{l}$  2 x NTP/Cap
- 2  $\mu\text{l}$  10 x Reaktionspuffer
- 1  $\mu\text{g}$  lineare DNA-Matrize
- 2  $\mu\text{l}$  Enzym Mix

Nach Inkubation über 1,5 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurde 1  $\mu\text{l}$  RNase-freie DNaseI (Ambion) hinzugefügt und der Ansatz für weitere 15 min bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert, um die DNA-Matrize abzubauen. Beinhaltete das verwendete Plasmid anstatt eines SP6- einen T7- oder T3-RNA-Polymerase Promoter, so kam für die RNA-Synthese die entsprechende Polymerase zur Anwendung. Die Analyse der Transkription mittels 1  $\mu\text{l}$  des Reaktionsansatzes für die Agarosegelelektrophorese, erlaubte die anschließende Bestätigung des Erfolges (Abschnitt 2.15.6).

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

Zur Synthese von markierten *Antisense*-RNA-Sonden für *in situ* Hybridisierungen wurden *in vitro* Transkriptionen in Anwesenheit von Digoxigenin-markiertem rUTP durchgeführt.

- 5  $\mu\text{l}$  5 x Transkriptionspuffer (Stratagene)
- 1  $\mu\text{l}$  DTT (0,75 M)
- 1  $\mu\text{l}$  Rnase-Out (20 U/ $\mu\text{l}$ ; Invitrogen)

- 3  $\mu\text{l}$  Digoxigenin-Mix
- 1,5  $\mu\text{l}$  RNA Polymerase (50 U/ $\mu\text{l}$ )
- 1  $\mu\text{g}$  lineare DNA-Matrize
- auf 25  $\mu\text{l}$  RNase freies  $\text{dH}_2\text{O}$  auffüllen

Der Ansatz wurde 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend die DNA-Matrize nach Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  RNase-freier DNaseI (Ambion) 15 min bei 37 °C verdaut. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Transkription wurde 1  $\mu\text{l}$  des Reaktionsansatzes mittels Agarosegelelektrophorese (Abschnitt 2.15.6) analysiert.

**Digoxigenin-Mix** 10  $\mu\text{l}$  rATP (10 mM); 10  $\mu\text{l}$  rCTP (10 mM); 10  $\mu\text{l}$  rGTP (10 mM); 6,5  $\mu\text{l}$  rUTP (10 mM); 3,5  $\mu\text{l}$  Dig-rUTP (10 mM, Roche).

### 2.16.5 Aufreinigung synthetisch hergestellter RNA

Um synthetische RNA von Salzen, Enzymen und Nukleotiden abzutrennen, wurden die Reaktionsansätze unter Zuhilfenahme des RNeasy Mini Kits (QIAGEN) aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte dabei nach den Angaben des Herstellers. Die RNA wurde anschließend mit 20  $\mu\text{l}$  RNase-freiem  $\text{dH}_2\text{O}$  und 1-minütiger Zentrifugation bei 8000 x g in ein Eppendorfgefäß eluiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### 2.16.6 Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

Die Quantifizierung der RNA bzw. DNA erfolgte mittels NanoDrop-1000 Spektrophotometer bei einer Absorption von 260 nm unter Auftragung von 1  $\mu\text{l}$  unverdünnter Probe auf die Messvorrichtung. Zur Überprüfung der Reinheit wurden sowohl das A260/A230-Verhältnis (RNA/organische Verbindungen) als auch das A260/A280-Verhältnis (RNA/Proteine) gemessen.

## 2.17 Zellbiologische Methoden

### 2.17.1 Kultivierung der Zelllinie

Zum Studium der Zelllokalisierung bzw. für die Interaktionsstudien der SREBP und INSIG-Varianten wurden diese in HeLa-Zellen, einer Zelllinie aus einem Gebärmutterhalskarzinom (Gey *et al.*, 1952) und Neuroblastom-B35-Zellen, überexprimiert und unter *in vivo* Bedingungen untersucht. Folgende Vektoren fanden Anwendung: pCS2+, pCMV-Sport6, eGFP und Cherry für die Zelllokalisationsstudien und der Vektor pVenus1/2-C bzw. pVenus1/2-N für die Interaktionsstudien (Auflistung der Konstrukte in Abschnitt A.2). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zell-Kulturmedium in einem 37 °C Zellkulturinkubator mit 5 %  $\text{CO}_2$ -Gehalt. Bei Erreichen einer Konfluenz von 70–90 % wurden die Zellen passagiert (Abschnitt 2.17.4) und in neue Zellkulturflaschen ausgesät bzw. für Versuchszwecke verwendet.

**Zellkulturmedium, DMEM** 10 % FCS; 1 % Penicillin/Streptomycin/Glutamin.

### 2.17.2 Transfektion von Plasmid-DNA in HeLa-Zellen

Die Transfektion beschreibt ein Verfahren bei dem DNA in eukaryontische Zellen eingeschleust wird. Als Carriersystem diente Polyethylenimin (PEI), ein kationisches Polymer mit der Fähigkeit Nukleinsäuren zu komplexieren. Um eine ausreichende Transfektionseffizienz zu gewährleisten, findet diese Methode in serumfreiem Zellkulturmedium statt. Die zu transfizierende DNA und das PEI wurden separat mit 1 x PBS verdünnt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als weitere Arbeitsschritte folgten die Zugabe der verdünnten DNA (10  $\mu\text{g}$ ) zum ebenfalls verdünnten PEI, die vorsichtige Mischung und erneute Inkubation über 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Transfektionansatz tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und für 4 h im Brutschrank belassen, anschließend das serumfreie Medium entfernt

und den Zellen das reguläre Zellkulturmedium zugeführt und bis zum Ernten noch weitere 16 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

**Tabelle 2.26:** Zusammensetzung des jeweiligen Transfektionsansatzes

	<b>DNA</b>	<b>PEI</b>	<b>1 x PBS</b>
12 Well	1,6 µg	4,8 µl	24 µl
6 Well	4,0 µg	12,0 µl	60 µl
10 cm Petrischale	24,0 µg	72,0 µl	360 µl

**PEI**  $\hat{=}$  3 µl PEI pro µg DNA.

**1 x PBS**  $\hat{=}$  5-faches Volumen an PEI.

**Zellkulturmedium, DMEM** 10 % FCS; 1 % Penicillin/Streptomycin/Glutamin.

### 2.17.3 Ko-Transfektion von Plasmid-DNA in HeLa-Zellen

Die Ko-Transfektion diente der Analyse der Ko-Lokalisierung sowie möglicher Interaktionen der zu untersuchenden Expressionskonstrukte. Entsprechend der einzusetzenden DNA-Mengen (bei der Transfektion von 2 Konstrukten jeweils 5 µg DNA) wurden hierbei zwei unterschiedlich markierte DNA-Plasmide für den Transfektionsansatz eingesetzt und dieser, wie in Abschnitt 2.17.2 beschrieben, zu den Zellen gegeben.

### 2.17.4 Passagieren der Zellen

Zum Passagieren wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 x PBS gewaschen. Zum Ablösen der adhären Zellen wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung versehen und 3–5 min im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe von Kulturmedium wurde das Trypsin inaktiviert und die abgelösten Zellen wurden 3 min mit 1000 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml frischem Medium resuspendiert und die Zellzahl mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Für die Immunfluoreszenz waren 0,22 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Well (3,8 cm<sup>2</sup>) einer 12 Well Platte notwendig, für die Western Blot-Analyse 0,9 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Well (9,6 cm<sup>2</sup>) einer 6 Well Platte und zur Ko-Immunpräzipitation jeweils 3 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Petrischale (10 cm<sup>2</sup>).

### 2.17.5 Zellyse und Proteinisolation

In 6 Well Platten bzw. Petrischalen kultivierte Zellen mussten nach Entfernen des Mediums zweimal mit 10 ml eiskaltem 1 x PBS gewaschen werden. Das Medium wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von 5 ml eiskaltem 1 x PBS mittels spezieller Zellschaber vorsichtig vom Boden entfernt und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Spülung der restlichen verbliebenen Zellen in der Petrischale mit weiteren 5 ml eiskaltem 1 x PBS und die Pipettierung zu den anderen Zellen in das jeweilige Gefäß. Die Zellsuspension wurde 8 min bei 1000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet je nach Größe in 100–500 µl Lysispuffer resuspendiert. Anschließend mussten die Zellen durch vorsichtiges auf- und abpipettieren auf Eis lysiert werden. Nach einer Zentrifugation bei 13000 U/min für 10 min wurden die Zelltrümmer pelletiert, der Überstand anschließend in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -20 °C gelagert. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach Bradford (Abschnitt 2.18.2). Danach wurden so viel wie möglich, 10 µg–150 µg, des Zell-Lysates für eine SDS-PAGE (Abschnitt 2.18.3) mit anschließender Western Blot-Analyse (Abschnitt 2.18.4) gegen die überexprimierten Proteine eingesetzt.

**1 x PBS** 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4.

**Lysispuffer** 50 mM HEPES pH 7,5 (1:1000 Pepstatin A); 150 mM NaCl (1:200 PMSF); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (1:200 Proteaseinhibitor); 1,0 mM EDTA; 1 % Triton-X100; 0,1 % SDS; 10 % Glycerin.

## 2.18 Biochemische Methoden

### 2.18.1 *In vitro* Transkription/Translation

Für die *in vitro* Translation von Proteinen wurde das TnT<sup>®</sup>-Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) verwendet. Dieses System ermöglicht eine Kopplung von Transkription und Translation und somit die Proteinsynthese mit einem Expressionsvektor als Ausgangsmaterial. Die Anwendung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Der Ansatz beinhaltete:

- 6,25  $\mu\text{l}$  TnT<sup>®</sup> Rabbit Retikulozytenlysat
- 0,5  $\mu\text{l}$  TnT<sup>®</sup> Reaktionspuffer
- 0,25  $\mu\text{l}$  TnT<sup>®</sup> SP6 RNA Polymerase
- 0,25  $\mu\text{l}$  Aminosäure Mixtur, ohne Methionin (1 mM)
- 0,5  $\mu\text{l}$  [<sup>35</sup>S]Methionin (> 1000 Ci/mmol)
- 0,25  $\mu\text{l}$  RNasin<sup>®</sup> Ribonuclease Inhibitor (40 U/ $\mu\text{l}$ )
- 0,5  $\mu\text{l}$  DNA Matrize (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
- 1  $\mu\text{l}$  Morpholino-*Antisense*-Oligonukleotid (1 mM; optional)
- auf 12,5  $\mu\text{l}$  mit dH<sub>2</sub>O auffüllen

Der Reaktionsansatz wurde bei 30 °C für 90 min inkubiert und anschließend durch SDS-PAGE (Abschnitt 2.18.3) aufgetrennt. Zur Darstellung der radioaktiv markierten Translationsprodukte wurde das Gel anschließend für 5 min auf dem Schüttler in Fixierlösung inkubiert, danach in Folie eingeschweißt und ü. N. auf einem Screen unter Lichtabschluss in einer Filmkassette inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem Raytest Eraser (Fujifilm BAS-1800II) und wurde mittels der Software BAS Reader 3.14 und Aida Image Analyzer v450 ausgewertet.

**Fixierlösung** Gemisch aus 30 % Methanol (100 %) + 10 % Essigsäure.

### 2.18.2 Proteinbestimmung mit Bradford

Die Bradford-Methode beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue-G250 an Proteine, wodurch dieser vom kationischen in den anionischen Zustand überführt wird und somit das Absorptionsmaximum von 465 nm (rot) nach 595 nm (blau) verschoben wird. Die Absorptionsänderung ist über einen weiten Bereich proportional zur Proteinkonzentration. Dieser Bereich ist durch eine mit BSA in 1 x PBS erstellt Eichgerade definiert. Die Bestimmung des Gesamtproteins erfolgte aus dem Überstand der gewonnen Zelllysaten. Hierbei wurde 1  $\mu\text{l}$  der Proteinprobe in eine 96 Well Mikrotiterplatte vorgelegt und mit 9  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt, 200  $\mu\text{l}$  einer frisch angesetzten Bradfordlösung wurden hinzugefügt und 5 min bei RT inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte unter Zuhilfenahme eines Plattenreaders bei 595 nm.

### 2.18.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen nach Größe fand die denaturierende Gelelektrophorese Anwendung. Die eingesetzten Proben wurden mit 5  $\mu\text{l}$  2 x SDS-Probenpuffer versetzt, die Proteine 5 min bei 95 °C im Thermoblock denaturiert, für 5 min bei 13000 U/min abzentrifugiert und letztendlich auf ein Gel, bestehend aus Sammelgel und Trenngel, geladen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 10 mA pro Gel. Zur Charakterisierung des gesuchten Proteins dient ein Größenmarker, welcher aus Proteinen bekannter Größe besteht.

**Sammelgel** 5 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid; 125 mM Tris/HCl; 0,1 % (w/v) APS; 0,4 ‰ (v/v) TEMED, pH 6,8.

**Trenngel** 8–12 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid; 375 mM Tris/HCl; 0,1 % (w/v) APS; 0,4 ‰ (v/v) TEMED, pH 8,7.

**2 x Probenpuffer** 250 mM Tris-HCl; 140 mM SDS; 0,2 ‰ (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 20 % Glycerin, pH 6,8.

**Laufpuffer** 25 mM Tris; 3,5 mM SDS; 250 mM Glycin.

#### 2.18.4 Western Blot-Analyse

Werden in einer SDS-PAGE aufgetrennte Proteine auf eine Membran übertragen und anschließend über verschiedene Reaktionen nachgewiesen, spricht man von Western Blotting. Als Membranen werden PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membranen verwendet, die zur Aktivierung kurz in Methanol gelegt und anschließend in Westernpuffer überführt werden. Das Gel, die Schwämme und das Blotpapier wurden ebenfalls vor ihrer Verwendung in Westernpuffer äquilibriert. Daraus wurde ein luftblasenfreier Blotstapel zusammengesetzt der in der Mitte die Membran und das Gel enthielt und dessen äußere Lagen aus Blotpapier und Schwämmen bestanden. Der Stapel wurde in eine mit Westernpuffer gefüllte Nassblot-Kammer gehangen, sodass die im Gel enthaltenen Proteine in Richtung der Anode auf die Membran übertragen werden konnten (333 mA für die gesamte Kammer, 3–4 h).

**Westernpuffer** 190 mM Glycin; 25 mM Tris-Base.

Um unspezifisches Anlagern der Antikörper an der Membran zu verhindern, wird die Membran nach dem Blot für 1 h bei RT in 5 % Milchpulver/1 x TBS/T geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Verdünnung im Verhältnis 1:500–1:5000 in TBS/T) erfolgte ü. N. bei 4 °C. Anschließend wurde die Membran 3 mal für 5 min mit TBS/T gewaschen, mit dem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper (Verdünnung im Verhältnis 1:10000 mit TBS/T) versetzt und für 2 h bei RT geschwenkt. Danach wurde die Membran erneut 3 mal mit TBS/T für 5 min gewaschen. Die Detektion erfolgte mit einer selbst hergestellten ECL-Lösung in einer Geldokumentationsanlage und die Auswertung mittels der Software QuantityOne.

**1 x TBS-T** 150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl; 0,5 ‰ (v/v) Tween20, pH 7,4.

**ECL-Lösung A (pro Membran 2 ml benötigt)** 200 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 8,6; 50 mg Luminol.

**ECL-Lösung B (200  $\mu$ l)** 11 mg para-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO; 35 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,6  $\mu$ l).

*Tabelle 2.27:* Verdünnungen der Antikörper, W = Western; I = Immunfluoreszenz

Antikörper	Verdünnung	Antikörper	Verdünnung
mouse- $\alpha$ -GAPDH	1:1000 (W)	$\alpha$ -SREBP2	1:300 (W) 1:600 (I)
rabbit- $\alpha$ -calnexin	1:200-500 (W)	mouse- $\alpha$ -myc	1:1000 (I)
$\alpha$ -INSIG1	1:300 (W) 1:500 (I)	rabbit- $\alpha$ -myc	1:1000 (I)
$\alpha$ -INSIG2	1:300 (W) 1:500 (I)	rabbit- $\alpha$ -GNE	1:500 (I)
$\alpha$ -goat-HRP	1:1000 (W)	$\alpha$ -mouse-HRP	1:1000 (W)
$\alpha$ -rabbit-HRP	1:1000 (W)	$\alpha$ -myc-HRP	1:5000 (W)
$\alpha$ -GFP-HRP	1:500 (W)		

#### 2.18.5 Ko-Immunpräzipitation

Die Ko-Immunpräzipitation wird zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt. Dafür wurden HeLa-Zellen mit den zwei Expressionsplasmiden, die für die zu untersuchenden Proteine codieren, transfiziert und nach Zelllyse ein Protein durch Zugabe eines spezifischen Antikörpern und Protein

G-Sepharose präzipitiert. Nach Abtrennung von anderen Zellbestandteilen wurden die Proteinkomplexe in ihre Fragmente zerlegt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion des Bindungspartners erfolgte mit spezifischen Antikörpern im Western Blot. Als Probe diente hierbei das Lysat, welches aus ko-transfizierten HeLa-Zellen gewonnen wurde. Die Proben wurden jeweils mit dem spezifischen Primärantikörper versetzt und ü. N. bei 4 °C im Drehrad belassen. Daraufhin folgte Äquilibrieren der Protein G-Sepharose-Beads durch mehrmaliges Waschen mit 1 x PBS und anschließende Zentrifugation der Beads für 5 min bei 500 U/min (20 µl Protein G-Sepharose und 40 µl Sepharose pro Ansatz) und Blockierung der Beads ü. N. mit 100 µg/µl BSA in 1 x PBS bei 4 °C. Nach Zentrifugation (500 U/min für 5 min) wurde der Überstand abgenommen und die Beads mit dem gleichen Volumen an 1 x PBS verdünnt, 60 µl dieser Beads-Lösung dann zur Proteinprobe gegeben und für 2 h bei 4 °C inkubiert. Somit konnte der Antikörper an die Protein G-Sepharose binden. Der so entstandene Komplex sedimentierte durch Zentrifugation für 10 min bei 500 U/min und der Überstand wurde verworfen. Nach einigen Waschschritten mit 1 x PBS wurde der Ansatz mit 25 µl 2 x SDS-Ladepuffer versetzt, gründlich gemischt und für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Als weitere Schritte folgten das Auftragen der Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgel, elektrophoretische Auftrennung der Proteine (Abschnitt 2.18.3) und eine abschließende Analyse mittels Western Blot (Abschnitt 2.18.4).

### 2.18.6 Immunfluoreszenz

Mittels Immunfluoreszenz können Proteine innerhalb von Zellen durch spezifische Antikörper detektiert werden. Fluoreszenz-markierte sekundäre Antikörper, die gegen den invariablen Anteil der spezifischen primären Antikörper gerichtet sind, werden im Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Das ermöglicht eine Aussage darüber, ob ein bestimmtes Protein in der Zelle vorhanden und wo es lokalisiert ist. Fluorochrome werden durch Absorption von Energie in den angeregten Zustand versetzt. Dabei wird die Lichtenergie aus einem bestimmten Wellenlängenbereich für die Anregung verwendet. Die überschüssige Energie wird teilweise in Wärme abgegeben, der Rest als Fluoreszenzlicht emittiert. Die ausgesandte Strahlung weist somit eine tiefere Frequenz (größere Wellenlänge) auf als die ursprünglich absorbierte (Beispiel: DAPI hat sein Absorptionsmaximum bei 350 nm und sein Emissionsmaximum bei 470 nm). Die Kopplung der Fluorochrome an sekundäre Antikörper (die gegen Antikörper unterschiedlicher Species gerichtet sind, ermöglicht unter bestimmten Bedingungen somit die Detektion mehrerer Proteine in derselben Zelle. Die Zellen wurden in 12 Well Platten, die mit sterilen Deckgläschen versehen waren, ausplattiert und transfiziert. Änderung zur üblichen Transfektion (Abschnitt 2.17.2 bzw. Abschnitt 2.17.3) von HeLa-Zellen waren:

1. Einlage steriler Deckgläschen (Ø 20 mm) in die Zellkulturschalen vor der Einsaat der HeLa-Zellen.
2. Ausplattierung von  $0,2 \times 10^6$  statt der üblichen  $0,4 \times 10^6$  Zellen, um ein zu dichtes Wachstum zu vermeiden.

Am Tag nach der Transfektion wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen, anschließend für 30 min bei RT in 4 % PFA/PBS fixiert und darauf erneut zweimalig mit 1 x PBS gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellwand erfolgte durch Inkubation der Zellen für 5 min mit 0,2 % TritonX-100 in 1 x PBS. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden unspezifische Bindungsstellen mit 2 % BSA in 1 x PBS für 30 min geblockt. Danach schloss sich eine zweistündige Inkubation bei 37 °C mit dem Primärantikörper an, welcher in 0,2 % BSA in 1 x PBS verdünnt war. Überschüssige Antikörper wurden nach diesem Schritt durch dreimaliges Waschen mit 1 x PBS entfernt und erneut für 30 min bei RT mit 2 % BSA/PBS blockiert. Die Inkubation des Sekundärantikörpers, welcher an Alexa-Fluorophore gekoppelt war und in 0,2 % BSA in 1 x PBS verdünnt wurde, erfolgte für 45 min bei 37 °C, daraufhin nochmaliges Waschen mit 1 x PBS. Vor dem Eindeckeln wurden die Deckgläschen mehrmals in deionisiertes Wasser getaucht, um vorhandene Salze zu entfernen und zur Dehydrierung anschließend kurz in absolutem Ethanol geschwenkt. Abschließend wurden die Deckgläschen mit einer

Mowiol/DAPI-Lösung auf Objektträger eingedeckelt, ü.N. bei RT getrocknet und bis zur Analyse bei 4 °C unter Lichtabschluss aufbewahrt. Die Fluoreszenzbilder entstanden mit einem Nikon-Eclipse E600 Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines Apo TIRF Ölimmersionsobjektives.

**Tabelle 2.28:** Verdünnungen der Fluoreszenz-markierten Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
$\alpha$ -goat-Alexa488	1:800	$\alpha$ -mouse-Alexa488	1:800
$\alpha$ -rabbit-Alexa594	1:800	$\alpha$ -rabbit-FITC	1:200
$\alpha$ -mouse-Alexa647	1:600	$\alpha$ -goat-DL649	1:600
$\alpha$ -mouse-Cy3	1:1000	$\alpha$ -rabbit-DL649	1:600

### 2.18.7 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

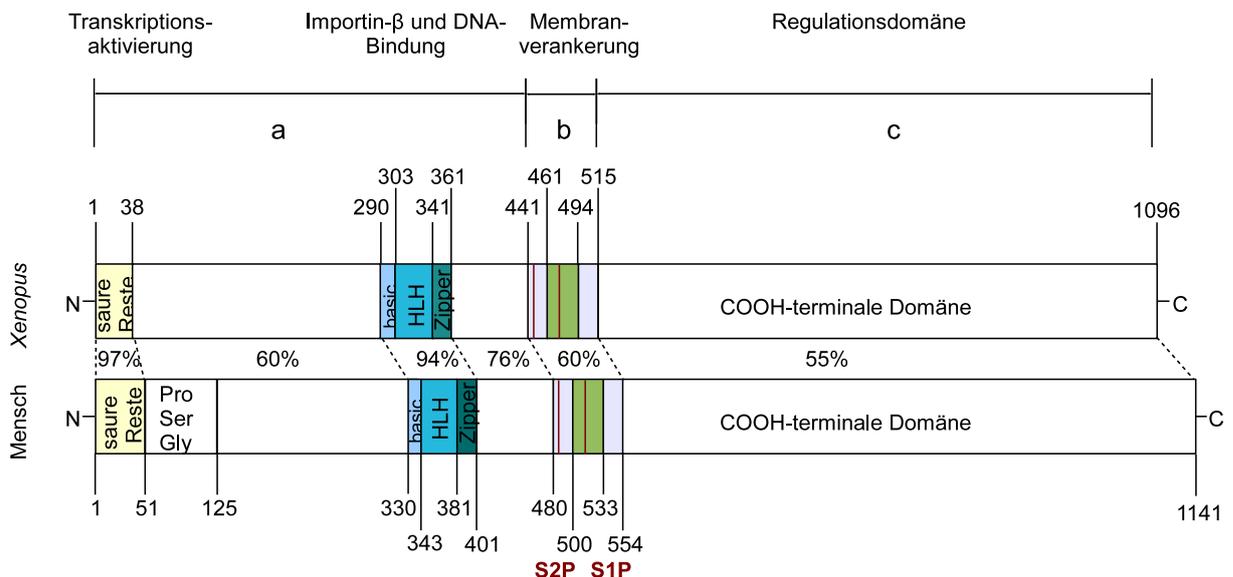
Hierbei handelt es sich ebenfalls um eine Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen (Hu & Kerppola., 2003), allerdings an intakten Zellen. Dabei benutzt man das Chromophor *yellow fluorescent protein* (YFP), eine Weiterentwicklung des *green fluorescent protein* (Dietschy *et al.*, 1993). Venus ist ein aus dem YFP abgeleitetes Chromophor, welches in ein N-terminales (Venus1, V1) und C-terminales (Venus2, V2) Bruchstück geteilt wird (Hu *et al.*, 2002). Das Prinzip der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation basiert auf der Re-Assoziierung von alleine nicht-fluoreszierenden Venus-Protein-Fragmenten. Durch Zusammenlagerung der beiden Fragmente wird ein intakter, fluoreszierender Komplex erzeugt. Der N-terminale Teil (V1, Aminosäuren 1–154) und der C-terminale Teil (V2, Aminosäuren 155–238) des Venus Proteins wurde jeweils an einen der potenziellen Interaktionspartner fusioniert. Die so entstandenen Konstrukte wurden in HeLa-Zellen transfiziert (Abschnitt 2.17.2) und die Expression der Proteine durch Immunfluoreszenz mit ihren spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Abschnitt 2.18.6). Kommen nun beide Fragmente als Folge einer Interaktion der zu untersuchenden, gekoppelten Proteine in unmittelbare Nähe, erfolgte eine Komplementation zu einem intakten Gesamtprotein, welches sich in einem intensiven Fluoreszenzsignal zeigte. Kann hingegen durch Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass beide Proteine zwar in der Zelle überexprimiert werden, jedoch kein Venus-Signal detektiert wird, interagieren die Proteine nicht. Der Nachweis dieser Fluoreszenz erfolgte unter Zuhilfenahme des Nikon-Eclipse E600 Fluoreszenzmikroskops.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Vergleich der abgeleiteten SREBP2-Proteinsequenzen von *Xenopus*, Huhn, Ratte, Maus und Mensch

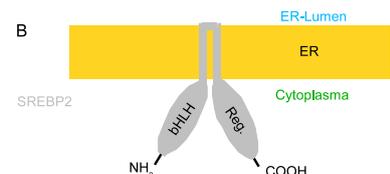
SREBPs von unterschiedlichen Organismen wie Huhn (*Gallus gallus*), Ratte (*Rattus norvegicus*), Maus (*Mus musculus*) und Mensch (*Homo sapiens*) zeigen eine große Ähnlichkeit in ihrer Aminosäuresequenz (Hua *et al.*, 1993; Kauppinen *et al.*, 1993). So zeigte beispielsweise der Aminosäuresequenzvergleich zwischen Mensch und *Xenopus* eine 67 %ige Übereinstimmung. Vor allem im Bereich des bHLHZ, welcher für die Kernererkennung durch das Importin- $\beta$ -Signal und die DNA-Bindung verantwortlich ist, konnte eine Konservierung von 94 % zwischen Mensch und *Xenopus* festgestellt werden (Abbildung 3.1). Aber auch der Vergleich zwischen *Xenopus* und Ratte, Maus und Huhn zeigt hochkonservierte Bereiche (Abbildung 3.2, Tabelle 3.1). Auf dieser Erkenntnis der hochkonservierten Bereiche zwischen *Xenopus* und humanem SREBP2 (Accession Nummer: Z99716) aufbauend, wurde ein vom humanen System abgeleiteter *Xenopus*-SREBP2-Klon über die Firma IMAGENES bestellt.



**Abbildung 3.1: Homologievergleich sowie Domänenstruktur von *Xenopus* und humanem SREBP2.** SREBP2 von *Xenopus* und Mensch besitzen Regionen mit hoher Ähnlichkeit und zeichnen sich durch drei Domänen aus. Die erste Domäne ist durch (a) N-terminal saure Aminosäuren (aa1–38 bei *Xenopus*, aa1–51 bei Mensch) gekennzeichnet, sowie den Bereich des bHLHZ, der für das Importin- $\beta$ -Signal und die DNA-Bindung notwendig ist. Die zweite Domäne (b) enthält zwei hydrophobe Membran-durchziehende Segmente (grau), die für die Membranverankerung notwendig sind. Die dritte Domäne (c) die sog. COOH-Domäne ist für die regulatorische Funktion von SREBP2 essenziell. Mit roten Linien ist die Erkennungsstelle der S1 und S2-Protease markiert. Der Vergleich der Sequenzhomologie einzelner Domänen zwischen *Xenopus* und Mensch ist in Prozent angegeben. Quelle auf Grundlage von UNIPROT.

### 3. ERGEBNISSE

Cytoplasma 1												
x1	---METSGL	ENMETLLEIG	DELTGLDIDE	MLQFVSNQVG	EPFDLFEEOQL	CQSYQGNAM	D-----	---TTLPKAYN	QAAQPPYTTT	APQPQLLPVK	85	
xt	...LN---	.....	.....	.....	D.....	.....	E-----	---A.....	..P.....	..T.....	81	
gg	MSR---LN-	NRPQ.FPF-	-----LA.	.....A.	D.....SDP.	.GTF..GGGG	G-----	---GSGTG-	.....	.....	53	
rn	MDENS.LG.	.T.....	.....	.....	.S.S.S.	.S.FP.GGGG	S---GSGGT	SNNSSGRGTS	GG.AD.AVQR	SFSQVP.STF	96	
mm	MDESS.LGV.	.T.....	.....	.....	.S.S.S.	.S.FP.GGSN	G---GSG-	NNSSGRGN.	GG.TD.AVQR	SFSQVP.STF	93	
hs	MDDSG.LG.	.T.....	.....	.....	.S.S.S.	.S.FP.SGGS	GSSSGSSGS	SSSSNGRGS	SG.VD.SVQR	SFTQVT..SF	100	
Transkriptionsaktives säurehaltiges Motiv												
x1	APPQATP---	-----	---QRTAPL	LQPRPVVQTS	PQPQLQQQTV	MLTPNFSTAP	QTRIIQQPLI	YQNAATTSFQ	VLQPPVQSLM	TTQQMQPVTI	168	
xt	..S.V.....	-----	-----	.....I.S.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	163	
gg	.....	-----	-----	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	53	
rn	S.SSTS.QAP	ALQVKVS---	-PTPP.AT.V	.....QP.PQ	.PA.....	.I..T....	.....	.....	.....Q...V	.SS.V....	191	
mm	S.SA.S.QAP	ALQVKVS---	-PTPP.AT.V	.....QP.PQ	.PA.....	.I..T....	.....	.....	.....Q...V	.SP.V....	188	
hs	S.SA.S.QAP	TLQVKVSPTS	VPTTP.AT.I	.....QP.PQ	.T.....	.I..T....	.....	.....	.....Q...V	.SS.V....	199	
Transkriptionsaktives säurehaltiges Motiv												
x1	QQQVQTVQQAQ	RVLTLQAANGT	IQTLLTPATVQ	TV-TPHVQVQ	PVLVQPQIIK	TESLVLTAVK	ADGSPVMTAV	QNPAITTLAG	TLQTTALQVP	TLMGNSGNTIL	267	
xt	.....	.....	.....T.	.....Q.	.....	.....	.....TM	.....T	PI.....T-	.....	261	
gg	.....	-----	-----	.....	.....	.D.....TL	T..N...A.	.....L.A.TT	PI.....T-	.....	110	
rn	.....	.T.....	L...A.....	.A.Q.....	.....	.D.....TL	T.....A.	.....L.A.TA	PI..A.....	.....V...A.	291	
mm	.....	.T.....	L...A.....	.AA.Q.....	.....	.D.....TL	T.....A.	.....L.A.TA	PI..A.....	.....V...A.	288	
hs	.....	.T.....	L...A.....	.AA.Q.....	.....	.D.....TL	T.....A.	.....L.A.TT	PI..A.....	.....V...S.	299	
Transkriptionsaktives säurehaltiges Motiv												
x1	TTMPVMMGQE	KMPIKQVPGS	LKLAIEVPKEG	ERRTTHNIEE	KRYKSSINDK	IMELKDLVMG	TDKAMHKSGV	LKKAIDYIKY	LQVNVQLRQ	ENMALKLANQ	367	
xt	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	361	
gg	.....	.V.....G	V.QPDP.	.....	.....	.I.....I.	.....	.R.....	..A.H.....	..V.....	210	
rn	.....	.V.....G	V.QL.P.	.....	.....	.I.....	.....	.R.....	..H.....	..V.....	391	
mm	.....	.V.....G	V.QLDP.	.....	.....	.I.....	.....	.R.....	..H.....	..V.....	388	
hs	.....	.V.....G	V.QL.P.	.....	.....	.I.....	.....	.R.....	..H.....	..V.....	399	
Basisches Motiv												
Helix-Loop-Helix Motiv												
Leucin-Zipper Motiv												
ER-Membran 1												
x1	KNKYLKGIDL	SSLVDTSIGM	KIDEFNQNAL	MMSPPASDSG	SPAVFSPYSV	DSEPGSPLLD	DEKVKDEPDS	P-TGLGMMDR	SRMLLCMTMF	LCLSFNPLTS	466	
xt	.....	.....	.M.....I.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	460	
gg	..L.....	..NDADL	..D...V.L	.....	.Q.G...I	.....	.A.....	.PVA..V.	.I...AL.	.....	310	
rn	..L.....	G...SDVLL	..D...V.L	.....	.Q.G...I	.....	.A.....	.PVA..V.	.I...VL.	.G.....	491	
mm	..L.....	G...SDVLL	..D...V.L	.....	.Q.G...I	.....	.A.....	.PVA..V.	.I...VL.	.G.....	488	
hs	..L.....	G...NEVDL	..ED...V.L	.....	.Q.G...I	.....	.A.....	.PVA..V.	.I...VL.	.....	499	
ER-Lumen 1												
ER-Membran 2												
Cytoplasma 2												
S2P												
x1	LLHPESGQYS	ERAVQHGTR	TMLEVMESGF	YGSWFDWLIP	TIILWLNVG	IVLSVFMKLL	IHGEPVTRLH	SRSSVKFWRH	RKQADLDLAK	GDFGAAALNL	566	
xt	..S.....T	.....	..I..T.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	559	
gg	.DARGSPE	DSLTR..S.	N..TL.SD--	T.G..G.MM.	.L.....	.V.....	.....	.....	.....R	..A...S.	408	
rn	.QWGAHNP	DQHPYS.S.	NV..SL.SG--	S.G...MM.	.LL..L..	.....V..	V.....I.P.	.....	.....	..A...A.	589	
mm	.QWGAHNT	DQHPYS.S.	SV..SL.SG--	A.G...MV.	.LL.....	.....V..	V.....I.P.	.P..T...	.....	..A...A.	586	
hs	.QWGAHAD.	DQHPHS.S.	SV..SL.SG--	S.G...MM.	.LL.....	.....V..	V.....I.P.	.....	.....R	..A...G.	597	
S1P												
x1	QTCLCVLGRS	LPATRLDLAC	SLSWNIIRCS	LQKISLVRWL	LKHSPG----	-YCKAEFQD	EATTSARDA	LVIYKHLQHL	LTGKLPNSWN	CSGLNLALCA	661	
xt	.....	..S.F.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	654	
gg	..S...A	..S...A	.....V.Y.	..LA.....	..RTSHQWRA	REATAG-SE.	..K.....	.A.....	.I.....SSA	Y...HM...	507	
rn	..S...A	..TS.....	.....V.Y.	..LR.....	..KVFQRWRA	TPATA.G.E.	..KS.....	.A..R...	.I.....AGSA	..DVHM...	689	
mm	..S...A	..TS.....	.....V.Y.	..LR.....	..KVFQRWRA	TPATA.G.E.	..KS.....	.A..R...	.I.....AGSA	..DVHM...	686	
hs	..S...A	..TS.....	.....V.Y.	..LR.....	..KVFQRRA	TPATE.G.E.	..K.....	.A..R...	.I.....AGSA	..DVHM...	697	
Transkriptionsaktives säurehaltiges Motiv												
x1	VNLAECAGNK	ISPTLLAEIH	LTTAIQMKTS	FPSRFRFLTA	YFLGYAQNAS	SEE--TLPDP	MRWLAHPLGK	YFFINSNWAL	KSAAKDSLYT	STRNFANPVT	759	
xt	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	752	
gg	.....	.E.E.	.P.STM.	..A.VGL..R	CGGKLG..AS	..SQ..SLC	.S.RSAI..S	L..C...Q	K..VERS.TV	.....E..C	TQ...D..IA	607
rn	.....	.E.E.	.P.ST.V.	..A.MGL..R	CGGKLG..AS	..NR..SLC	GP.HSAV..S	L..C...Q	K..MERS.SI	.....E..C	AQ...D..IA	789
mm	.....	.E.E.	.L.ST.I.	..A.MGL..R	CGGKLG..AS	..NR..SLC	GP.HS.V.S	L..C...Q	K..MERS.SI	.....E..C	AQ...S..D..IA	786
hs	.....	.E.E.	.P.ST.V.	..A.MGL..R	CGGKLG..AS	..SR..SLC	GP.HSAV..S	L..C...Q	K..MERS.SV	.....E..C	AQ...D..IA	797
Transkriptionsaktives säurehaltiges Motiv												
x1	QIHRAFCESL	LEKAMYIMAK	PETSKAA--S	EE-ESCEFSR	AQEYLKLLSG	FADSVGNVAS	LPLGGSSPMS	SA--DPICR	WWYSVSSMAI	GWLQGDSDSV	853	
xt	.....	.....	.....P--P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	846	
gg	.V.Q...N.	.R.VDSLIV.	.Q.R.EVVQG	.D.P...S	.M...NS	.L.M.-SGA	P.FAS..MLK	.LGP.VV.	..SAAVA..	..R...TA.	706	
rn	.V.Q...KH.	.R.VEALV.	.QAK.K.GDR	.....S	.L.F...HS	.V...-FVA	S.FSS..VLR	.LGP.VV.	..T.AITV..	..S...AA.	887	
mm	.V.Q...KN.	.R.VESLV.	.QAK.K.GDQ	.....S	.L...HS	.V...-FVT	S.FSS..VLR	.LGP.V.	..T.AVT..	..S...AA.	884	
hs	.V.Q...KN.	.R.IESLV.	.QAK.K.GDQ	.....S	.L...HS	.V...-M.	P..SR..VLK	.LGP.I..	..T.AITV..	..S...AA.	895	
Transkriptionsaktives säurehaltiges Motiv												
x1	KSHEFAEVERI	PKLLD-SDNP	LVKAVIHMCR	AMQAVLGGK	DGQONSFYHC	EKASAFLNWS	LNISSTG-NT	NLNKVQQLLI	CDLLLSLRTS	LWQKQSSS-P	950	
xt	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	945	
gg	R.R.SI..L	..S.E.M.E.A	.....TF.L.K	.....SLSS.A	.....S.LS.	..R..SH..	..M..GASS.	P.SN.I..A	.....	.....A..SQ	806	
rn	R.R.T...V	..A.EVTES.	.....FYA.	.....H.SLS.A	.....C..	..R..GH..S	..V.G.TSDP	S..H...T	.....T	.....A..ASQ	987	
mm	R.R.T...V	..A.EVTES.	.....FYT.	.....H.SLS.A	.....C..	..R..GH..S	..V.G.TSDP	S..H...T	.....T	.....A..ASQ	984	
hs	R...TK....	..A.EVTES.	.....IF.A.	.....H.SLP.A	.....S..C.	..R..GH..S	..V.GATSDP	A..H...T	.....A	.....A..ASQ	995	
Transkriptionsaktives säurehaltiges Motiv												
x1	AAGDSIHAPT	PALTGFQRDL	SSLRRLSLTF	KPAHCKLFLH	EATVRLMADA	SPTRTHQLLQ	HSLQKCTALA	NKQGDLSLP	GQRERATAIL	LACRHLPLSF	1050	
xt	..E.....	SV.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1045	
gg	.L.ETY..SP	.E.....	G...K.AHG.	R..YR.V.	.....G.	.....E	...RRR.TQN	S..E..T.	.....	.....	906	
rn	LL.ETY..SG	TE.A.....	G...AHS.	R..YR.V.	.....G.	.....E	...RRR.TQN	T.H.EV.TW.	.....	.....	1087	
mm	LL.ETY..SG	TE.A.....	G...AHS.	R..YR.V.	.....G.	.....E	...RRRPTQN	T.H.EV.TW.	.....	.....	1084	
hs	.V.ETY..SG	AE.A.....	G...AHS.	R..YR.V.	.....G.	.....E	...RRR.TQS	T.H.EV.AW.	.....	.....	1095	
Transkriptionsaktives säurehaltiges Motiv												
x1	LSSPGQRAIM	LAEAAARTLEK	VGDRRSYHDC	QQMMVKLSGG	TAMAAS	1096						
xt	.....	..V.	.....	.....	.....	1091						
gg	..S...VL	.....	..K..CN.	.....	.....	952						
rn	.....	..VL	.....	..CS.	.....	1133						
mm	.....	..VL	.....	..CS.	.....	1130						
hs	.....	..VL	.....	..CN.	.....	1141						



**Abbildung 3.2: Vergleich der Aminosäuresequenzen von *Xenopus*-SREBP2 und SREBP2 anderer Vertebraten**  
 (A) Am Ende der Zeile sind die Positionen der Aminosäuren angegeben. Identische Aminosäuren sind durch Punkte, fehlende Aminosäuren durch Bindestriche markiert. SREBP2 durchzieht die ER-Membran mit 2 Transmembrandomänen. Über der Sequenz ist der jeweilige Domänenbereich farblich wie folgt markiert: gelb = helikale ER-Membran; lila = ER-Lumen; grün = Cytoplasma, graue Hinterlegung; Erklärung unter dem jeweiligem Sequenzbereich; roter Rahmen = Erkennungsstellen der S1 und S2 Protease. x1 = *Xenopus laevis*; xt = *Xenopus tropicalis*; gg = *Gallus gallus*; rn = *Rattus norvegicus*; mm = *Mus musculus*; hs = *Homo sapiens*. (B) Membrantopologie von SREBP2. ER = Endoplasmatisches Retikulum, bHLH = basic Helix-Loop-Helix Domäne, Reg. = regulatorische Domäne.

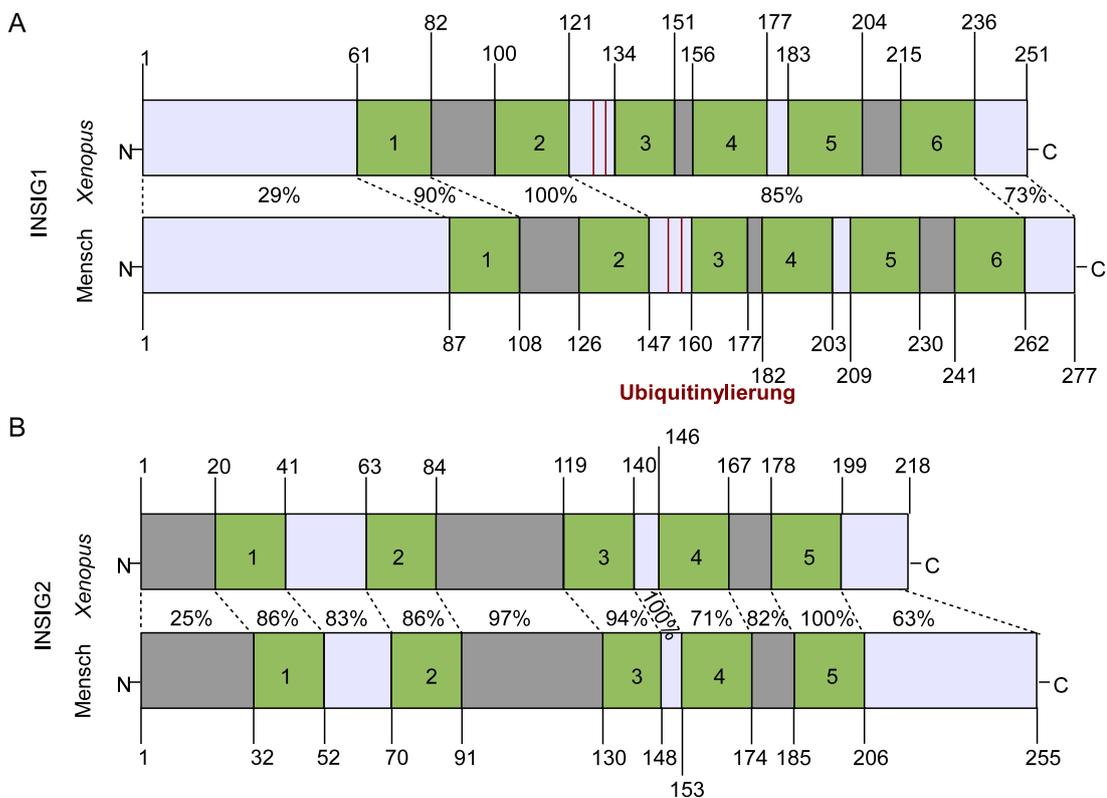
**Tabelle 3.1:** Vergleich konservierter Domänen von *Xenopus*, Huhn, Ratte, Maus und Mensch (alle Angaben in Prozent und jeweils bezogen auf *Xenopus laevis*)

Organismus	transkriptionsaktives säurehaltiges Motiv	basisches Motiv	Helix-Loop- Helix Motiv	Leucin- Zipper Motiv
<i>Xenopus tropicalis</i>	97	100	97	100
<i>Gallus gallus</i>	47	100	92	85
<i>Rattus norvegicus</i>	95	100	95	90
<i>Mus musculus</i>	97	100	95	90
<i>Homo sapiens</i>	97	100	95	90

Diese Tatsache der hohen Konservierung zwischen den beiden Species Frosch und Mensch erlaubt die Nutzung des *Xenopus*-Systems, um gewonnene Ergebnisse zur Embryonalentwicklung mit den Gesetzmäßigkeiten des humanen Systems zu vergleichen.

### 3.2 Vergleich der abgeleiteten INSIG-Proteinsequenzen von *Xenopus*, Huhn, Ratte, Maus und Mensch

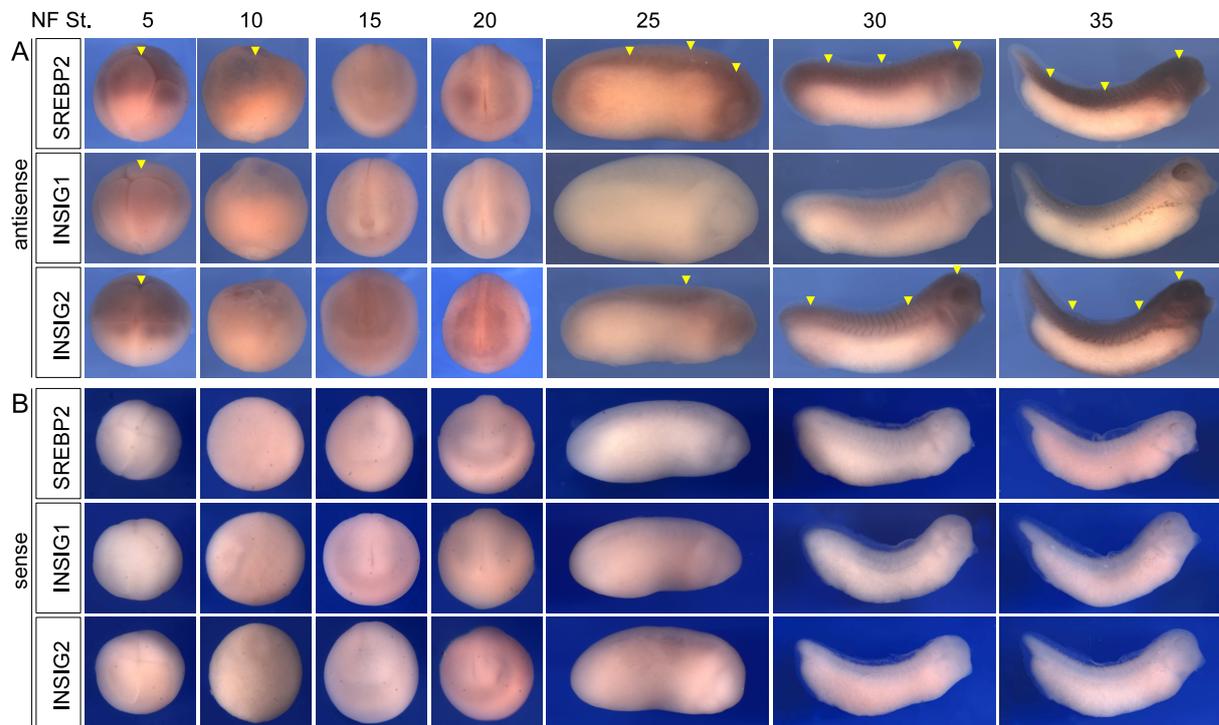
*Xenopus* INSIG1 und INSIG2 besitzen ebenfalls eine hohe Sequenzhomologie zu INSIG1 und INSIG2 anderer Vertebraten (Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5). Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen von *Xenopus* INSIG1 mit INSIG1 von Huhn, Ratte, Maus und Mensch zeigt sich ein hoher Konservierungsgrad in den einzelnen Domänen. Beispielsweise weist das humane INSIG1 eine 74 %ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz zum *Xenopus* INSIG1 auf. Auch INSIG2 hat zwischen den einzelnen Tieren einen hohen Ähnlichkeitsgrad. Beispielsweise zeigt das humane und *Xenopus* INSIG2 eine 83 %ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz und spricht somit für eine starke Konservierung (Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.3: Domänenstruktur von *Xenopus* und humanem INSIG1 (A) und INSIG2 (B).** Vergleich der Sequenzhomologie der einzelnen Domänen zwischen *Xenopus* und Mensch ist in Prozent angegeben. Die einzelnen Domänen wurden farblich wie folgt unterlegt: grün = helikale Inter-ER-Membran, grau = ER-Lumen, hellgrau = Cytoplasma, rote Linien = Ubiquitylierung. Quelle auf Grundlage von UNIPROT.



Vorder-, Mittel-, und Hinterhirn (Abbildung 3.7, a). Die Färbung von INSIG1 war schwach ausgeprägt, möglicherweise aufgrund der wenig vorhandenen INSIG1-Transkriptmenge (Abbildung 3.6). Die als Kontrolle eingesetzten *sense*-Sonden, welche nicht mit den mRNA's hybridisieren können, zeigten keine Signale (Abbildung 3.6, B).

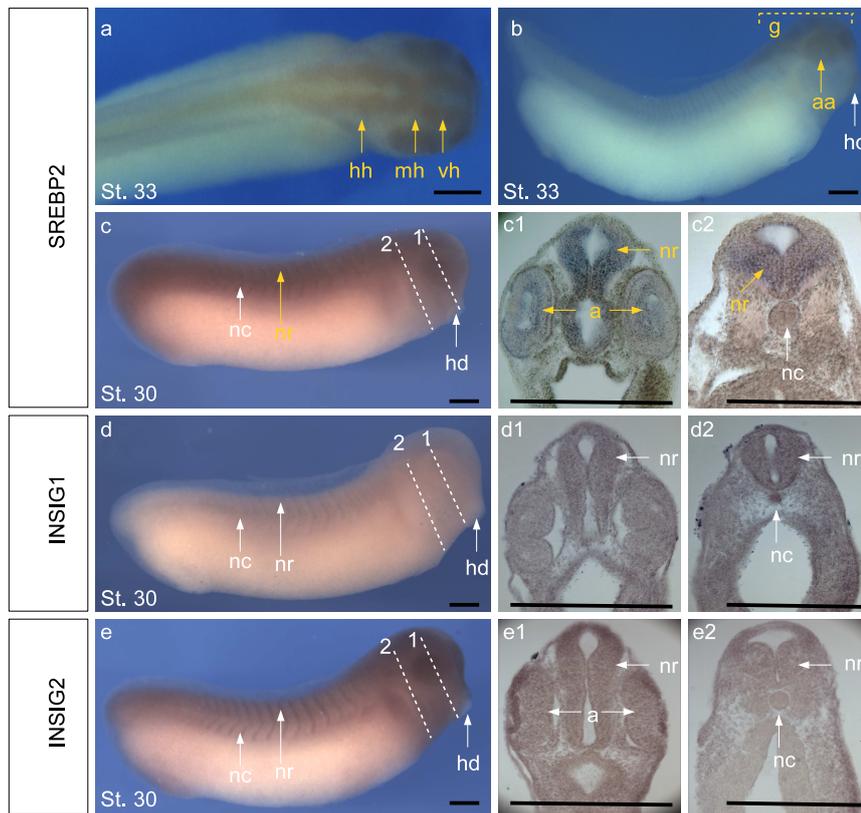


**Abbildung 3.6: Expression von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in *Xenopus* Embryonen.** WMISH-Analysen von *Xenopus*-Embryonen in den Entwicklungsstadien NF St. 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 mittels Dig-markierter RNA Sonden gegen SREBP2, INSIG1 und INSIG2. Embryonen der Stadien NF 5 und 10 laterale Ansicht (animaler Pol oben, vegetativer Pol unten). Embryonen der Stadien NF 15 und 20 frontale Ansicht (dorsal oben). Embryonen im Schwanzknospfenstadium laterale Ansicht (dorsal oben, anterior rechts). Gelbe Pfeilspitzen dokumentieren die RNA Expression des jeweiligen Gens. (B) Als Kontrolle der WMISH dienten Dig-markierte *sense*-RNA-Proben von SREBP2, INSIG1 und INSIG2. Ausrichtung der Embryonen wie bei (A).

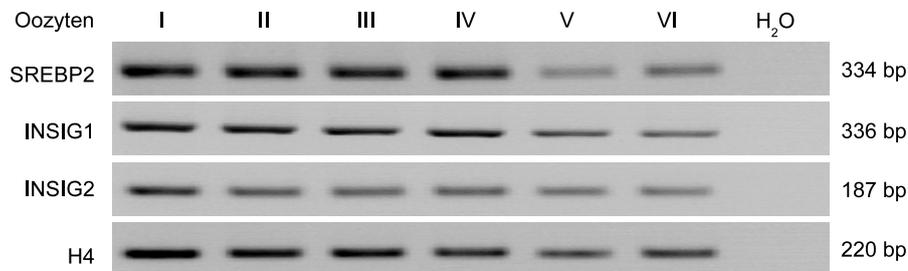
In Frontalschnitten von NF St. 30–33 Embryonen konnte neben den SREBP2 Transkripten im Neuralrohr (Abbildung 3.7, c2) auch Signale im Auge (Abbildung 3.7, c1) detektiert werden.

Aufgrund der nicht ausreichenden Sensitivität der Nachweisreaktion konnte eine mögliche schwache Expression von INSIG1 und INSIG2 in Frontalschnitten nicht beobachtet werden (Abbildung 3.7, d 1–2/e 1–2). Als weitere Methode fanden semiquantitative RT-PCR Analysen mit Oozyten, Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien und mit adultem *Xenopus laevis* Gewebe Anwendung. Diese Methode ermöglichte, die Expression der drei untersuchten Gene im zeitlichen Verlauf der Embryogenese und im Gewebe adulter Tiere zu analysieren.

Das Haushaltsgen Histon H4 (H4) wurde als Kontrolle in der RT-PCR mitgeführt. Unterscheidet sich die Stärke der H4-Bande nach der RT-PCR bei den zu vergleichenden Embryonalstadien bzw. bei den Gewebeproben nicht signifikant, so können die getesteten Markergene (SREBP2, INSIG1 und INSIG2) hinsichtlich ihrer Expressionsstärke verglichen werden. Die Eireifung (Oogenese) bei *Xenopus* wird in sechs Entwicklungsstadien unterteilt (Oozyten I–VI). In der RT-PCR auf Präparationen von total RNA wurden in allen sechs Oozytenstadien SREBP2, INSIG1 und INSIG2 Transkripte nachgewiesen (Abbildung 3.8). Dieser maternale Expressionsspiegel von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 wird bis zum NF St. 8,5–9 (Abbildung 3.9) beibehalten, dem Beginn der zygotischen Genexpression (sog. Midblastula Transition). Die RT-PCR Daten (Abbildung 3.8, Abbildung 3.9) bestätigten somit die Daten aus den WMISH-Analysen an Embryonen (Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.7: RNA Expression von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in Frontalschnitten.** WMISH zum Nachweis der RNA von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 und anschließende histologische Untersuchung durch Gelatin/Albumin Frontalschnitte. Die gestrichelte Linie zeigt die Ebene des daneben abgebildeten Frontalschnittes. Schnittdicke 30  $\mu\text{m}$ . Beschriftungen c, d und e entsprechen NF St. 30 Embryonen; Beschriftungen a und b entsprechen NF St. 33 Embryonen; gelbe Pfeile dokumentieren die RNA Expression des jeweiligen Gens; weiße Pfeile dokumentieren zusätzliche Strukturen; Bar = 400  $\mu\text{m}$ ; aa = Augenanlage, a = Auge, g = Gehirn, hh = Hinterhirn, hd = Haftdrüse, nc = Notochord, mh = Mittelhirn, nr = Neuralrohr, vh = Vorderhirn.

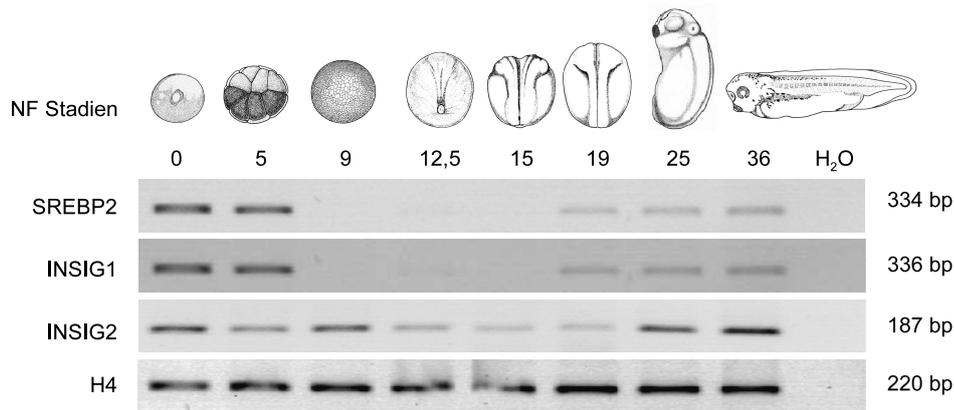


**Abbildung 3.8: RNA Expression von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in den *Xenopus*-Oozytenstadien I–VI.** Semiquantitative RT-PCR mit total-RNA; Als Standard für die relative Quantifizierung der RNA diente der Nachweis der ubiquitär exprimierte RNA von Histon H4 (H4). Als Kontrolle wurde H<sub>2</sub>O statt cDNA in der RT-PCR verwendet. Die Produktgrößen sind neben der jeweiligen Zeile rechts dargestellt: SREBP2 334 bp, 26 Zyklen; INSIG1 336 bp, 28 Zyklen; INSIG2 187 bp, 28 Zyklen; Histon H4 220 bp, 26 Zyklen.

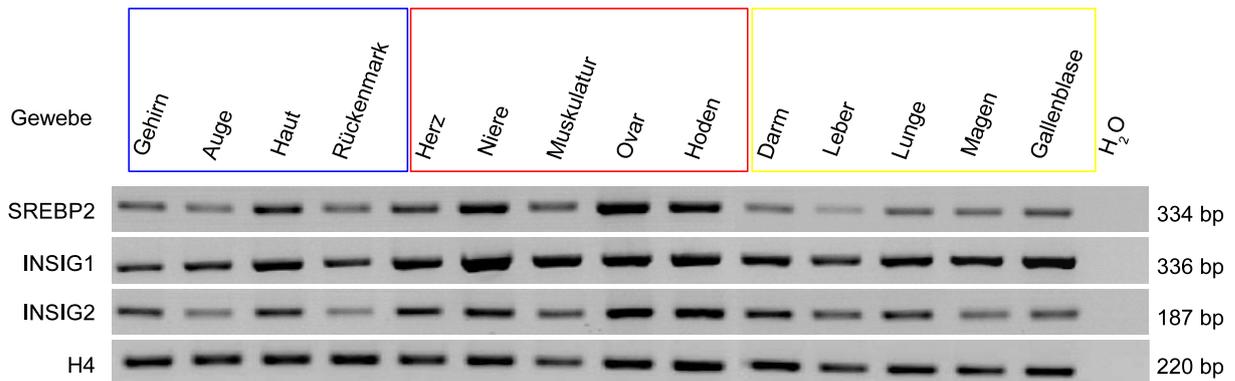
Während der Gastrulation (NF St. 10–13) und der frühen Neurogenese (ab NF St. 14–16) sank das Expressionsniveau von SREBP2, INSIG1 und INSIG2. Ab dem NF St. 19–20 konnte aber wieder ein Anstieg der Expression beobachtet werden (Abbildung 3.9).

Um nach der zeitlichen und räumlichen Expressionsanalyse während der Embryonalentwicklung auch einen ersten Eindruck der Expression von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 im adulten Tier zu erhalten, wurden semiquantitative RT-PCR Studien mit total-RNA verschiedener adulter Gewebe aus *Xenopus laevis* durchgeführt (Abbildung 3.10). Alle Gewebetypen und Organe haben ihren Ursprung in den drei Keimblättern Ekto-, Meso-, und Endoderm. Die Proben für die RT-PCR Reaktion wurden entsprechend ihres Anlagenplanes wie folgt aufgetragen: Gehirn, Auge, Haut und Rückenmark (Ektoderm, blauer

Rahmen); Herz, Niere, Muskulatur, Ovar und Hoden (Mesoderm, roter Rahmen) und Darm, Leber, Lunge, Magen und Gallenblase (Endoderm, gelber Rahmen).



**Abbildung 3.9:** RNA Expression von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in den *Xenopus*-Embryonalstadien. Semiquantitative RT-PCR mit total-RNA; Als Standard für die relative Quantifizierung der RNA diente der Nachweis der ubiquitär exprimierten RNA von Histon H4 (H4), als Kontrolle wurde H<sub>2</sub>O statt cDNA in der RT-PCR verwendet. Die Produktgrößen sind neben der jeweiligen Zeile rechts dargestellt: SREBP2 334 bp, 26 Zyklen; INSIG1 336 bp, 28 Zyklen; INSIG2 187 bp, 28 Zyklen; Histon H4 220 bp, 26 Zyklen.



**Abbildung 3.10:** RNA Expression von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in adultem Gewebe aus *Xenopus laevis*. Semiquantitative RT-PCR mit total-RNA; Als Standard für die relative Quantifizierung der RNA, diente der Nachweis der ubiquitär exprimierten RNA von Histon H4 (H4), als Kontrolle wurde H<sub>2</sub>O statt cDNA in der RT-PCR verwendet. Die Produktgrößen sind neben der jeweiligen Zeile rechts dargestellt: SREBP2 334 bp, 26 Zyklen; INSIG1 336 bp, 28 Zyklen; INSIG2 187 bp, 28 Zyklen; Histon H4 220 bp, 26 Zyklen; blau = ektodermaler Ursprung, rot = mesodermaler Ursprung, gelb = endodermaler Ursprung.

Es konnte in allen hier getesteten Geweben und Organen eine Expression von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 gezeigt werden (Abbildung 3.10).

### 3.4 Einfluss der Inhibition von *Xenopus*-SREBP2, INSIG1 und INSIG2 auf die Entwicklung

#### 3.4.1 Inhibierung der Translation endogener RNA mit Hilfe von SREBP2 und INSIG-spezifischen Morpholinos

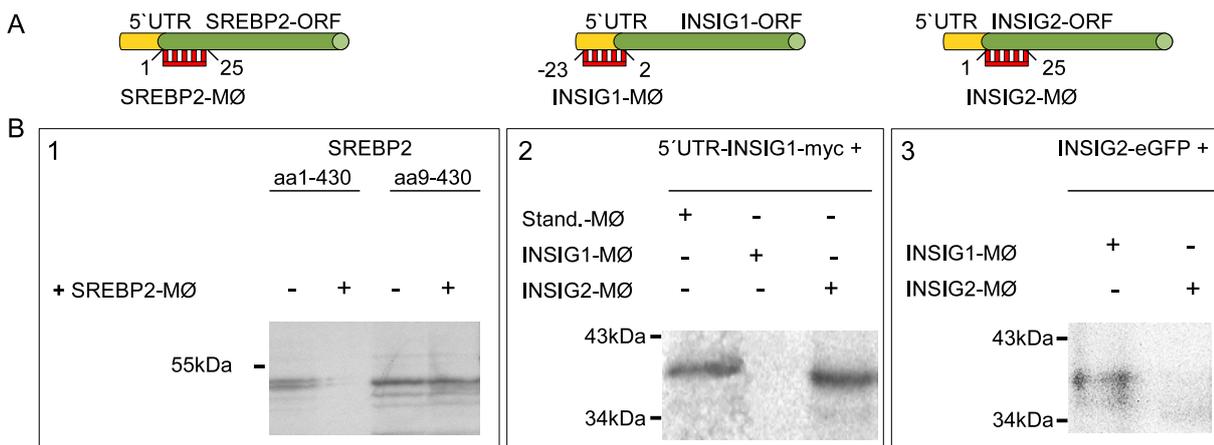
Zur Durchführung von Funktionsverluststudien hat sich für *Xenopus* die Anwendung von Morpholino-*antisense*-Oligonukleotiden (Morpholinos, MØ) als besonders effizient herausgestellt (Abschnitt 2.11.1). Dafür wurden drei Morpholinos mit einer Länge von je 25 Nukleotiden generiert: SREBP2-MØ, INSIG1-MØ und INSIG2-MØ. Der SREBP2-MØ und der INSIG2-MØ binden an die ersten 25 Nukleotide des offenen Leserahmens ihrer dazugehörigen endogenen mRNA (Abbildung 3.11, A), während der INSIG1-MØ an die letzten 23 Nukleotide der 5' UTR und die ersten zwei Nukleotide des offenen Leserahmens bindet

(Abbildung 3.11, A). Um diese Morpholinos auf ihre Wirksamkeit und Spezifität hin zu überprüfen, wurden *in vitro* Transkriptions- und Translationsassays (TnT<sup>®</sup>-Coupled Reticulocyte Lysate system, Abschnitt 2.18.1) durchgeführt (Abbildung 3.11, B). Der Nachweis erfolgte autoradiographisch für SREBP2 und INSIG1 (Abbildung 3.11, B1 und B2) sowie durch Western Blot für INSIG2 (Abbildung 3.11, B3). Bei SREBP2aa430 konnte ohne Zusatz des SREBP2-MØ Proteinexpression autoradiographisch nachgewiesen werden, während mit Zugabe des Morpholinos keine SREBP2-Proteinexpression stattfand. Dem Konstrukt SREBP2aa9-430 fehlen die ersten 8 Aminosäuren des offenen Leserahmens, sodass der SREBP2-MØ nicht binden kann, und SREBP2 nachgewiesen wurde (Abbildung 3.11, B1).

Bei 5'UTR-INSIG1-myc wurde INSIG1 ebenfalls autoradiographisch nachgewiesen. Als Kontrolle diente ein Standard-MØ (Stand.-MØ), dessen Sequenz so gewählt wurde, dass dieser mit keiner bekannten *Xenopus* RNA eine Hybridisierung eingehen kann (die Bindungssequenz ist spezifisch für das Transkript des humanen  $\beta$ -Globin Gens). Somit konnte der Standard-MØ nicht die INSIG1 Proteinsynthese blockieren (Abbildung 3.11, B2). Die Zugabe von INSIG2 konnte ebenfalls nicht die Proteinsynthese von INSIG1 blockieren, und diente ebenfalls als Kontrolle.

Aufgrund der geringen Anzahl von Methioninen in INSIG2 (6 Methionine), die einen autoradiographischen Nachweis über die markierten Methionine unmöglich machte, erfolgte der Nachweis im Western Blot mit Antikörpern gegen den eGFP-tag. Wie erwartet, blockiert der INSIG2-MØ die INSIG2-Proteinsynthese, während die Zugabe von INSIG1 die Proteinsynthese von INSIG2 nicht blockieren kann und somit als Kontrolle diente.

Zusammenfassend waren alle getesteten Morpholinos in der Lage die jeweilige Proteinsynthese zu blockieren.



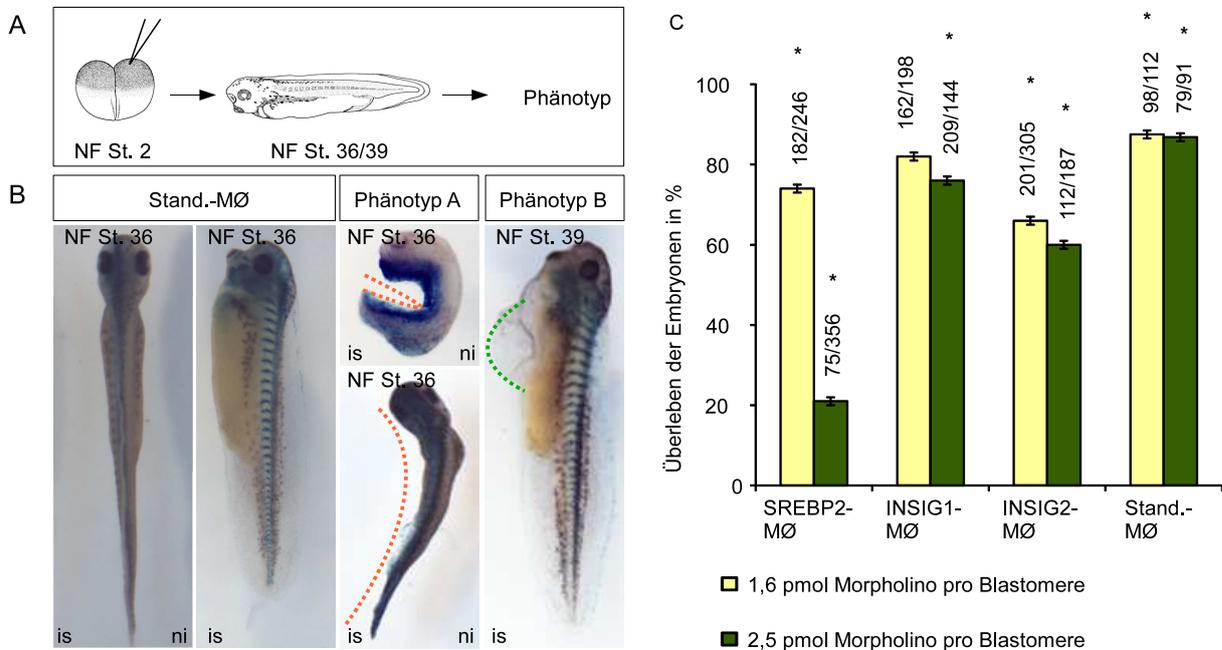
**Abbildung 3.11: Spezifitätstest des SREBP2, INSIG1 und INSIG2-Morpholinos.** (A) Schematische Darstellung der Bindungsstelle des SREBP2-MØ, INSIG1-MØ und INSIG2-MØ an ihre jeweilige endogene RNA; (B) Überprüfung des spezifischen Bindungsverhaltens der Morpholinos; (B1) *in vitro* Transkription und Translation des N-Terminus von SREBP2: SREBP2aa1-430 sowie SREBP2aa9-430; Das Translationsprodukt wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch über radioaktiv markiertes Methionin nachgewiesen. (B2) *in vitro* Translation von *in vitro* transkribiertem INSIG1; Der Nachweis einer Translation erfolgte autoradiographisch im SDS-Gel. (B3) *in vitro* Translation von *in vitro* transkribiertem INSIG2-eGFP; Der Nachweis erfolgte durch Western Blot-Analyse gegen den GFP-tag. Der Standard-MØ diente als Kontrolle. SREBP2aa1-430 (~47 kDa), SREBP2aa9-430 (~46 kDa), INSIG1-myc (~37 kDa), INSIG2-eGFP (~41 kDa).

Die SREBP2, INSIG1 und INSIG2 spezifischen Oligonukleotide wurden anschließend für Funktionsverluststudien in *Xenopus laevis* Embryonen injiziert, der resultierende Phänotyp wurde dokumentiert und durch WMISH-Analysen mit ausgesuchten Markergenen des Meso-, Endo- und Ektoderms näher klassifiziert.

### 3.4.2 Phänotypen nach Suppression der Funktion von SREBP2, INSIG1 und INSIG2

Die optimale Menge des einzusetzenden Morpholinos (MØ) wurde *in vivo* durch Injektionen unterschiedlicher Mengen (1,6 pg; 2,5 pg) des MØ bestimmt. Durch die Injektion in eine Blastomere des Zwei-Zell-Stadiums wurde nur eine Körperhälfte beeinflusst, sodass die andere Körperhälfte als inter-

ne Kontrolle diene. Synthetische RNA für  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) wurde co-injiziert und diene der Unterscheidung zwischen injizierter zu nicht-injizierter Seite. Die Embryonen wurden bis zum NF St. 36–39 kultiviert und die durch den Funktionsverlust entstandene Ausprägung des Phänotyps zunächst quantitativ analysiert (Abbildung 3.12, A). Da die mit 2,5 pmol SREBP2-MØ-injizierten Embryonen massive Gastrulationsdefekte aufwiesen und eine hohe Mortalitätsrate zeigten, wurde die MØ-Dosis auf 1,6 pmol herabgesetzt (Abbildung 3.12, C). Bei INSIG1 und INSIG2 wurde die MØ-Dosis bei 2,5 pmol beibehalten (Abbildung 3.12, C).



**Abbildung 3.12: Durch Funktionsverlust entstandene Phänotypen.** (A) Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufes. Injektion des entsprechenden Morpholinos in eine Zelle des Zwei-Zell-Stadiums und Kultivierung bis NF St. 36 bzw. 39. Anschließend wurde makroskopisch der Phänotyp analysiert. (B) Der Standard-Morpholino (Stand.-MØ), zeigte wie zu erwarten, keinen abnormen Phänotyp. Die mit SREBP2-MØ, INSIG1-MØ und INSIG2-MØ-injizierten Embryonen brachten zwei Hauptphänotypen hervor. Phänotyp A zeigte eine Krümmung der Körperachse zur injizierten Seite (verdeutlicht durch die orangefarbene gestrichelte Linie), die eine Krümmung der Finne mit sich zieht. Außerdem entwickelten die Embryonen verkleinerte Kopfstrukturen. Phänotyp B durch Ödembildung im ventralen-anterioren Bereich (grün gestrichelte Linie). ni = nicht injizierte Seite, is = injizierte Seite ( $\beta$ -Gal Färbung), Bar = 500  $\mu$ m. (C) Statistische Auswertung der Überlebensrate der Embryonen nach Injektion von 1,6 bzw. 2,5 pmol des jeweiligen Morpholinos in eine Blastomere des Zwei-Zell-Stadiums und anschließender Kultivierung bis NF St. 36. Auf der Balkenspitze sind jeweils die Anzahl der überlebenden Embryonen im Vergleich zu den gesamten beobachteten Embryonen dargestellt. Die Ordinate zeigt das Überleben der Embryonen in % und die Abszisse die Injektion des jeweiligen Morpholinos. Statistische Auswertung mittels T-Test \*  $p < 0,05$ . Als Vergleichskontrolle diene der Stand.-MØ. Anzahl unabhängiger Experimente > 3.

Die zwei Hauptphänotypen welche als Ergebnis der MØ-Injektion beobachtet werden konnten, zeichneten sich durch folgende Eigenschaften aus: Phänotyp A zeigte sich in einer unterschiedlich starken Krümmung der Körperachse zur injizierten Seite, welche eine Biegung der Finne mit sich brachte. Die Embryonen wiesen auch im Vergleich zu den Kontrollembryonen verkleinerte Kopfstrukturen auf. Bei Phänotyp B wurden perikardiale Ödeme an der ventralen Seite der Embryonen beobachtet (Abbildung 3.12, B). Phänotyp A war am häufigsten bei SREBP2-MØ injizierten Embryonen mit 33,9 % ( $n = 81/239$ ) vertreten, während Phänotyp B mit nur 2,9 % ( $n = 7/239$ ) vernachlässigt werden kann. Die INSIG1-MØ injizierten Embryonen zeigten bei 26,6 % ( $n = 17/64$ ) der injizierten Embryonen ein Verlust abdominalen Strukturen und 23,4 % ( $n = 15/64$ ) perikardiale Ödeme (Phänotyp B). Nur 6,3 % ( $n = 4/64$ ) der untersuchten Embryonen zeigten Phänotyp A. Bei den mit INSIG2-MØ injizierten Embryonen zeigten 15,1 % ( $n = 14/93$ ) Phänotyp A und 14 % ( $n = 13/93$ ) Phänotyp B.

### 3.4.3 Einfluss des SREBP2 Funktionsverlustes auf die Zellproliferation und Zellapoptose

Die mit SREBP2-MØ injizierten Embryonen zeichneten sich insbesondere durch gekrümmte Körperachsen zur injizierten Seite hin aus (Abbildung 3.12). Die Ursache für die Krümmung könnte an mangelnder Zellproliferation oder an einer erhöhten Apoptoserate liegen. Um diese Frage zu klären, dienten TUNEL- und Zellproliferationsanalysen (pH3) an ganzen Embryonen (Abschnitt 2.13). Dazu wurden Embryonen im Zwei-Zell-Stadium mit SREBP2-MØ und  $\beta$ -Gal-mRNA als Zelllinienmarker co-injiziert und bis zum NF St. 30–32 kultiviert.

Die Injektion des SREBP2-MØ führte zu einer gesteigerten Rate apoptotischer Zellen im Bereich des Kopfes und der Finne (30 Zellen/Quadrant; \*  $p < 0,05$ ; Abbildung 3.13, Ae) im Vergleich zu der nicht-injizierten Kontrollseite (13 Zellen/Quadrant; Abbildung 3.13, Ad).

Die TUNEL-Analyse ist eine gute Möglichkeit um apoptotische Zellen in ganzen Embryonen zu detektieren (Hensey & Gaultier, 1998). Die Injektion von Standard-Morpholino diente zur Kontrolle (7 Zellen/Quadrant auf der injizierten zu 4 Zellen/Quadrant auf der nicht injizierten Seite, Abbildung 3.13, Aa–c).

Der Nachweis proliferierender Zellen wurde mittels Immunochemie durch Nachweis des Mitosemarkers phosphoryliertes Histon H3 (pH3) erbracht (Saka & Smith, 2001; Stevely & Stocken, 1968). Die Anzahl an pH3 positiven Zellen verhielt sich bei SREBP2-MØ injizierten Embryonen (45 Zellen/Quadrant auf der injizierten Seite zu 42 Zellen/Quadrant auf der nicht injizierten Seite, Abbildung 3.13, Bj–l) ähnlich zu den mit Standard-MØ injizierten Embryonen (31 Zellen/Quadrant auf der injizierten Seite zu 29 Zellen/Quadrant auf der nicht injizierten Seite, Abbildung 3.13, Bg–i).

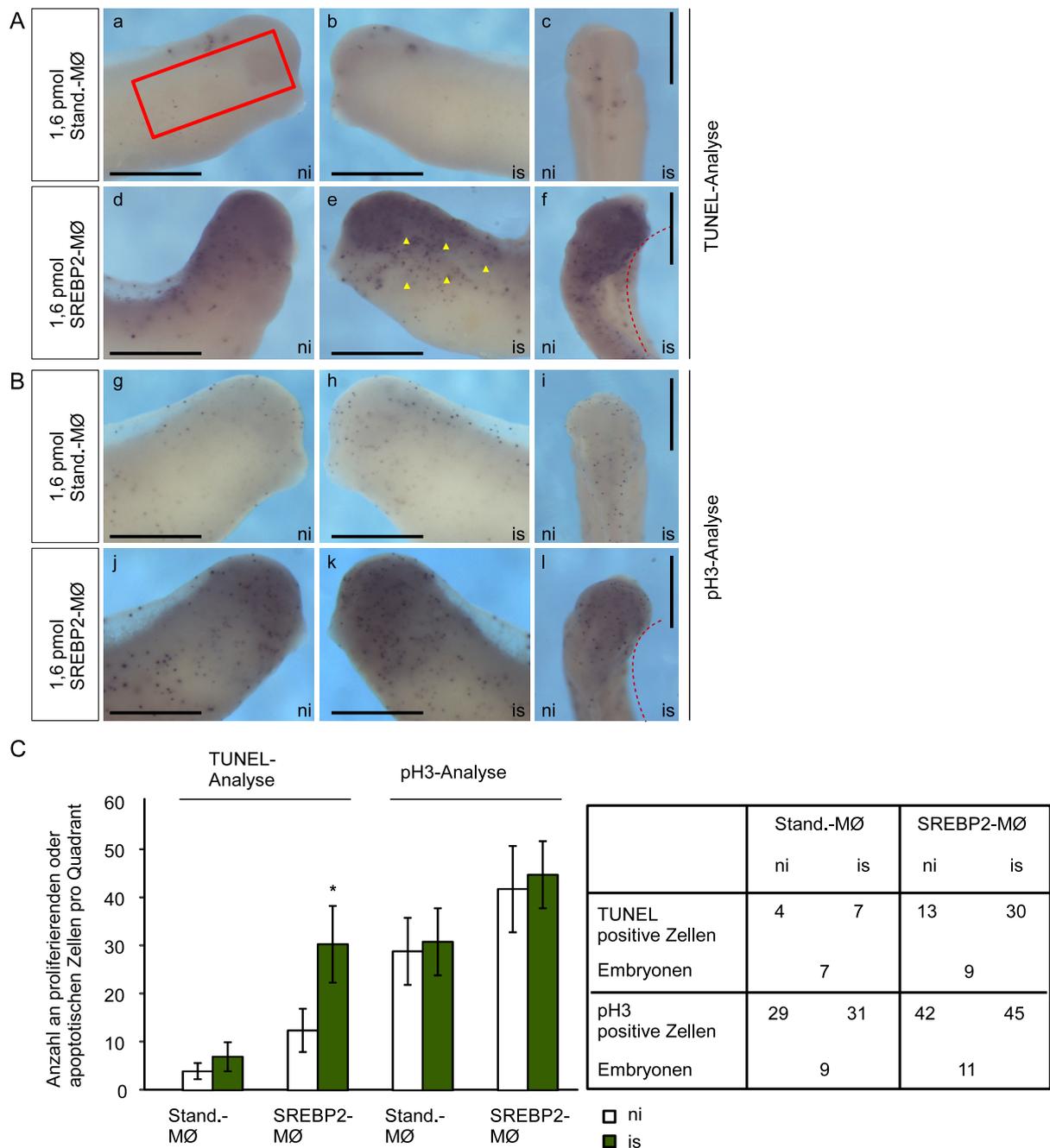
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Herabregulierung von SREBP2 zu einer deutlich gesteigerten Apoptose auf der injizierten Embryoseite führte, während die Proliferation davon unberührt blieb.

### 3.4.4 Untersuchungen zur Funktion von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in der primären Neurogenese

In allen untersuchten, adulten Gewebearten konnte eine Expression von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 nachgewiesen werden (Abbildung 3.10). Da sich die gewonnenen Daten nicht auf den Embryo übertragen lassen, sollte überprüft werden, welches der Keimblätter während der Embryogenese durch einen Verlust von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 betroffen ist. Dafür wurde die Expression verschiedener meso-, ekto- und endodermaler Markergene in SREBP2-MØ, INSIG1-MØ und INSIG2-MØ injizierten Embryonen untersucht.

Nach Injektion des jeweiligen MØ in eine Blastomere des Zwei-Zell-Stadium, wurden die Embryonen bis zum frühen Neurula-(NF St. 15) bzw. bis zum Schwanzknospenstadium (NF St. 30) kultiviert und zur Visualisierung der Expressionsdomänen der untersuchten Gene WMISH-Untersuchungen unterzogen. Als panmesodermaler Marker, welcher in präsumtiven mesodermalen Zellen rund um die Blastopore und dann im Notochord exprimiert wird, wurde *brachyury* (Xbra) ausgewählt. Endodermin wurde als Markergene für das Endoderm verwendet, da dieser Marker im frühen Endoderm und im Bereich des Spemann-Organisators exprimiert wird (Ahmed *et al.*, 2004). Die Analyse der WMISH von SREBP2-MØ, INSIG1-MØ und INSIG2-MØ injizierten Embryonen zeigten keine Veränderung des Expressionsverhaltens von Xbra und Endodermin (Daten nicht gezeigt).

Somit kann davon ausgegangen werden, dass Meso- und Endoderm durch den Funktionsverlust weitestgehend unbeeinflusst bleiben.



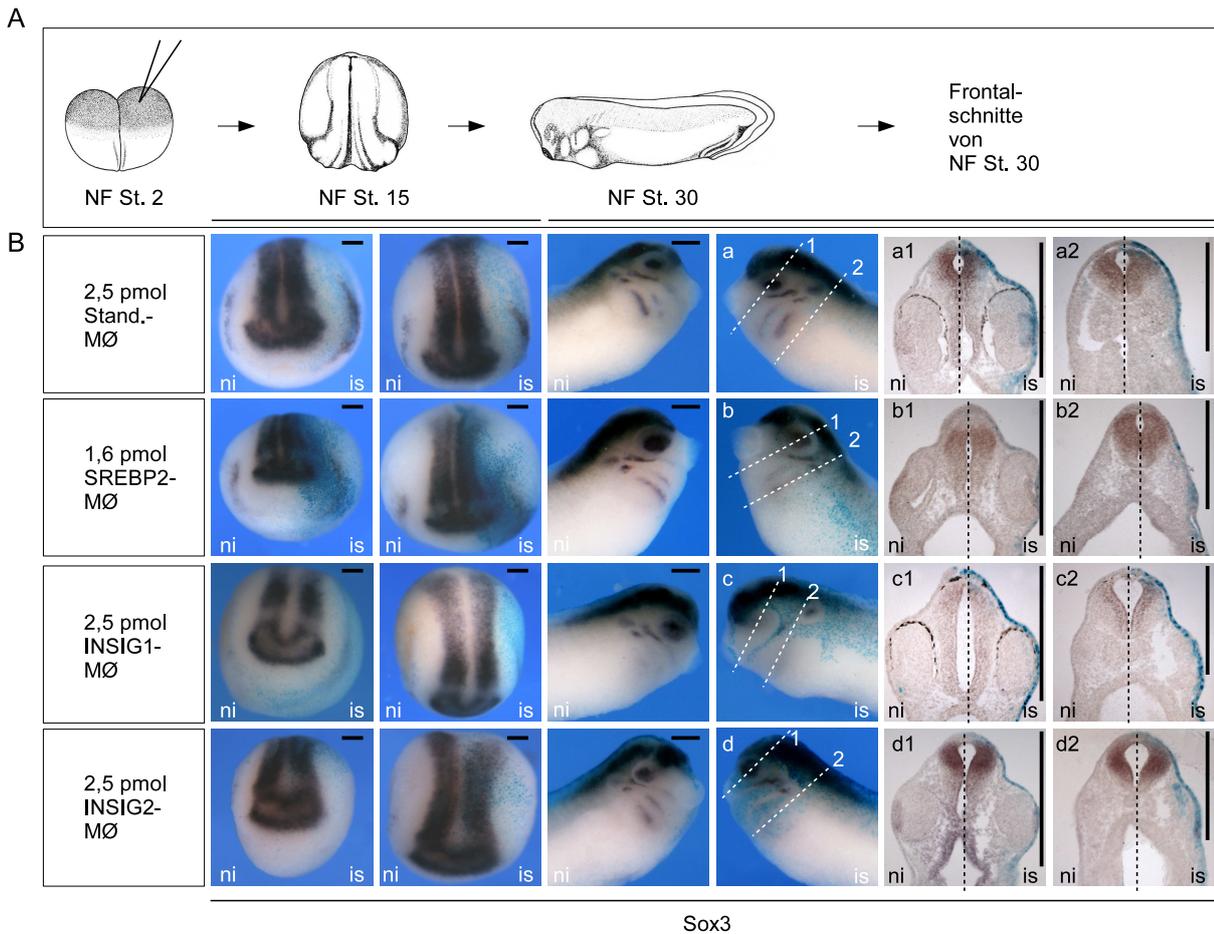
**Abbildung 3.13: Analyse der Apoptose- und Proliferationsrate in SREBP2-Morpholino injizierten Embryonen.** SREBP2-MØ wurde zusammen mit  $\beta$ -Gal-mRNA als Zelllinienmarker in eine Zelle des Zwei-Zell-Stadiums injiziert und die Embryonen wurden bis NF St. 30–32 kultiviert und anschließend TUNEL (A) bzw. Proliferationsanalysen (B) unterzogen. Gezeigt ist die laterale Ansicht und bei c, f, i, l die dorsale Ansicht des Kopfes. Die rot gestrichelte Linie dokumentiert die Krümmung des Embryos. ni = nicht injizierte Kontrollseite, is = injizierte Seite, gelbe Pfeilspitzen = positive Zellen. Die Zählung von apoptotischen bzw. proliferierenden Zellen erfolgte bei allen Embryonen im Bereich des roten Rahmens. Bar = 500  $\mu$ m. (C) Statistische Auswertung der apoptotischen bzw. proliferierenden Zellen pro ausgezähltem Quadrant (roter Rahmen) mittels T-Test. Die schraffierten Balken dokumentieren die nicht injizierte Kontrollseite, diejenigen ohne Schraffur dokumentieren die injizierte Seite. \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur nicht injizierten Kontrollseite. In der Tabelle sind die durchschnittlichen positiven Zellen pro Quadrant (markiert durch roten Rahmen) und die Anzahl an untersuchten Embryonen angegeben.

Bereits Signale in den WMISH-Analysen mit den Sonden für SREBP2, INSIG1 und INSIG2 zeigten Expressionsmuster im Bereich des präsumtiven Kopfes und des Neuralrohres (Abbildung 3.6, Abbildung 3.7). Auch die Funktionsverluststudien unterstützen die Annahme, dass die Gehirnentwicklung und die Neurogenese durch die Unterdrückung der SREBP2-Aktivität beeinträchtigt ist (Phänotyp A, Abbildung 3.12, B).

Die Embryogenese des Nervensystems in Vertebraten ist an eine räumliche und zeitliche Koordination zahlreicher Prozesse wie Neuralinduktion, Proliferation und Differenzierung gebunden. Um nun aufzuklären

welche Rolle SREBP2, INSIG1 und INSIG2 im Verlauf der Neurogenese spielen, wurden die entsprechenden Morpholinos in *Xenopus laevis*-Embryonen injiziert und die Effekte auf die Expression neuraler Markergene hin untersucht. Hierfür wurden drei gut charakterisierte Markergene Xsox3, Olig3 sowie N-Tubulin genutzt, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Neurogenese exprimiert werden. Xsox3 ist ein Transkriptionsfaktor, der als ein früher Marker von panneuraler Zellen der frühen Neuralplatte beschrieben wurde. Er wird in proliferierenden, neuralen Vorläuferzellen exprimiert und grenzt die zukünftige Neuralplatte vom nicht neuralen Ektoderm ab (Bylund *et al.*, 2003; Graham *et al.*, 2003; Miyagi *et al.*, 2004).

Weder Embryonen im frühen Neurulastadium noch im Schwanzknospenstadium zeigten nach Unterdrückung von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 (Abbildung 3.14, B) eine Veränderung der Sox3 Expressionsdomäne.



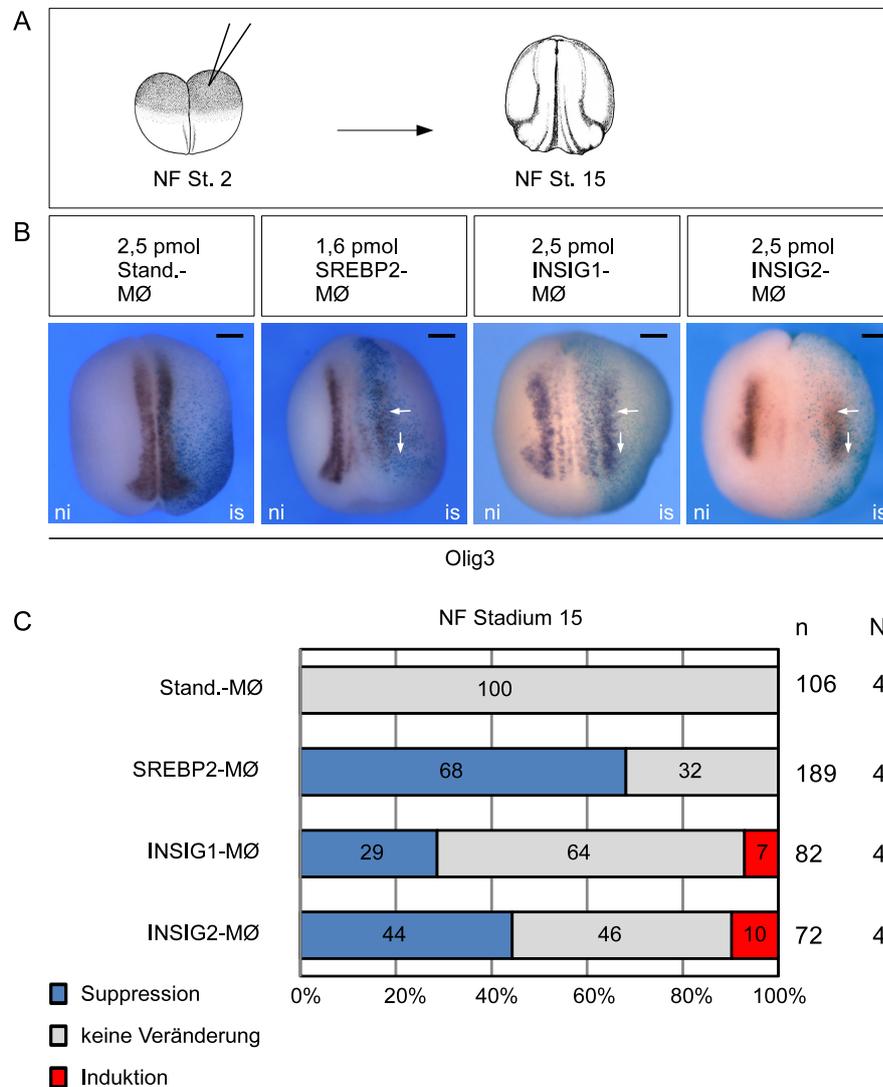
**Abbildung 3.14: WMISH-Analyse der Expression von Sox3 in SREBP2-MØ, INSIG1-MØ und INSIG2-MØ injizierten Embryonen.** (A) Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufes; Der jeweilige Morpholino wurde zusammen mit  $\beta$ -Gal-mRNA (Blaufärbung, injizierte Seite) in eine Zelle des Zwei-Zell-Stadiums injiziert und die Embryonen wurden bis NF St. 15 bzw. 30 kultiviert und einer WMISH-Untersuchung auf die RNA Expression des Markers XSox3 unterzogen. (B) Als Kontrolle diente die Injektion von 2,5 pmol Standard-Morpholino. Die gestrichelten Linien zeigen die Ebene des daneben abgebildeten Frontalschnittes. Die gestrichelte waagerechte Linie im Schnitt dokumentiert die Mittellinie der Embryonen. Schnittdicke 30  $\mu$ m. Bar = 400  $\mu$ m. ni = nicht injizierte Kontrollseite, is = injizierte Seite.

Auch Transversalschnitte (Abbildung 3.14, B) durch SREBP2-MØ, INSIG1-MØ und INSIG2-MØ injizierte Embryonen im NF St. 30 zeigten keine Änderung der Expression im Neuralrohr, den plakodialen Expressionsdomänen und in der Zone der zukünftigen Augenanlage (keine Veränderung bei 83,3 % bei SREBP2-MØ (n = 5/6); 75 % bei INSIG1-MØ (n = 3/4) und 83,3 % bei INSIG2-MØ (n = 5/6) injizierten Embryonen).

Der Transkriptionsfaktor Olig3 dient der Spezifizierung von Oligodendrozyten, die zur Myelinisierung der Axone im Zentralnervensystem benötigt werden (Bronchain *et al.*, 2007). In *Xenopus tropicalis* werden Olig3 Transkripte während der Gastrulation in Clustern von longitudinalen Zellen parallel zur

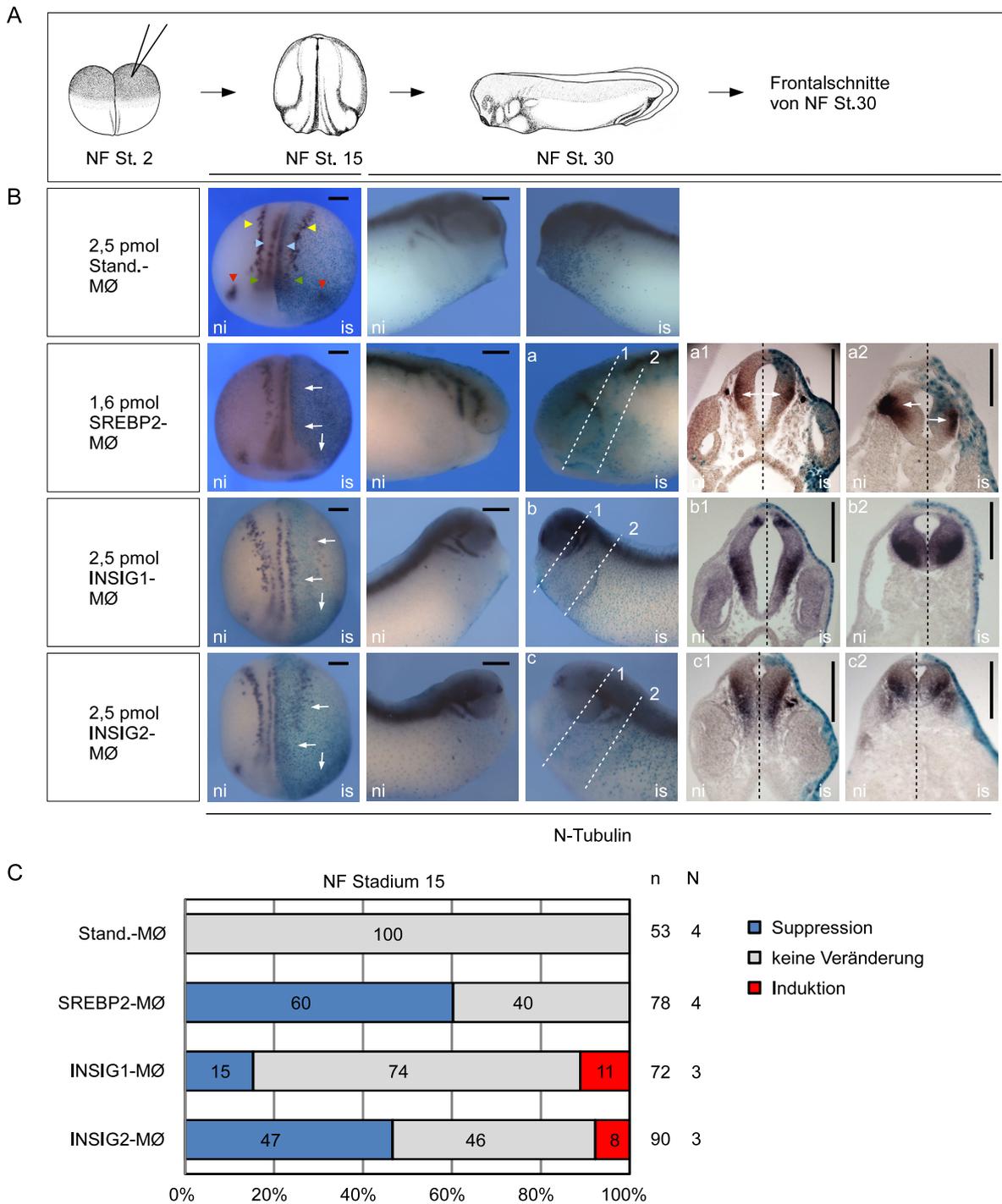
Mittellinie (Bronchain *et al.*, 2007) des zukünftigen Hinterhirns sichtbar. Die Injektionen von Morpholino-Oligonukleotiden gegen SREBP2, INSIG1 und INSIG2 zeigte jeweils eine reduzierte Olig3-Expression der Neuralplatte in NF St. 15 Embryonen der untersuchten SREBP2-MØ injizierten Embryonen (68,1 %, n = 79/116), INSIG1-MØ injizierten Embryonen (28,6 %, n = 16/56) und der INSIG2-MØ injizierten Embryonen (44,3 %, n = 27/61), siehe Abbildung 3.15.

Es kann festgehalten werden, dass der Funktionsverlust von SREBP2 sowie von INSIG1 und INSIG2 Einfluss auf die Spezifizierung von Oligodendrozyten zu haben scheint.



**Abbildung 3.15: WMISH-Analyse der Expression von Olig3 in SREBP2-MØ, INSIG1-MØ und INSIG2-MØ injizierten Embryonen.** (A) Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs. Injektion des jeweiligen Morpholinos in eine Blastomere des Zwei-Zell-Stadiums und Kultivierung der Embryonen bis NF St. 15 mit anschließender WMISH-Analyse des Markergens Olig3. (B) Als Kontrolle diente die Injektion von 2,5 pmol Standard-Morpholino. Weiße Pfeile zeigen Änderungen der Expression an. (C) Prozentuale Verteilung des Effekts des SREBP2, INSIG1 und INSIG2 Funktionsverlustes auf die Olig3 Expression bei *Xenopus laevis* Embryonen. ni = nicht injizierte Kontrollseite, is = injizierte Seite (erkennbar an blauer  $\beta$ -Gal Färbung); n = Gesamtanzahl an Embryonen; N = Anzahl unabhängiger Experimente; Bar = 250  $\mu$ m.

N-Tubulin ist ein Neuronen spezifisches Tubulin, welches zum Nachweis differenzierter Neurone genutzt wird. In *Xenopus*-Embryonen wird N-Tubulin in drei bilateralen Streifen in primären Neuronen der offenen Neuralplatte exprimiert. Diese sind beidseits der Mittellinie des Embryos im NF St. 15 als mediale, intermediäre und longitudinale Domänen sichtbar. Aus ihnen entwickeln sich sensorische Neuronen, Interneuronen und Motoneuronen (Moody *et al.*, 1996).



**Abbildung 3.16: WMISH-Analyse der Expression von N-Tubulin nach Funktionsverlust von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in *Xenopus*-Embryonen.** (A) Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufes. Der jeweilige Morpholino wurde zusammen mit  $\beta$ -Gal-mRNA in eine Blastomere des Zwei-Zell-Stadiums injiziert und die Embryonen bis NF St. 15 bzw. 30 kultiviert und WMISH-Analysen unterzogen. (B) Als Kontrolle diente die Injektion von 2,5 pmol Standard-Morpholino in eine Blastomere des Zwei-Zell-Stadiums. Die gestrichelte Linie zeigt die Ebene des daneben abgebildeten Frontalschnittes. Schnittdicke von 30  $\mu$ m. ni = nicht injizierte Kontrollseite, is = injizierte Seite (erkennbar an blauer  $\beta$ -Gal Färbung); Bar = 250  $\mu$ m. Rote Pfeilspitze = Trigeminalplakoden, gelbe Pfeilspitze = laterale Streifen aus dessen Vorläuferzellen die sensorischen Nerven entstehen, blaue Pfeilspitze = mediale Streifen aus denen sich die Motoneuronen entwickeln, grüne Pfeilspitze = intermediäre Streifen aus denen sich die Interneurone entwickeln. Weiße Pfeile zeigen Änderungen der Expression an. (C) Prozentuale Verteilung des Effektes des SREBP2, INSIG1 und INSIG2 Funktionsverlustes auf die N-Tubulin Expression in *Xenopus laevis* Embryonen des NF St. 15. n = gesamte Anzahl an Embryonen; N = Anzahl unabhängiger Experimente.

Die Unterdrückung von SREBP2 (60,3 %; n = 47/78) und INSIG2 (46,7 %; n = 42/90) führte zu einer Hemmung der Transkription des neuralen Differenzierungsmarkers im offenen Neuralplattenstadium. Der INSIG1-Morpholino hatte dagegen keinen Einfluss auf die N-Tubulin Expression (73,6 %; n = 53/72). Im Schwanzknospentstadium (NF St. 30) konnte makroskopisch keine Reduktion der placodialen Expressions-

domänen bei den mit SREBP2-MØ, INSIG1-MØ sowie INSIG2-MØ injizierten Embryonen beobachtet werden. Allerdings zeigten Transversalschnitte durch NF St. 30 der SREBP2-MØ Embryonen (80 %; n = 4/5) eine Suppression der N-Tubulin Expression. Die mit INSIG1-MØ injizierten Embryonen (80 %; n = 4/5) und INSIG2-MØ injizierten Embryonen (80 %; n = 4/5) zeigten in Transversalschnitten keine Änderung der N-Tubulin Expression.

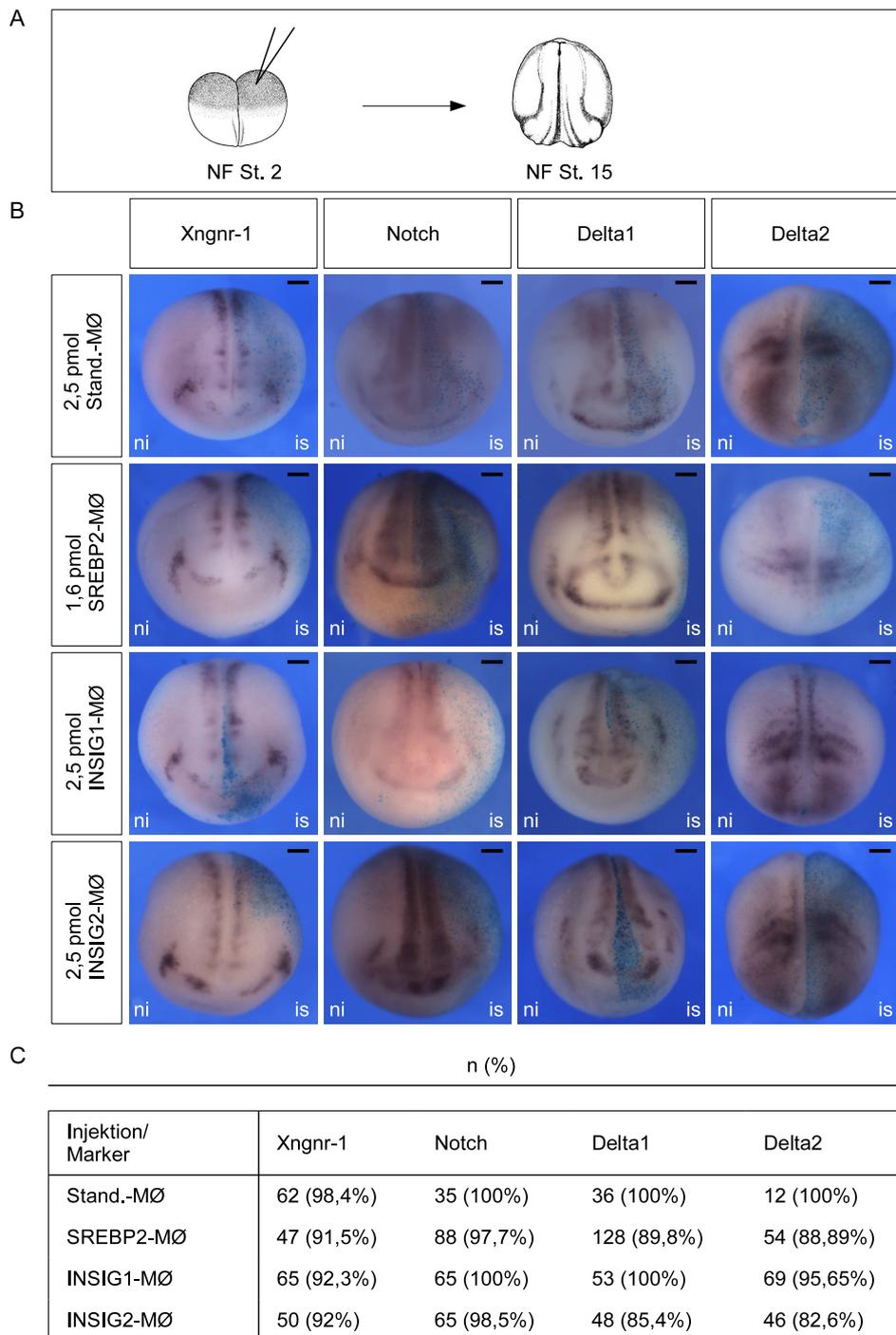
### **3.4.5 Analyse von Gehirn-Markern sowie Markergenen des Notch-Signalweges bei Funktionsverlust von SREBP2, INSIG1 sowie INSIG2**

Zur Selektion neuraler und nicht-neuraler Zellen aus der Neuralplatte, wurden die ausgewählten Markergene *Xngnr1*, *Notch*, *Delta1* und *Delta2* des Notch-Signalweges nach Funktionsverlust von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 auf ihre Expression hin untersucht.

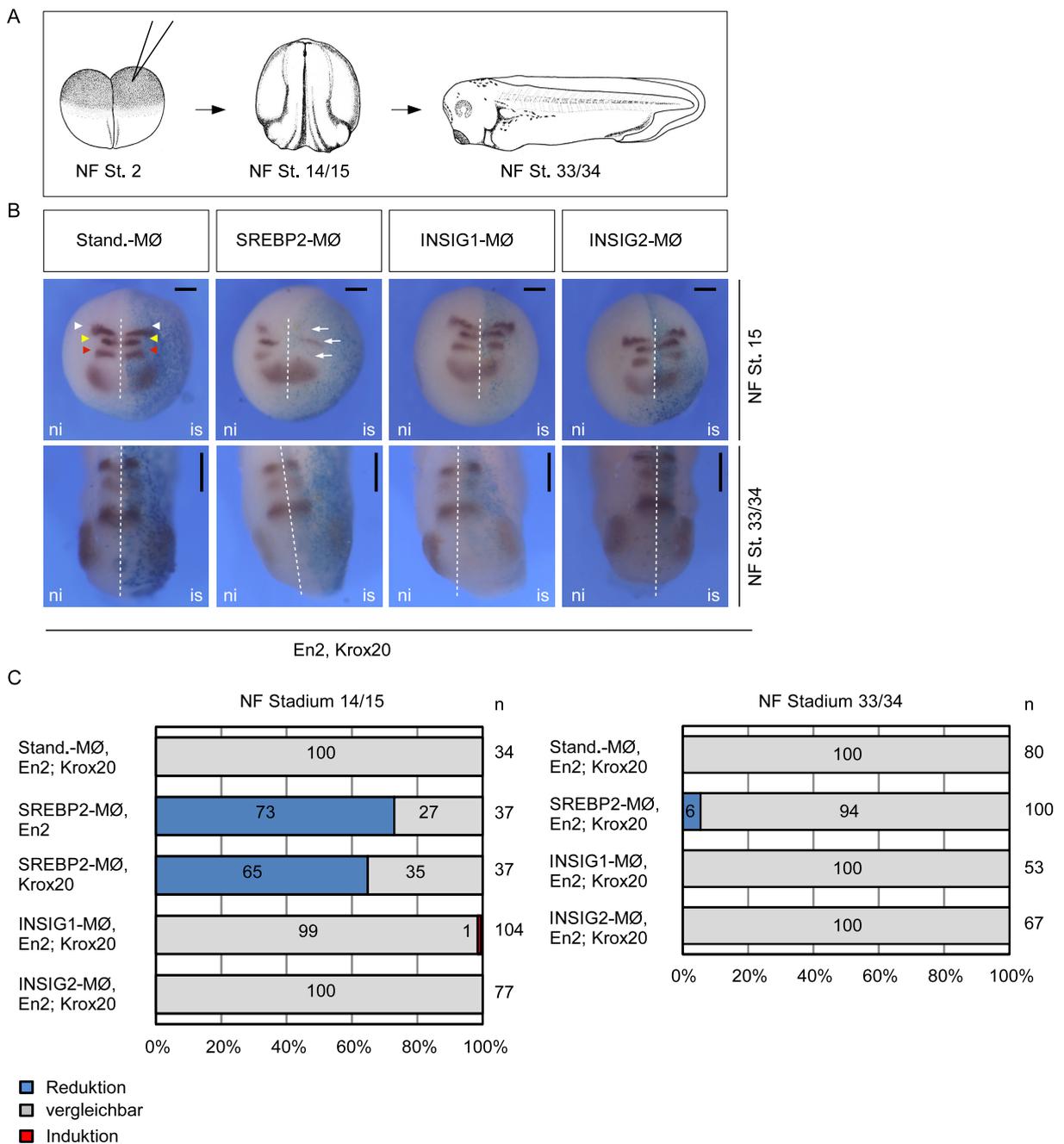
Die Unterdrückung von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 zeigte bei allen vier untersuchten Markergenen keine Änderungen im Expressionsmuster (Abbildung 3.17, B und C). Somit konnte innerhalb dieser Studie keine Korrelation zwischen dem Notch-Signalweg und dem Funktionsverlust von SREBP2 sowie INSIG1 und INSIG2 festgestellt werden.

Zur Klärung ob und welche Teile des Gehirns durch Funktionsverlust von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 betroffen sind, wurden WMISH-Analysen mit den Markergenen *Krox20* und *En2* durchgeführt.

*Krox20* gehört zu den Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren und wird in zwei quer laufenden Streifen exprimiert, welche mit den Rhombomeren 3 und 5 des Hinterhirns übereinstimmen. *Engrailed* (*En2*) ist ein Homeodomäne-Transkriptionsfaktor, der als Streifen in der anterioren Neuralplatte in einer Region, welche das Mittelhirn mit dem Hinterhirn verbindet, exprimiert wird. Im Neurulastadium (NF St. 15) wurde bei den SREBP2-MØ injizierten Embryonen eine Suppression der *En2* (73 %, n = 37, Abbildung 3.18, C) und *Krox20*-Domäne beobachtet (65 %, n = 37, Abbildung 3.18, C), während die INSIG1-MØ und INSIG2-MØ injizierten Embryonen keine Veränderung in der *En2* und *Krox20* Expression zeigten (Abbildung 3.18, B und C). Im NF St. 33/34 konnte bei den SREBP2-MØ, INSIG1-MØ und INSIG2-MØ injizierten Embryonen keine Änderung der *En2* und *Krox20* Expression beobachtet werden (Abbildung 3.18, B und C).



**Abbildung 3.17: WMISH-Analyse der Expression von Markergenen des Notch-Signalweges in SREBP2, INSIG1 und INSIG2-Morpholino injizierten Embryonen.** (A) Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufes. Der jeweilige Morpholino wurde zusammen mit  $\beta$ -Gal-mRNA (Blaufärbung, injizierte Seite) in eine Zelle des Zwei-Zell-Stadiums injiziert und die Embryonen wurden bis NF St. 15 kultiviert und anschließend WMISH-Untersuchungen unterzogen. (B) Als Kontrolle diente die Injektion von 2,5 pmol Standard-Morpholino. ni = nicht injizierte Kontrollseite, is = injizierte Seite. Bar = 250  $\mu$ m. (C) Bei allen injizierten Embryonen konnte keine Änderung des Expressionsprofils des jeweiligen Markergens beobachtet werden (verdeutlicht an den prozentualen Werten in Klammern). n = Anzahl an injizierten NF St. 14/15 Embryonen die mit der jeweiligen Probe Standard-MØ, SREBP2-MØ, INSIG1-MØ und INSIG2-MØ injiziert und anschließend mit Sonden für das jeweilige Markergen (Xngnr-1, Notch, Delta1 bzw. Delta2) in WMISH-Untersuchungen inkubiert wurden.



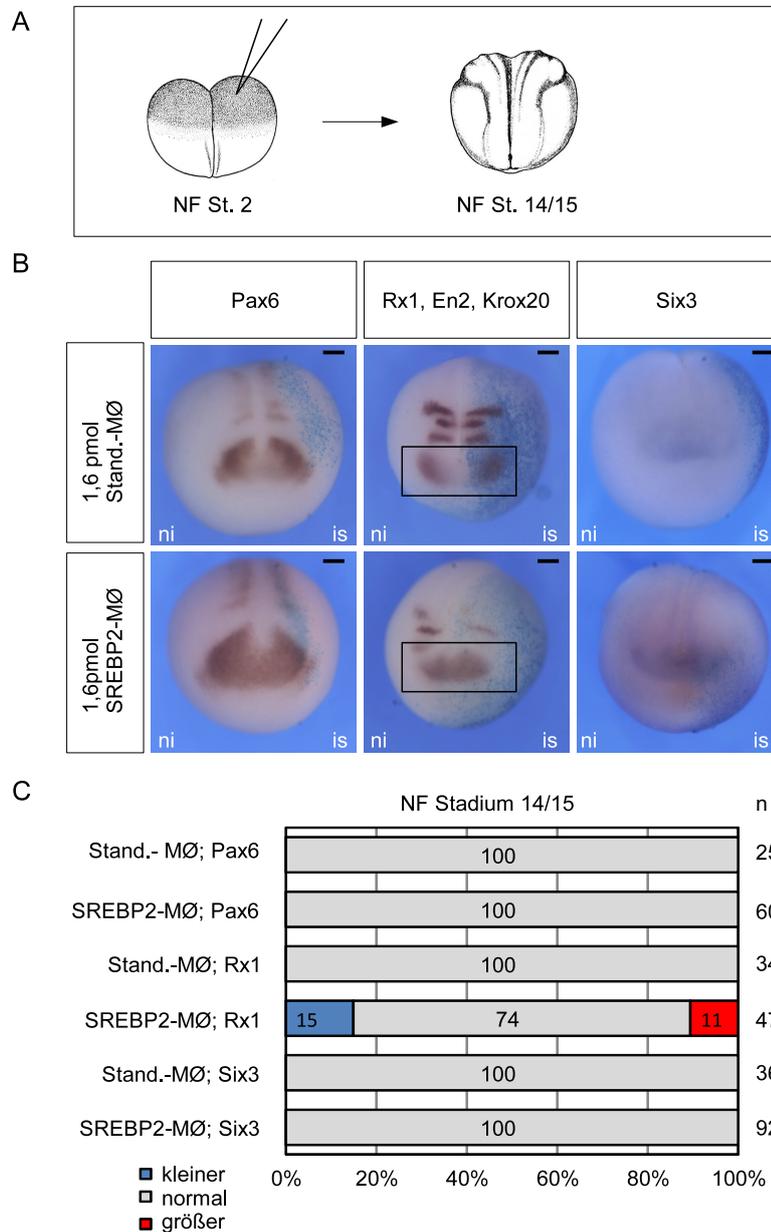
**Abbildung 3.18: WMISH-Analyse der Expression von En2 und Krox20 nach Funktionsverlust von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in *Xenopus*-Embryonen.** (A) Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufes. Der jeweilige Morpholino (1,6 pmol SREBP2-MØ sowie 2,5 pmol INSIG1-MØ und INSIG2-MØ) wurde zusammen mit  $\beta$ -Gal-mRNA in eine Blastomere des Zwei-Zell-Stadiums injiziert und die Embryonen wurden bis NF St. 14/15 bzw. 30 kultiviert und WMISH-Untersuchungen unterzogen. (B) Als Kontrolle diente die Injektion von 2,6 pmol Standard-Morpholino in eine Blastomere des Zwei-Zell-Stadiums. Die gestrichelte Linie zeigt die Mittellinie des Embryos. Rote Pfeilspitzen = En2 Expression, gelbe Pfeilspitzen = Rhombomer 3 Expression, weiße Pfeilspitzen = Rhombomer 5 Expression, ni = nicht injizierte Kontrollseite, is = injizierte Seite (erkennbar an blauer  $\beta$ -Gal Färbung), weiße Pfeile = Änderung der Expression. Bar = 250  $\mu$ m. (C) Prozentuale Verteilung des Effekts des SREBP2, INSIG1 und INSIG2 Funktionsverlustes auf die En2 und Krox20 Expression in *Xenopus laevis* Embryonen des NF St. 14/15 und NF St. 33/34. n = gesamte Anzahl an Embryonen.

### 3.4.6 Funktion von SREBP2 in der Augenentwicklung

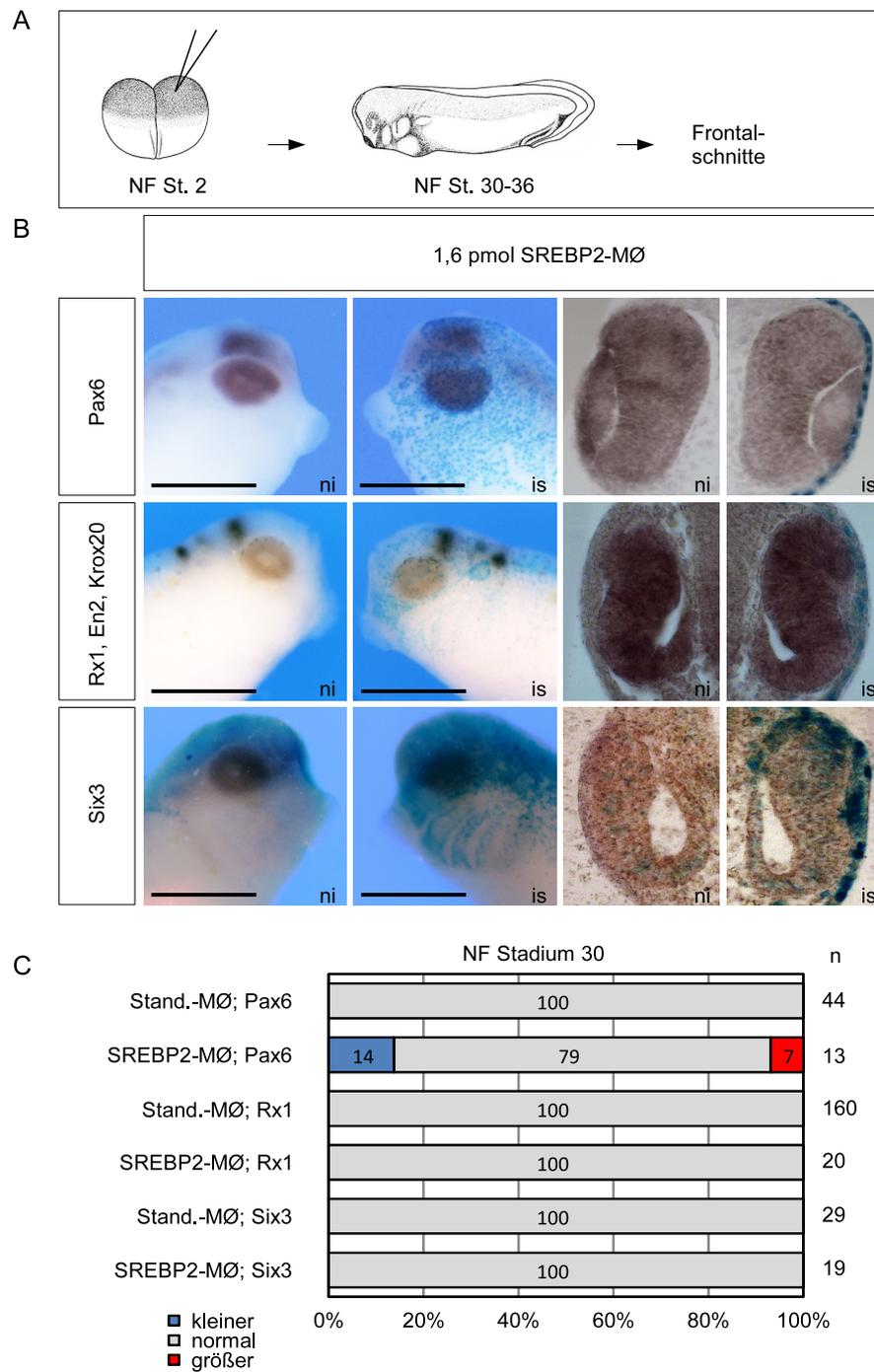
In Frontalschnitten von NF St. 30–35 Embryonen aus den WMISH-Analysen (Abbildung 3.7) wurden SREBP2 Transkripte sowohl im Gehirn als auch im Auge nachgewiesen (Abbildung 3.7, C1 und C2). In den SREBP2-Funktionsverluststudien sollte geklärt werden, ob SREBP2 in die Augenentwicklung involviert ist. Dazu wurden die Effekte der Unterdrückung von SREBP2 auf die Expression von Rx1, Pax6 und Six3 hin untersucht. Diese Markergene sind sog. Augenfeld-Transkriptionsfaktoren (EFTF's), die maßgeblich an der Augenentwicklung beteiligt sind. Sie werden im frühen Neurulastadium (NF St. 14/15)

im anterioren Teil der Neuralplatte exprimiert und sind an der Spezifizierung der Augenanlagen beteiligt. Embryonen wurden in eine Zelle des Zwei-Zell-Stadiums mit SREPB2-MØ Morpholino injiziert, bis NF St. 14/15 kultiviert und anschließend mittels WMISH auf die Expression von Rx1, Pax6 und Six3 hin untersucht (Abbildung 3.19, A).

Dabei zeigte sich, dass die Induktion der Augenentwicklung, repräsentiert durch die drei Augenmarker, unbeeinflusst blieb (Abbildung 3.19).



**Abbildung 3.19: WMISH-Analyse der Expression von Pax6, Rx1 sowie Six3 in NF St. 14/15 Embryonen.** Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufes; Der jeweilige Morpholino wurde zusammen mit  $\beta$ -Gal-mRNA (Blaufärbung, injizierte Seite) in eine Zelle des Zwei-Zell-Stadiums injiziert und die Embryonen wurden bis NF St. 14/15 kultiviert und WMISH-Untersuchungen auf die RNA Expression der Markergene Pax6, Rx1 sowie Six3 hin untersucht. (B) Als Kontrolle diente die Injektion von 1,6 pmol Standard-Morpholino. Der Kasten zeigt die Expressionsdomäne von Rx1. ni = nicht injizierte Kontrollseite, is = injizierte Seite. Bar = 250  $\mu$ m. (C) Prozentuale Verteilung des Effekts des SREBP2 Funktionsverlustes auf die Pax6, Rx1 und Six3 Expression bei *Xenopus laevis*. Verglichen wurde die Augengröße (kleiner, normal, größer). n = gesamte Anzahl an untersuchten Embryonen.



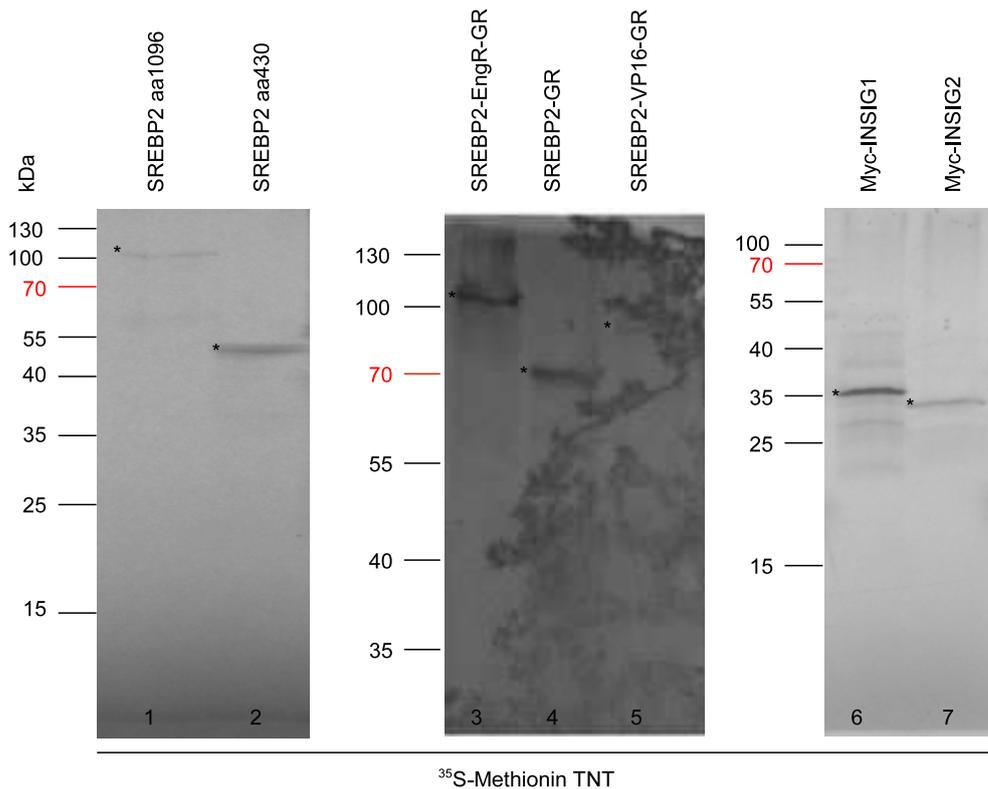
**Abbildung 3.20: WMISH-Analyse der Expression von Pax6, Rx1 sowie Six3 in NF St. 30/36 Embryonen.** Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufes; Der jeweilige Morpholino wurde zusammen mit  $\beta$ -Gal-mRNA (Blaufärbung, injizierte Seite) in eine Zelle des Zwei-Zell-Stadiums injiziert und die Embryonen bis NF St. 30 kultiviert und mit WMISH-Untersuchungen die RNA Expression der Markergene Pax6, Rx1 sowie Six3 untersucht. (B) Der Kasten zeigt die Expressionsdomäne von Rx1. ni = nicht injizierte Kontrollseite, is = injizierte Seite. Bar = 250  $\mu$ m. (C) Prozentuale Verteilung des Effekts des SREBP2 Funktionsverlustes auf die Pax6, Rx1 und Six3 Expression bei *Xenopus laevis* Embryonen. Verglichen wurde die Größe der Augenanlage (Augenbecher: kleiner, normal, größer). n = gesamte Anzahl an untersuchten Embryonen.

### 3.5 Überexpression von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in *Xenopus*

#### 3.5.1 Phänotypen durch Überexpression von SREBP2, INSIG1 und INSIG2

Wie die Funktionsverluststudien zeigten, übernehmen SREBP2, INSIG1 und INSIG2 eine wichtige Rolle während der Neurogenese. Außerdem ist SREBP2 in die Gehirnentwicklung involviert. Funktionsgewinn-

studien (Abschnitt 2.16.3) ermöglichen durch Mikroinjektion von synthetischer RNA in eine Blastomere des Zwei-Zell-Stadiums die Überexpression unterschiedlicher Proteine gezielt in einer Embryohälfte. Um diese Untersuchungen durchführen zu können, wurde zunächst der offene Leserahmen von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in unterschiedliche Expressionsvektoren kloniert (Auflistung siehe Abschnitt A.2). Dabei handelt es sich bei dem SREBP2aa1096 Konstrukt um den gesamten offenen Leserahmen von SREBP2 im pCMV-Sport6 Vektor, sowie bei SREBP2aa430 um den N-terminalen Anteil von SREBP2 im pCS2+ Vektor. Bei INSIG1 und INSIG2 wurde jeweils der gesamte offene Leserahmen in den pCS2+ Vektor kloniert. Im daran anschließenden gekoppelten Transkriptions- und Translationsassay, wurden die generierten Konstrukte zum Nachweis einer erfolgreichen Translation getestet. Dabei zeigten die Proteine ihr erwartetes Molekulargewicht (Abbildung 3.21).

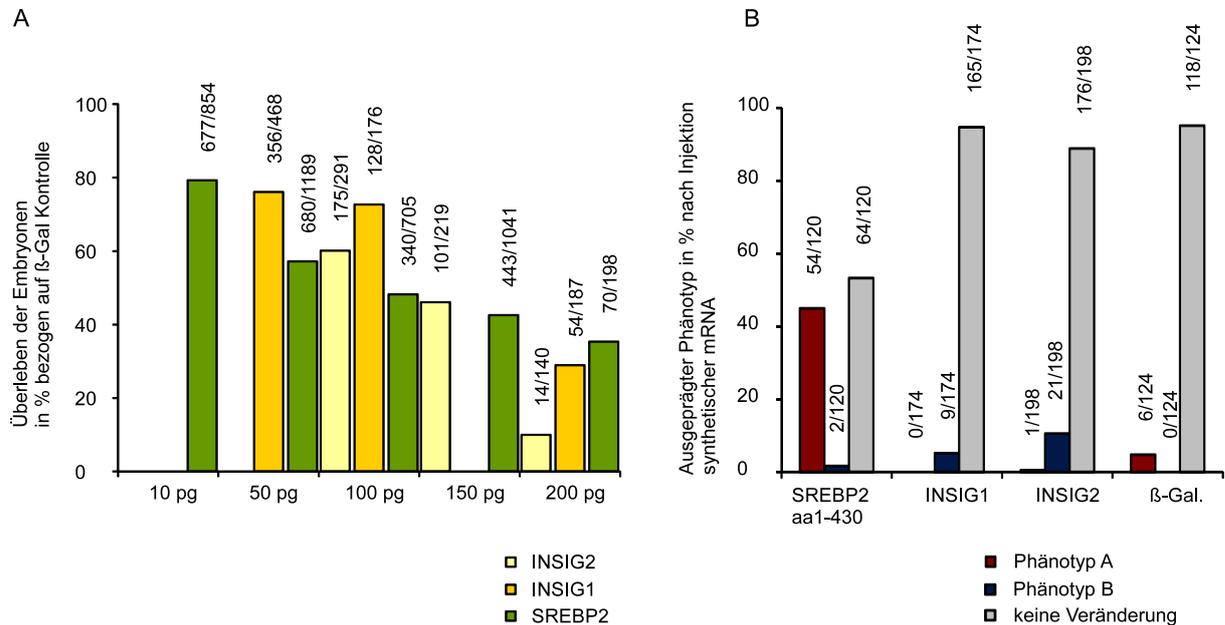


**Abbildung 3.21: Spezifitätstest der für die Überexpressionsstudien verwendeten Konstrukte im gekoppelten Transkriptions- und Translationsassay.** *in vitro* Transkription und Translation (TnT®-Coupled Reticulocyte Lysate system) von SREBP2aa1096 (1, ~120 kDa), SREBP2aa430 (2, ~47 kDa), SREBP2-EngR-GR (3, ~113 kDa), SREBP2-GR (4, ~77 kDa), SREBP2-VP16-GR (5, ~86 kDa), Myc-INSIG1 (6, ~36 kDa) und Myc-INSIG2 (7, ~33 kDa). Die Translationsansätze wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Produkte autoradiographisch durch radioaktiv markiertes Methionin nachgewiesen. Aufgrund der geringen Größe und somit auch geringen Anzahl an nachweisbaren Methioninen wurde N-terminal an INSIG1 (4 Methionine) und INSIG2 (6 Methionine) ein Myc-tag fusioniert, der zusätzlich 6 Methionine mitbringt und somit die Nachweisgrenze erhöht.

Zur Beurteilung der entwicklungsbiologischen Relevanz dieser Proteine während der *Xenopus* Entwicklung, wurden die Expressionsplasmide linearisiert, um als Template für die Synthese von cap-mRNA zu fungieren. Die RNA für SREBP2 bzw. INSIG1 und INSIG2 wurden jeweils zusammen mit  $\beta$ -Gal-mRNA als Zelllinienmarker in eine Blastomere des Zwei-Zell-Stadiums in *Xenopus laevis* Embryonen injiziert. Die injizierten Embryonen kultivierten bis NF St. 36 und der entstandene Phänotyp wurde dokumentiert und statistisch ausgewertet.

Die Überexpression von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 hat fatale Folgen für die *Xenopus* Embryonen, was sich durch eine hohe Mortalitätsrate zeigte (Abbildung 3.22, A). Besonders auffallend war die Wirkung der Überexpression bei mit SREBP2-RNA injizierten Embryonen sichtbar (Abbildung 3.22, A). Die Injektion von 10 pg SREBP2-RNA konnte die Überlebensrate auf rund 80 % steigern (Abbildung 3.22, A), aber die Embryonen zeigten dann keinen auffallenden Phänotyp mehr (Abbildung 3.22, B) bzw. den gleichen Phänotyp, der gekrümmten Körperachse, der auch in den Funktionsverluststudien entstanden

ist (Abschnitt 3.4.2). Da die Embryonen größtenteils vor dem NF St. 15 starben, waren weiterführende Experimente unmöglich. Um vergleichbare Bedingungen (wie in den Funktionsverluststudien) zu schaffen, sollten Embryonen des NF St. 15 bzw. 30–36 gesammelt werden. Zur Umgehung der Problematik der hohen Mortalitätsrate wurden induzierbare SREBP2-Konstrukte generiert, die eine gezielte zeitliche Proteinexpression erlauben (Abschnitt 3.5.2).



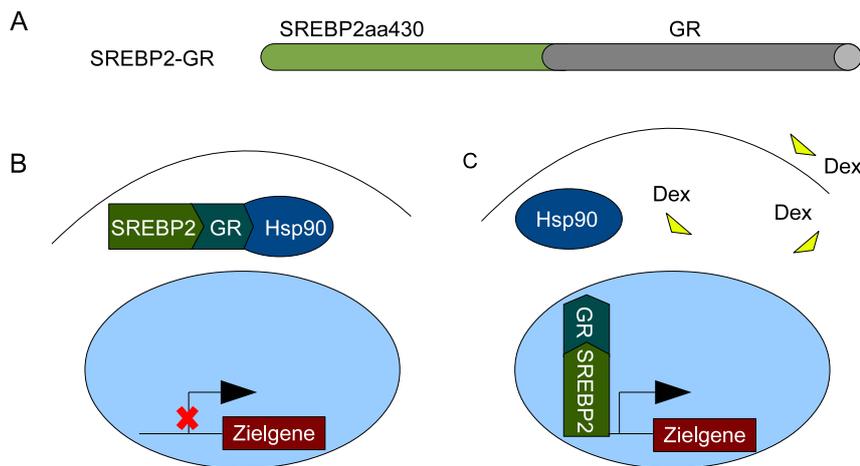
**Abbildung 3.22: Statistische Auswertung der Überlebensrate sowie Auswirkungen auf den Phänotyp.** (A) Überleben der Embryonen in % nach Injektion von 10, 50, 100, 150 und 200 pg cap-mRNA von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in eine Blastomere des Zwei-Zellstadiums. Die Überlebensrate der Embryonen wurde nach Injektion bis NF St. 36 verfolgt und dokumentiert. Auf der Balkenspitze sind jeweils die Anzahl der überlebenden Embryonen im Vergleich zu den gesamten beobachteten Embryonen dargestellt. Die Ordinate zeigt das Überleben der Embryonen in % und die Abszisse die unterschiedlichen mRNA-Mengen in pg. Anzahl unabhängiger Experimente > 3. (B) Statistische Auswertung der durch den Funktionsgewinn entstandenen Phänotypen; Phänotyp A zeigt eine Krümmung der Körperachse zur injizierten Seite, die Biegung der Finne sowie einen Verlust anterioren Gewebes im Kopfbereich. Phänotyp B und zeichnet sich durch perikardiale Ödeme an der ventralen Seite der Embryonen aus. Auf der Balkenspitze sind jeweils die Anzahl der Embryonen mit dem entsprechenden Phänotyp im Vergleich zu den gesamten beobachteten Embryonen dargestellt. Die Ordinate zeigt ausgeprägten Phänotyp in % und die Abszisse die unterschiedlichen Injektionen von synthetischer mRNA. Injektionsmenge: SREBP2 = 50 pg, INSIG1 und INSIG2 = 100 pg. Anzahl unabhängiger Experimente = 2.

### 3.5.2 Überexpression von induzierbaren SREBP2-Varianten in *Xenopus* Embryonen

Zur Senkung der Gastrulationsdefekte und der Mortalitätsrate der SREBP2 überexprimierenden Embryonen wurden induzierbare SREBP2-Konstrukte (Abschnitt 2.11.2) generiert, welche die Regulation der Transkriptionsaktivität von SREBP2 ermöglichen. Dazu wurde in Leserichtung carboxyterminal an SREBP2aa430 die Liganden-bindende Domäne des humanen Glucocorticoidrezeptors (GR) fusioniert (Abbildung 3.23, A). Die Proteine können ohne Zugabe von Dexamethason in das Kulturmedium nicht in den Zellkern translozieren, was eine Induktion zu jedem beliebigen Zeitpunkt der Entwicklung erlaubt (Prinzip nach Kolm & Sive, 1995, Abbildung 3.23, B). Das somit erhaltene GR-Fusionsprotein ist ohne Hormon inaktiv, da es durch Bindung des Glucocorticoidrezeptor-Anteils an Cytoskelett-assoziierte Hitzeschockproteine (Hsp90) im Cytoplasma zurückgehalten wird. Die Zugabe des Glucocorticoidanalogs Dexamethason führt zu einer Konformationsänderung in der Liganden-bindenden Domäne, was zu einer Freisetzung des GR-Fusionsproteins führt. Somit kann das Protein in den Zellkern translozieren und dort dessen Bestimmung folgend, die Translation seiner Zielgene anschalten (Mattioni *et al.*, 1994).

Die generierten Konstrukte SREBP2-GR, SREBP2-VP16-GR und SREBP2-EngR-GR wurden zum Nachweis einer erfolgreichen Translation im gekoppelten Transkriptions- und Translationsassay getestet

und zeigten dort ihr erwartetes Molekulargewicht (Abbildung 3.21), sodass sie *in vivo* injiziert werden konnten.



**Abbildung 3.23: Aufbau und Wirkungsmechanismus des induzierbaren Systems SREBP2-GR.** (A) SREBP2-GR entsteht durch *in frame* Fusion der Glucocorticoidlipidbindungsdomäne (GR-LBD, kurz GR) an SREBP2aa430. (B) Bei Abwesenheit von Dexamethason ist SREBP2-GR an Hsp90 im Cytoplasma gebunden. (C) Durch Applikation von Dexamethason löst sich Hsp90 und das SREBP2-GR Protein ist in der Lage, in den Zellkern transportiert zu werden, und kann dort nun seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausüben.

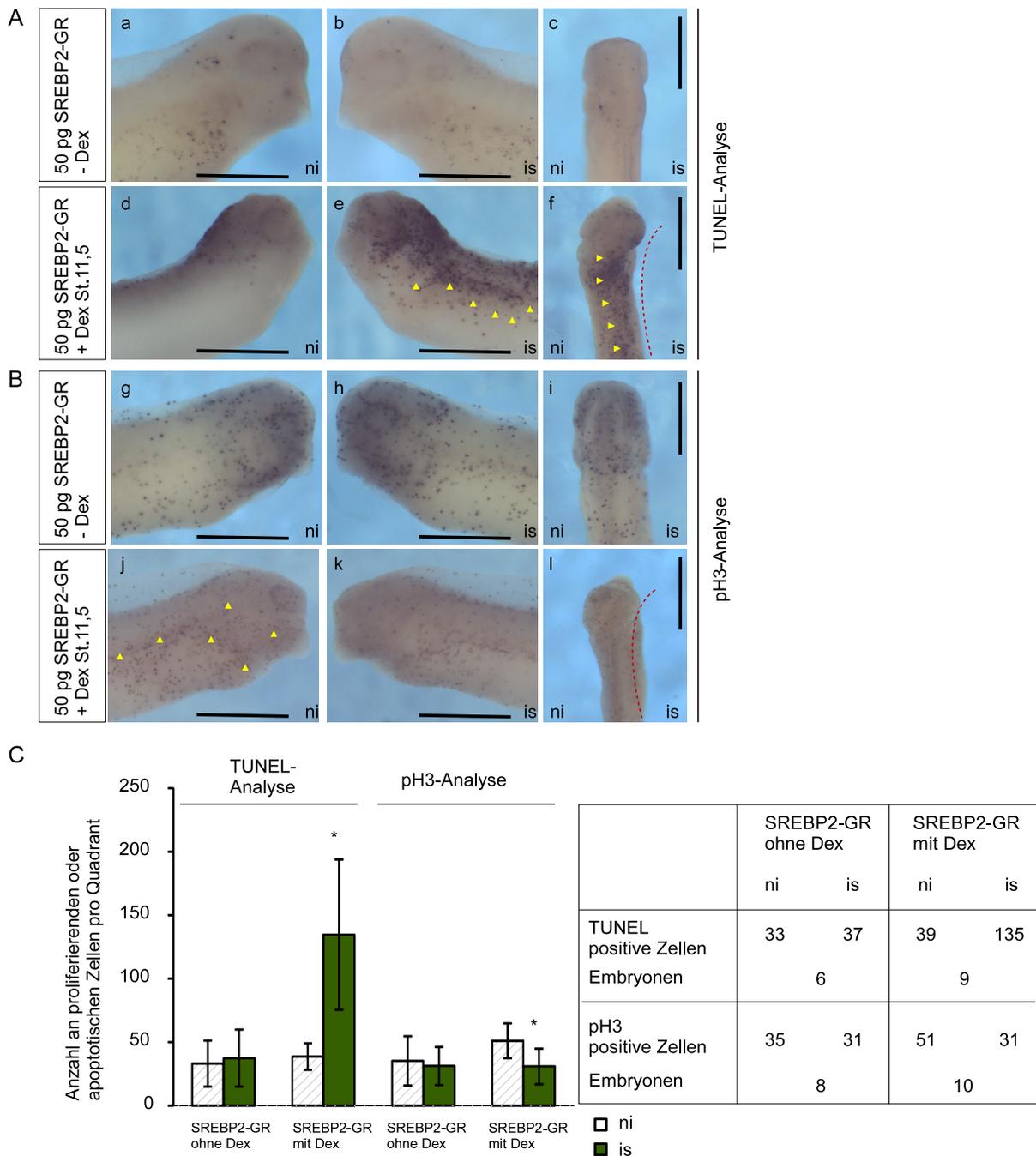
Durch Injektion synthetischer SREBP2-GR RNA in eine Blastomere des Zwei-Zell-Stadiums konnte SREBP2 *in vivo* synthetisiert werden und lag somit bereits in der frühen Entwicklung in inaktiver Form vor. Um eine Übersättigung des Systems zu vermeiden, wurden nicht mehr als 150 pg synthetisch hergestellter SREBP2-GR RNA injiziert. Als Zelllinienmarker wurde  $\beta$ -Gal-mRNA co-injiziert. Durch Zugabe von Dexamethason in das Medium am Ende der Gastrulation, zum NF St. 11,5 wurde das System induziert. Die Embryonen kultivierten bis zum NF St. 15 bzw. 30 kultiviert und wurden anschließend WMISH-Untersuchungen (Abschnitt 2.12) unterzogen.

### 3.5.3 Einfluss von SREBP2 auf die Zellproliferation und Zellapoptose

Auch die mit SREBP2 überexprimierten Embryonen zeigten, ebenso wie die SREBP2-Morpholino injizierten Embryonen, eine gekrümmte Körperachse. Mit dem Proliferations- und Apoptoseassay, sollte geklärt werden, ob die gekrümmte Körperachse durch verstärkte Apoptosevorgänge oder durch eine verminderte Menge proliferierender Zellen einhergeht. Dafür wurden die Embryonen im Zwei-Zell-Stadium mit SREBP2-GR-mRNA injiziert, zum Zeitpunkt NF Stadium 11,5 induziert bis zum NF Stadium 30–32 kultiviert und anschließend über den Zellproliferations- und Zellapoptoseassay ausgewertet. Die Auswertung ergab bei den SREBP2-GR-mRNA injizierten Embryonen eine hohe Anzahl positiver apoptotischer Zellen im Bereich des Kopfes und des Neuralrohres auf der injizierten Seite (135 Zellen/Quadrant, Abbildung 3.24, Af–e, \*  $p < 0,05$ ) im Vergleich zur nicht-injizierten Kontrollseite (39 Zellen/Quadrant, Abbildung 3.24, Ad) und den nicht-induzierten Embryonen (37 Zellen/Quadrant auf der injizierten Seite zu 33 Zellen/Quadrant auf der nicht injizierten Seite, Abbildung 3.24, Aa–b).

Hingegen wurden bei der Proliferationsanalyse weniger positiv proliferierende Zellen bei den Embryonen mit induziertem SREBP2-GR auf der injizierten Seite (31 Zellen/Quadrant, Abbildung 3.24, Bj–k, \*  $p < 0,05$ ) im Vergleich zur nicht-injizierten Seite (51 Zellen/Quadrant, Abbildung 3.24, Bj) und den injizierten, aber nicht induzierten Embryonen (31 Zellen/Quadrant auf der injizierten Seite und 35 Zellen/Quadrant auf der nicht injizierten Seite) festgestellt (Abbildung 3.24, Bg–i).

Die Untersuchungen zeigten, dass die Überexpression von SREBP2 eine gesteigerte Rate apoptotischer Zellen bewirkt, die möglicherweise für die gekrümmte Körperachse verantwortlich ist.



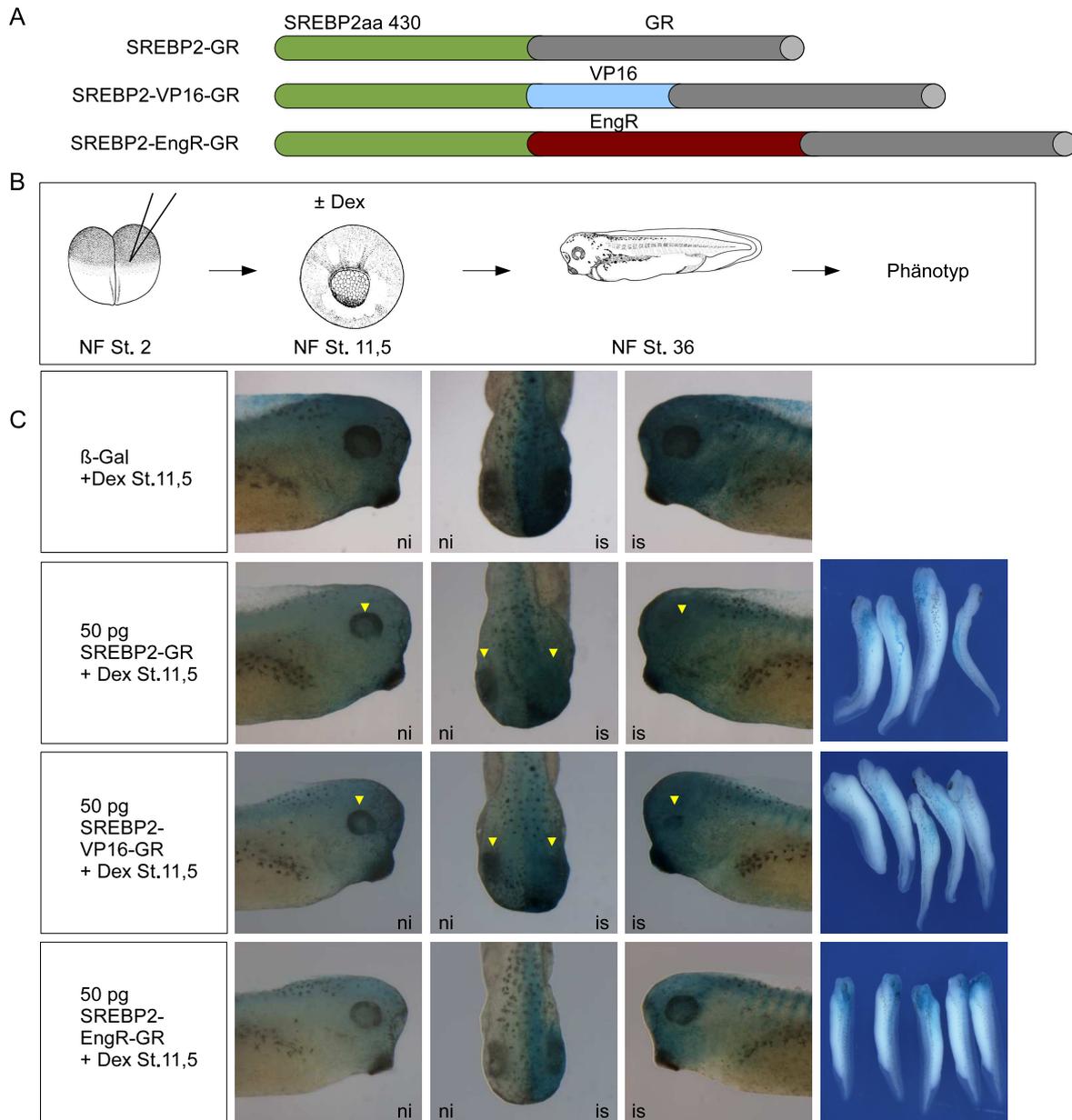
**Abbildung 3.24:** Analyse der Apoptose- und Proliferationsrate in SREBP2 überexprimierten Embryonen. 50 pg SREBP2-GR wurde in eine Zelle des Zwei-Zell-Stadiums injiziert, ein Teil der Embryonen im NF St. 11,5 induziert und bis zum NF St. 30–32 kultiviert. Anschließend erfolgten mit den Embryonen TUNEL-(A) bzw. Proliferationsanalysen (B). Als Kontrolle diente die Injektion von 50 pg synthetischer SREBP2-GR RNA ohne die Induktion mit Dexamethason (ohne Dex). Gezeigt ist die laterale Ansicht des Kopfes und bei c, f, i, l die dorsale Ansicht des Kopfes. Die rote gestrichelte Linie dokumentiert die Krümmung des Embryos. ni = nicht injizierte Kontrollseite, is = injizierte Seite. Die Zählung von proliferierenden bzw. apoptotischen Zellen erfolgte ausschließlich im Bereich des roten Rahmens. Bar = 500  $\mu$ m. (C) Statistische Auswertung der apoptotischen bzw. proliferierenden Zellen pro ausgezähltem Quadrant (roter Rahmen) mittels T-Test. Die schraffierten Balken dokumentieren die nicht injizierte Kontrollseite, ohne Schraffur die injizierte Seite. \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur nicht injizierten Kontrollseite. In der Tabelle sind die durchschnittlichen positiven Zellen pro Quadrant (roter Rahmen) und die Anzahl an untersuchten Embryonen angegeben.

### 3.6 Untersuchungen zur Wirkung von *Xenopus* SREBP2 als Transkriptionsaktivator oder Transkriptionsrepressor

Es ist nicht bekannt, ob SREBP2 in *Xenopus* als Transkriptionsfaktor wirkt. In Maus und Mensch ist beschrieben, dass SREBP2 prozessiert wird und der daraufhin entstehende N-terminale Teil im Zellkern

als Transkriptionsaktivator die Genexpression seiner Zielgene anschaltet. Dies sollte auch für das *Xenopus*-System untersucht werden.

Zur Klärung dieser Frage wurden drei Hormon induzierbare Fusionsproteine generiert (Abschnitt 2.11.2, grafische Darstellung: Abbildung 3.25). Zeigen SREBP2-GR injizierte Embryonen einen ähnlichen Phänotyp zu SREBP2-VP16-GR injizierten Embryonen, wirkt SREBP2 wahrscheinlich als Transkriptionsaktivator. Verhalten sich hingegen SREBP2-GR injizierte Embryonen ähnlich zu SREBP2-EngR-GR injizierten Embryonen, dann wirkt SREBP2 als Transkriptionsrepressor.



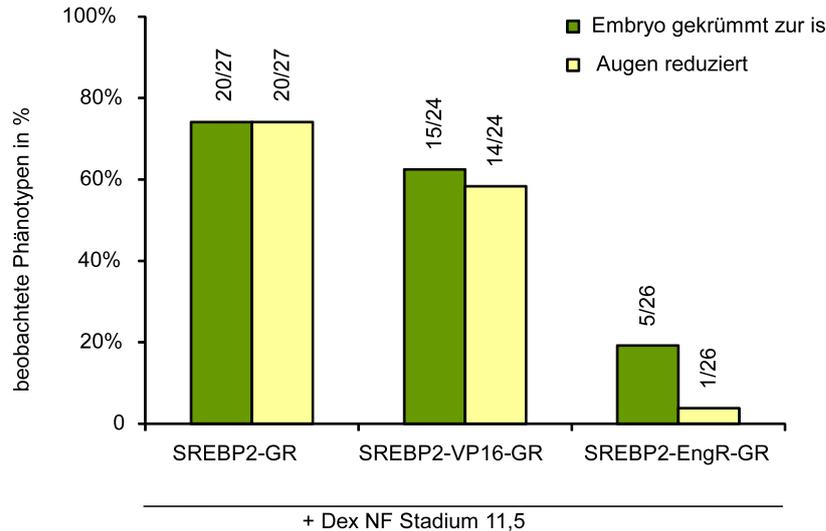
**Abbildung 3.25: SREBP2 wirkt als Transkriptionsaktivator.** (A) Schematische Darstellung der induzierbaren SREBP2-Varianten. (B) Experimenteller Ablauf zum Versuch. Injektion des jeweiligen induzierbaren Konstrukts in eine Blastomere des Zwei-Zell-Stadiums zusammen mit  $\beta$ -Gal-mRNA als Zelllinienmarker. Im NF St. 11,5  $\pm$  Zugabe von Dexamethason in das Medium und Kultivierung der Embryonen bis NF St. 36. Anschließend mikroskopische Auswertung des Phänotyps. (C)  $\beta$ -Gal-mRNA injizierte Embryonen dienten als Kontrolle. Die gestrichelte Linie zeigt die Krümmung der Finne, gelbe Pfeilspitzen zeigen reduzierte Augenstrukturen. Jeweils 50 pg des jeweiligen Konstrukts wurden zusammen mit  $\beta$ -Gal-mRNA wie unter (A) beschrieben injiziert. Anzahl unabhängiger Experimente = 2. is = injizierte Seite ( $\beta$ -Gal, Blaufärbung), ni = nicht injizierte Kontrollseite.

Für diese Untersuchungen wurde die injizierte synthetische RNA im NF St. 11,5 durch Zugabe von Dexamethason in das Medium induziert und die Embryonen bis NF St. 36 kultiviert. Anschließend

wurde der Phänotyp von SREBP2aa430-GR mit SREBP2aa430-EngR-GR bzw. SREBP2aa430-VP16-GR verglichen (Abbildung 3.25, Abbildung 3.26).

Bei der Gegenüberstellung von SREBP2-VP16-GR injizierten Embryonen mit den SREBP2-GR Kontrollembryonen zeigt sich ein vergleichbarer Phänotyp. Die SREBP2-VP16-GR und SREBP2-GR injizierten Embryonen weisen eine gekrümmte Körperachse zur injizierten Seite und einen teilweisen Verlust von Augenstrukturen auf (Abbildung 3.25, Abbildung 3.26). Hingegen zeigten SREBP2-EngR-GR injizierte Embryonen diesen Phänotypen nicht.

Die Untersuchungen deuten auf SREBP2 als Transkriptionsaktivator hin.



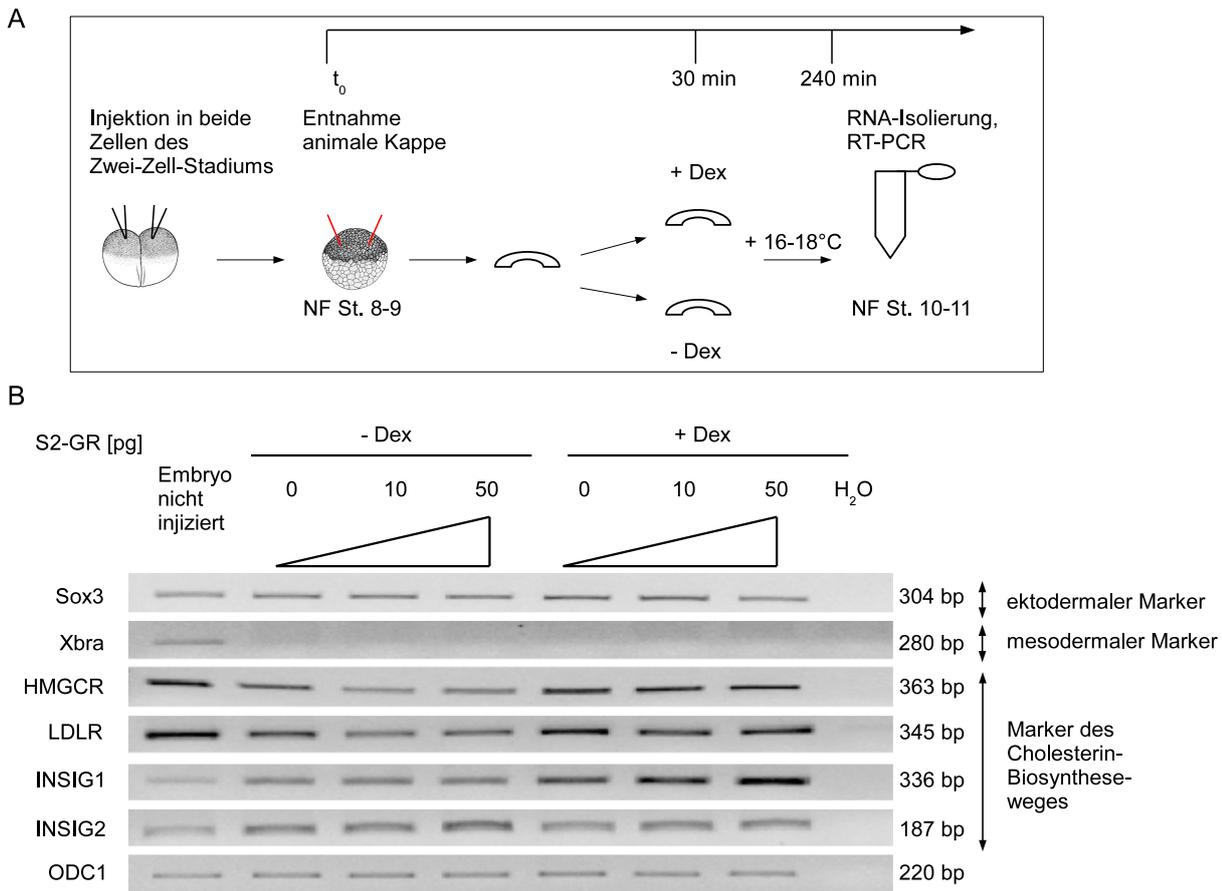
**Abbildung 3.26: SREBP2 wirkt als Transkriptionsaktivator, statistische Auswertung des Phänotyps.** Statistische Auswertung des durch die Injektion von induzierbaren SREBP2-Varianten entstandenen Phänotyps; Dokumentation im NF St. 36. Es wurden 50 pg des jeweiligen Konstrukts zusammen mit  $\beta$ -Gal-mRNA, wie unter Abbildung 3.25 Teil A beschrieben, injiziert.

### 3.7 Suche nach putativen SREBP2-Zielgenen

Gegenstand der Untersuchung, welche Proteine durch SREBP2 induziert werden, waren ektodermale Explantate des animalen Poles von *Xenopus* Blastulae – sogenannte *animale Kappen* (Abschnitt 2.11.3). Animale Kappen sind pluripotente Zellen. Diese Vorläuferzellen unterliegen während und nach der Gastrulation endogenen Induktionsprozessen. Die Kappen würden sich ohne Einwirkung von Induktionsfaktoren nur zu einem Cilien-besetzten Epithel entwickeln. Unter bestimmten Kulturbedingungen sind sie allerdings in der Lage, in verschiedene Gewebetypen zu differenzieren.

SREBP2-GR RNA wurde in unterschiedlichen Mengen (10 pg, 50 pg, 150 pg) zusammen mit  $\beta$ -Gal-mRNA (aufgefüllt zu einer Gesamtmenge von 150 pg) in beide Blastomere des Zwei-Zell-Stadiums injiziert. Die Induktionsvorgänge konnten anschließend durch die Analyse der Expression von potenziellen Zielgenen mittels RT-PCR (Abschnitt 2.16.2) sichtbar gemacht werden (Abbildung 3.27, A).

Das Haushaltsgen ODC1 wurde als Kontrolle in der RT-PCR (eingestellt als gleichbleibende Menge) mitgeführt, d. h. unterscheidet sich die Stärke der ODC-Bande nach der RT-PCR nicht signifikant, so können die getesteten Markergene (Sox3, Xbra, HMGCR, LDLR, INSIG1, INSIG2) hinsichtlich ihrer Expressionsstärke verglichen werden. Die Ergebnisse zeigten keine Änderung im mRNA-Profil bei dem ektodermalen Marker Sox3. Xbra als mesodermaler Marker zeigt, wie zu erwarten, nur in ganzen Embryonen Expression. Von den ausgewählten Genen der Cholesterinbiosynthese konnte bei HMGCR, LDLR und INSIG1, bei steigender SREBP2-GR-Menge, eine leichte Hochregulierung im mRNA-Profil der induzierten Kappen (mit Dex) beobachtet werden (Abbildung 3.27, B). INSIG2 zeigt hingegen keine Änderung seines mRNA-Expressionsprofils.



**Abbildung 3.27: Effekte von induzierbaren SREBP2-GR in animalen Kappen.** (A) Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufes; Gesamtinjektion je 150 pg RNA (SREBP2-GR RNA 0 pg, 10 pg, 50 pg jeweils aufgefüllt mit  $\beta$ -Gal-mRNA zu 150 pg) in eine Blastomere des Zwei-Zell-Stadiums injiziert und anschließend kultiviert. Im NF St. 8–9 erfolgte die Entnahme der animalen Kappe und 30 Minuten später wurde die Hälfte der Kappen mit Dexamethason induziert und nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach anschließender RNA-Isolierung erfolgte eine RT-PCR zur Analyse bekannter Gene. (B) Als interner Standard für vergleichbare mRNA-Mengen diente der Nachweis der exprimierten mRNA von Ornithindecaboxylase1 (ODC1), als Kontaminationskontrolle wurde H<sub>2</sub>O statt cDNA in der PCR verwendet. Die Produktgrößen sind neben der jeweiligen Zeile rechts dargestellt: Sox3 304 bp, 26 Zyklen; Xbra 280 bp, 30 Zyklen; HMGCR 363 bp, 28 Zyklen; LDLR 345 bp, 28 Zyklen; INSIG1 336 bp, 28 Zyklen; INSIG2 187 bp, 28 Zyklen; ODC1 220 bp, 26 Zyklen.

### 3.8 Lokalisation von *Xenopus* SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in HeLa-Zellen

Zelltransfektionsexperimente (Abschnitt 2.17) sind eine gute Möglichkeit, um Prozesse auf zellulärer Ebene zu studieren. So sollte unter anderem geklärt werden, in welchen Kompartimenten *Xenopus*-SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in der Zelle lokalisiert sind und ob diese interagieren.

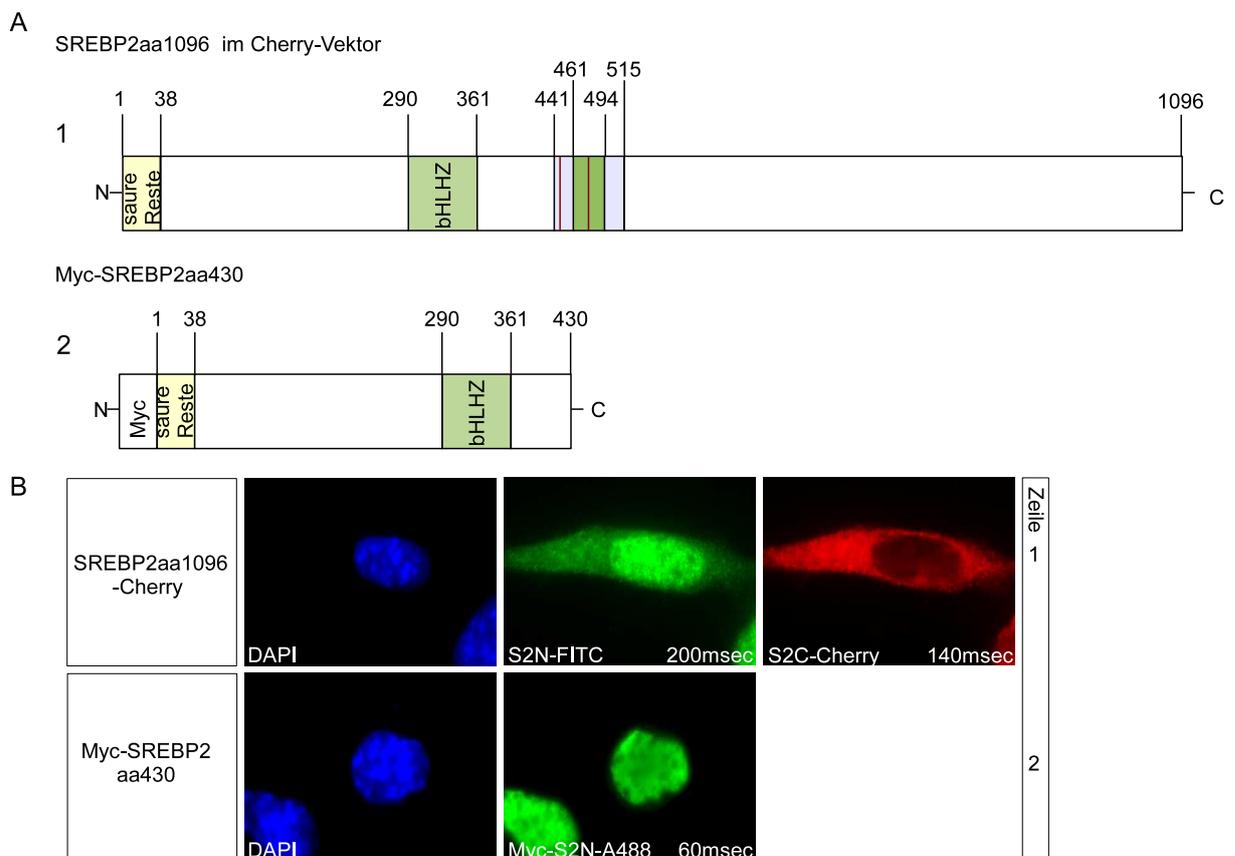
Zur unterschiedlichen Darstellung der subzellulären Lokalisation von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 wurden die Konstrukte in HeLa-Zellen (Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) und B35-Zellen (Neuroblastomzellen) transfiziert und die Lokalisation der Proteine durch Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die Ergebnisse der B35-Zellen entsprechen den Ergebnissen aus der HeLa-Zellkultur, weshalb in den folgenden Kapiteln nur die Ergebnisse aus den HeLa-Zell Experimenten exemplarisch dargestellt sind. Zur Unterscheidung der verschiedenen Proteine in Co-Transfektionen wurden spezifische Antikörper, Antikörper gegen Tags sowie die Eigenfluoreszenz von Fusionsproteinen genutzt. Der Zellkern wurde durch DAPI-Färbung sichtbar gemacht.

### 3.8.1 Zelluläre Lokalisation von *Xenopus* SREBP2

#### 3.8.1.1 *Xenopus* SREBP2 kann in HeLa-Zellen prozessiert werden

Vom Mensch ist bekannt, dass nach der Prozessierung von SREBP, der N-terminale Teil in den Zellkern transloziert, um dort als Transkriptionsfaktor die Aktivierung von Genen für die Cholesterinbiosynthese zu bewirken. Der C-Terminus wird hingegen nicht in den Kern transportiert. Aufgrund der starken Konservierung zwischen humanem und *Xenopus* SREBP2 war zwar anzunehmen, dass sich *Xenopus*-SREBP2 in seiner Lokalisation genauso wie das humane SREBP2 verhält, trotzdem sollte getestet werden, ob die *Xenopus*-SREBP2 Konstrukte in HeLa-Zellen prozessiert werden und wo sie lokalisiert sind.

Zur Klärung dieser Frage wurde (a) der gesamte offene Leserahmen von *Xenopus* SREBP2aa1096 (SREBP2) in den Cherry-Vektor und (b) der N-terminale Teil SREBP2aa430 in den Expressionsvektor pCS2+ kloniert. In der Immunfluoreszenz konnte für beide Konstrukte die Expression nachgewiesen werden (Abbildung 3.28).



**Abbildung 3.28: Lokalisation von *Xenopus*-SREBP2 in transfizierten HeLa-Zellen.** (A) Dargestellt ist (1) SREBP2 im Cherry-Vektor sowie (2) der N-terminale Teil von SREBP2 im Expressionsvektor pCS2+. (B, Zeile 1) Nachweis von SREBP2aa1096 in HeLa-Zellen. S2N-FITC = der spezifische SREBP2-AK gekoppelt mit FITC zum Nachweis des N-Terminus (S2N = SREBP2aa430); S2C-Cherry = Cherry-Eigenfluoreszenz zum Nachweis des SREBP2 C-Terminus. (B, Zeile 2) Nachweis von SREBP2aa430: Myc-S2N-A488 = Myc-AK gekoppelt mit Alexa488 zum Nachweis des SREBP2 N-Terminus. DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet. Die Expositionszeiten sind in jedem Bild jeweils rechts unten aufgeführt.

SREBP2 (SREBP2aa1096) war in der gesamten Zelle lokalisiert (Abbildung 3.28, B1). Der Nachweis des N-terminalen Teils von SREBP2 erfolgte mit einem spezifischen anti-SREBP2-Antikörper mittels des Fluorophors FITC und konnte überwiegend im Zellkern gefunden werden. Hingegen war der C-terminale Teil von SREBP2, welcher über Cherry nachgewiesen wurde, vom Kern ausgeschlossen.

Die kurze N-terminale Variante von SREBP2 (SREBP2aa430) entspricht dem bereits prozessierten, transkriptionell aktiven Anteil von SREBP2 und ist ausschließlich im Kern unter Ausschluss der Nukleoli nachweisbar (Abbildung 3.28, B2). Der Nachweis erfolgte über den Myc-tag mittels Alexa 488.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass beide betrachteten *Xenopus*-SREBPs (SREBP2aa1096 sowie SREBP2aa430) in ihrer Lokalisation sich wie beim Mensch verhielten.

### 3.8.1.2 Der N-terminale Teil von SREBP2 wird in den Zellkern transportiert

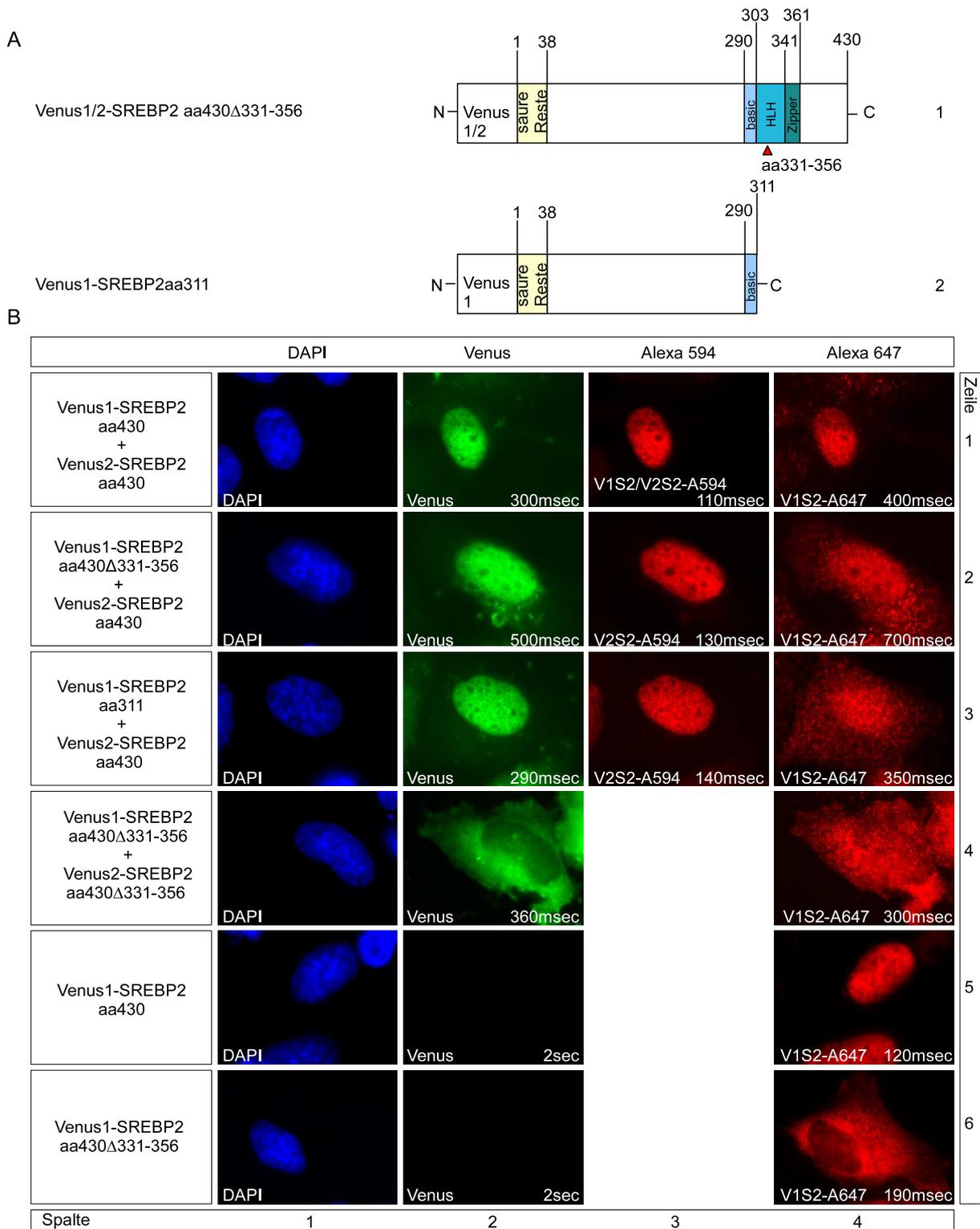
SREBP2 besitzt kein Kernlokalisierungssignal (NLS), sondern der Kerntransport des N-terminalen transkriptionsaktiven Teils von SREBP2 wird durch ein Importin- $\beta$  Signal vermittelt. Der Bereich für die Erkennung von Importin- $\beta$  liegt in der bHLHZ-Region von SREBP2 (Abbildung 3.28, A). Weiterhin ist bekannt, dass der Import eine Dimerisierung des N-Terminus von SREBP2 voraussetzt (Lee *et al.*, 2003). Die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation ist ein gutes Hilfsmittel um Protein-Protein-Interaktionen und deren Lokalisation in Zellen zu untersuchen (Abschnitt 2.18.7). In den erfolgten Untersuchungen wurde sie eingesetzt, um zu klären, ob SREBP2 Proteine miteinander interagieren.

Es zeigte sich, dass bei der Co-Transfektion zweier SREBP2aa430-Varianten beide Proteine im Kern nachweisbar sind und dort ein Venussignal zeigten (Abbildung 3.29, Zeile 1). Nach Deletion der Importin- $\beta$  Domäne (SREBP2aa430 $\Delta$ 331–356) wird SREBP2 nicht mehr in den Zellkern transportiert und war im Cytoplasma lokalisiert (Abbildung 3.29; Zeile 2, Spalte 4). Durch Co-Transfektion eines Wildtyp-SREBP2aa430 konnte das deletierte Kerntransport-defiziente SREBP2 nun auch im Zellkern nachgewiesen werden (Abbildung 3.29; Zeile 2, Spalte 2). Auch ein SREBP2, dem die gesamte Importin- $\beta$  Domäne fehlte (SREBP2aa311) und das somit nicht in der Lage war selbstständig in den Zellkern zu translozieren (Abbildung 3.29; Zeile 3, Spalte 4), wurde mit Hilfe eines intakten SREBP2 in den Zellkern transportiert (Abbildung 3.29; Zeile 3, Spalte 2). Hingegen konnten zwei deletierte SREBP2 (SREBP2aa430 $\Delta$ 331–356) nicht in den Zellkern gelangen. Sie zeigten anhand der Venus-Fluoreszenz, dass sie aber außerhalb des Zellkerns zusammengelagert waren (Abbildung 3.29; Zeile 4, Spalte 2). Die Einzeltransfektion von Venus1-SREBP2aa430 zeigte eine lokale Begrenzung auf den Zellkern (Abbildung 3.29; Zeile 5, Spalte 4). Sie diente als Kontrolle, da Venus1(-SREBP2aa430) alleine transfiziert keine Venus-Fluoreszenz zeigen kann (Abbildung 3.29; Zeile 5, Spalte 2). Venus1-SREBP2aa430 $\Delta$ 331–356, einzeln transfiziert, war ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert (Abbildung 3.29; Zeile 4, Spalte 6). Es zeigte ebenfalls keine Venus-Fluoreszenz (Abbildung 3.29; Zeile 6, Spalte 2).

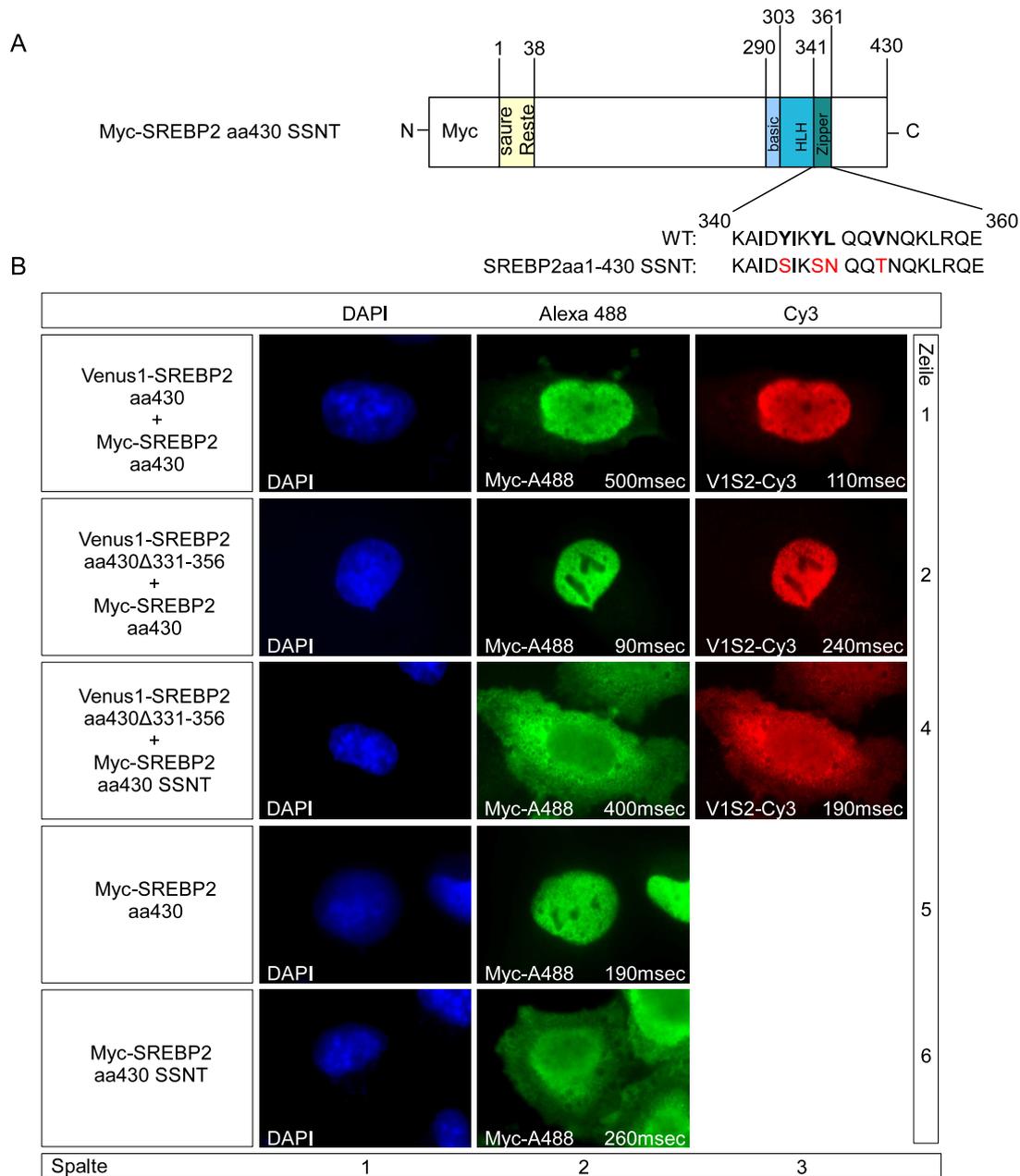
Zur Kontrolle, dass nicht eine zu starke Bindung der Venusteilpeptide untereinander eine Rekonstitution des Venussignals ausgelöst hat, sondern die Interaktion der SREBP2-Anteile (Venus1-SREBP2aa430 mit dem deletierten SREBP2 Venus2-SREBP2aa430 $\Delta$ 331–356), wurde ein ergänzender experimenteller Aufbau gewählt. In diesem Ansatz wurde im Gegensatz zu den BiFC-Experimenten (Abbildung 3.29) in den Co-Transfektionen nur ein SREBP2 mit einem Venus-Teilpeptid versehen (Venus1-SREBP2aa430 bzw. Venus1-SREBP2aa430 $\Delta$ 331–356, Abbildung 3.30, Zeile 1–3; transfiziert mit einem nicht Venus-Teilpeptid enthaltenem SREBP2-Konstrukt: Myc-SREBP2aa430, Myc-SREBP2aa430 SSNT, Abbildung 3.30, Zeile 1–3), welches selbst nicht fluoreszieren kann. Eine gemeinsame Lokalisation der unterschiedlichen SREBP2 Proteine in den Co-Transfektionen wäre somit nicht auf eine zu starke Bindung der Venusteilpeptide zurückzuführen, sondern auf Interaktion der SREBPs.

Bei dem Konstrukt Myc-SREBP2aa430 SSNT wurden die Aminosäuren Y344, Y347, L348 und V351, welche nach Lee *et al.*, 2003 für die Importin- $\beta$  Bindung essenziell sind, gegen die Aminosäuren SSNT im Bereich der bHLHZ-Domäne ausgetauscht. Aus diesem Grund sollte dieses Protein nicht mehr in den Kern transportiert werden. In der Tat war bei dem Protein Myc-SREBP2aa430 SSNT keine Importin- $\beta$  Bindung mehr möglich und keine Kernlokalisierung nachweisbar. Myc-SREBP2aa430 SSNT war vor allem im Cytoplasma lokalisiert (Abbildung 3.30, Zeile 4). Als Kontrollen wurde Myc-SREBP2aa430 (Abbildung 3.30, Zeile 5) bzw. Myc-SREBP2aa430 SSNT (Abbildung 3.30, Zeile 6) in dem Versuchsansatz mitgeführt.

Analog zu den BiFC-Analysen kann auch in diesem Versuch ein intaktes Myc-SREBP2aa430 ein deletiertes Venus1-SREBP2aa430 $\Delta$ 331–356 mit in den Zellkern transportieren und das deletierte war dort nachweisbar (Abbildung 3.30, Zeile 2, Spalte 3).



**Abbildung 3.29: Interaktionsverhalten unterschiedlich mutierter SREBP2-Proteine im BiFC-Assay.** Dargestellt ist der (A1) transkriptionsaktive N-terminale Anteil von SREBP2aa430 mit einer Deletion in der Importin- $\beta$ -Domäne an Pos. 331–356 im Venus1/2-Vektor sowie der (A2) transkriptionsaktive N-terminale Anteil von SREBP2aa311 im Venus1-Vektor. (B) HeLa-Zellen wurden mit unterschiedlichen Venus1-SREBP2 und Venus2-SREBP2 Konstrukten (Zeile 1–4) co-transfiziert bzw. als Kontrolle einzeln transfiziert (Zeile 5 und 6). V1S2/V2S2-A594 = spezif. SREBP2-AK gekoppelt mit Alexa594 zum Nachweis von SREBP2aa430, V1S2-A647 = GFP-AK gekoppelt mit Alexa647 zum Nachweis von Venus1-SREBP2aa430 (Zeile 1). V2S2-A594 = spezif. SREBP2-AK gekoppelt mit Alexa594 zum Nachweis von Venus2-SREBP2aa430, V1S2-A647 = GFP-AK gekoppelt mit Alexa647 zum Nachweis von Venus1-SREBP2aa430Δ331–356 (Zeile 2). V2S2-A594 = spezif. SREBP2-AK gekoppelt mit Alexa594 zum Nachweis von Venus2-SREBP2aa430, V1S2-A647 = GFP-AK gekoppelt mit Alexa647 zum Nachweis von Venus1-SREBP2aa311 (Zeile 3). V1S2-A647 = GFP-AK gekoppelt mit Alexa647 zum Nachweis von Venus1-SREBP2aa430Δ331–356 (Zeile 4). V1S2-A647 = GFP-AK gekoppelt mit Alexa647 zum Nachweis von Venus1-SREBP2aa430 (Zeile 5). V1S2-A647 = GFP-AK gekoppelt mit Alexa647 zum Nachweis von Venus1-SREBP2aa430Δ331–356 (Zeile 6). Der Zellkern wurde mit DAPI gefärbt und eine Interaktion durch die Fluoreszenz von rekonstituiertem Venus nachgewiesen. Die Expositionszeiten sind in jedem Bild jeweils rechts unten aufgeführt.



**Abbildung 3.30: Analyse zum Lokalisationsverhalten unterschiedlich mutierter SREBP2-Proteine in der Immunfluoreszenz.** (A) Dargestellt ist der transkriptionsaktive N-terminale Anteil von SREBP2aa430 bei dem es im Bereich des Zipper, wie in der Abbildung gezeigt, vier Aminosäuren ausgetauscht wurden (SSNT). (B) HeLa-Zellen wurden co-transfiziert mit unterschiedlichen Venus1-SREBP2 Konstrukten und unterschiedlichen Myc-SREBP2 Konstrukten. Myc-A488 = Myc-AK gekoppelt mit Alexa488 zum Nachweis von Myc-SREBP2aa430, V1S2-Cy3 = GFP-AK gekoppelt mit Cy3 zum Nachweis von Venus1-SREBP2aa430 (Zeile 1). Myc-A488 = Myc-AK gekoppelt mit Alexa488 zum Nachweis von Myc-SREBP2aa430, V1S2-Cy3 = GFP-AK gekoppelt mit Cy3 zum Nachweis von Venus1-SREBP2aa430Δ331-356 (Zeile 2). Myc-A488 = Myc-AK gekoppelt mit Alexa488 zum Nachweis von Myc-SREBP2aa430 SSNT, V1S2-Cy3 = GFP-AK gekoppelt mit Cy3 zum Nachweis von Venus1-SREBP2aa430Δ331-356 (Zeile 3). Myc-A488 = Myc-AK gekoppelt mit Alexa488 zum Nachweis von Myc-SREBP2aa430 (Zeile 4). Myc-A488 = Myc-AK gekoppelt mit Alexa488 zum Nachweis von Myc-SREBP2aa430 SSNT (Zeile 5). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Expositionszeiten sind in jedem Bild jeweils rechts unten aufgeführt.

Diese Ergebnisse (Abbildung 3.30) zeigten, dass das Venus-Signal alleine nicht für die Interaktion und Kernlokalisierung verantwortlich ist (Abbildung 3.29), sondern tatsächlich beides Funktionen von SREBP2 sind.

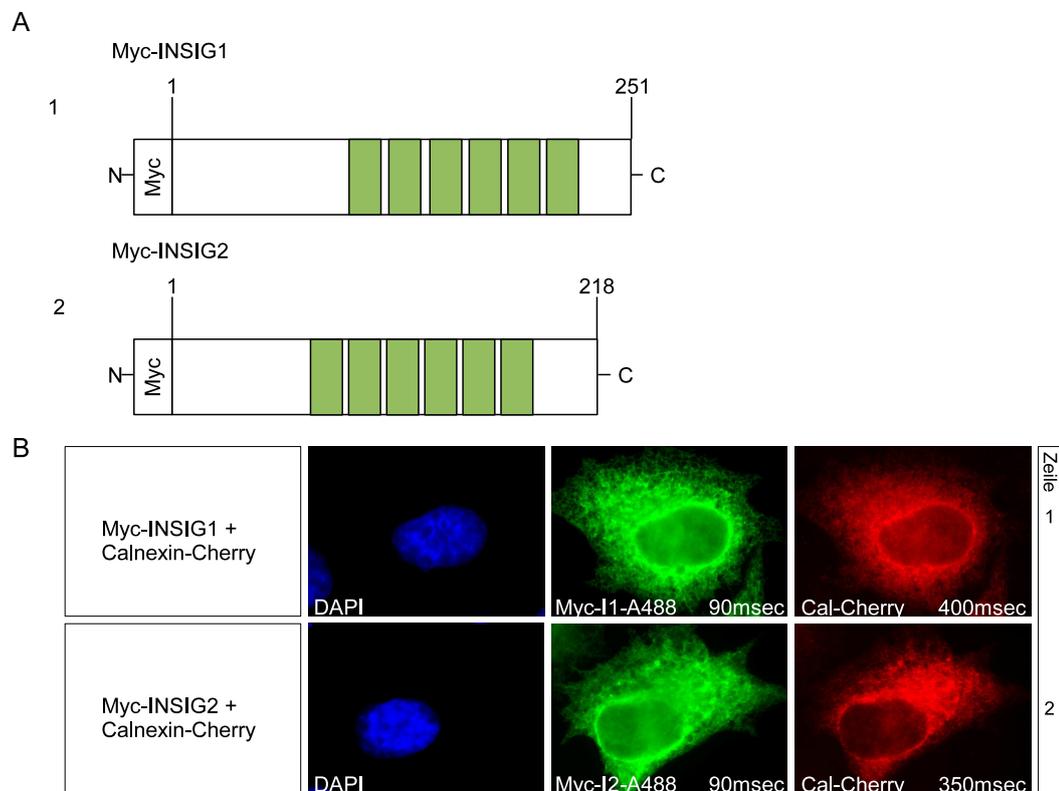
### 3.8.2 Zelluläre Lokalisation von *Xenopus*-INSIG

#### 3.8.2.1 *Xenopus* INSIG-Proteine sind im Cytoplasma/ER lokalisiert

Von den humanen INSIG-Proteinen ist bekannt, dass sie als kleine membrandurchziehende Proteine im ER verankert sind (Feramisco *et al.*, 2004). Ob sich die *Xenopus*-INSIG-Proteine in ihrer Lokalisation ebenso verhalten, sollte mittels Immunfluoreszenz untersucht werden.

Der gesamte offene Leserahmen von INSIG1 bzw. INSIG2 wurde in den Expressionsvektor Myc-pCS2+ kloniert. Zur Analyse der ER-Ständigkeit in der Immunfluoreszenz erfolgte die Co-Transfizierung des fluoreszierenden Calnexin, einem Lektin des Endoplasmatischen Retikulums. Der Nachweis der INSIG-Proteine erfolgte mit dem Myc-Antikörper gekoppelt an Alexa 488 sowie der Nachweis von Calnexin mit der Eigenfluoreszenz des Cherry-tags.

Calnexin und beide INSIG-Proteine wurden exprimiert und zeigten retikuläre Expression, was für eine Lokalisation am ER spricht (Abbildung 3.31, 1–2).

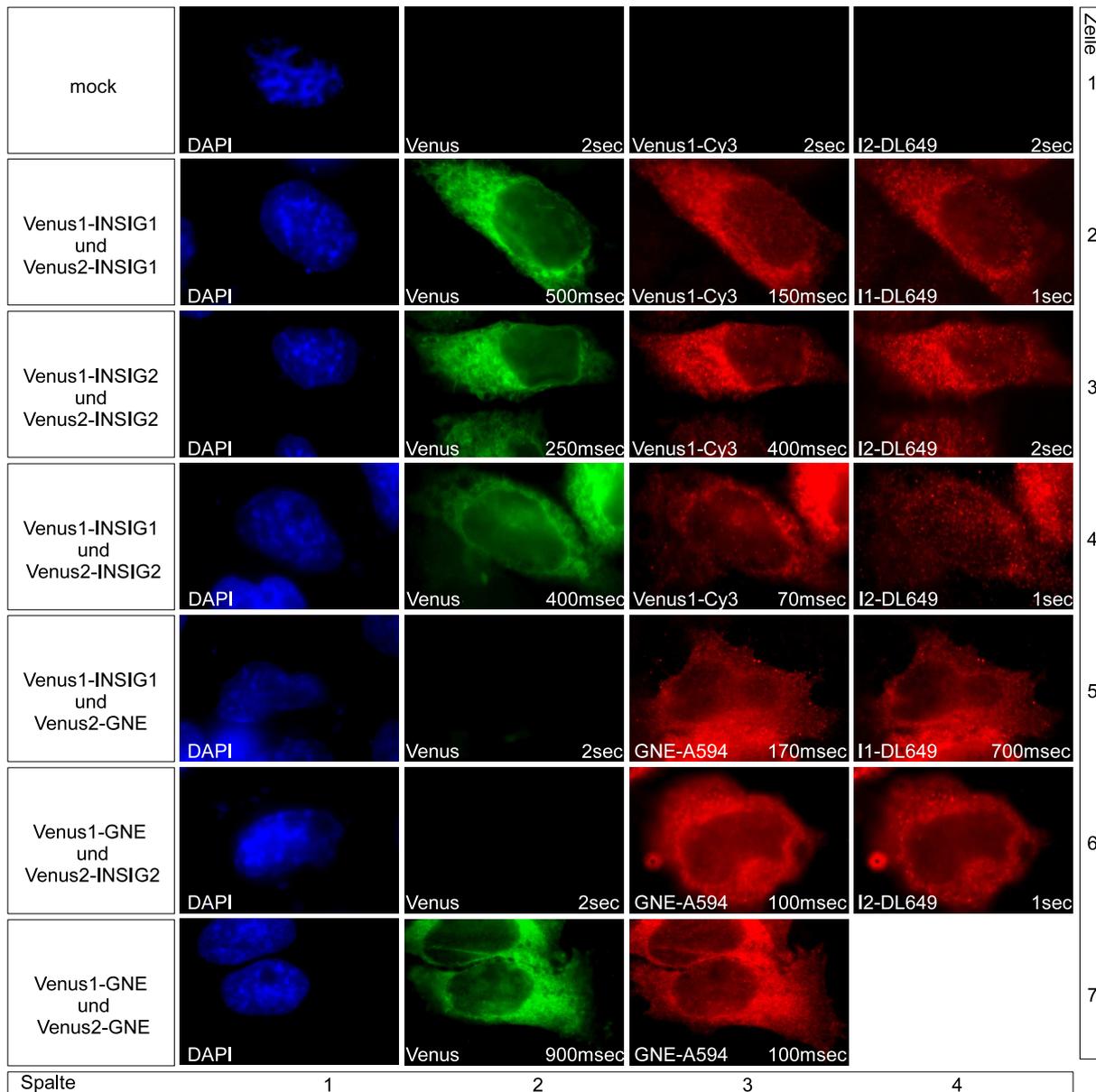


**Abbildung 3.31: Lokalisation von INSIG1 und INSIG2 in transfizierten HeLa-Zellen.** Dargestellt ist (A1) Myc-INSIG1 im pCS2+-Vektor und (A2) Myc-INSIG2 im pCS2+-Vektor. (B) Die HeLa-Zellen wurden mit Myc-INSIG1 (= Myc-I1) und Calnexin-Cherry co-transfiziert: Myc-I1-A488 = Myc-AK gekoppelt mit Alexa488 zum Nachweis von INSIG1 (Zeile 1) sowie Myc-INSIG2 (= Myc-I2) und Calnexin-Cherry co-transfiziert: Myc-I2-A488 = Myc-AK gekoppelt mit Alexa488 zum Nachweis von INSIG2 (Zeile 2). DAPI wurde zum Färben der Zellkerne und mit Cal-Cherry die Eigenfluoreszenz von Cherry zum Nachweis vom ER-ständigen Calnexin eingesetzt. Die Expositionszeiten sind in jedem Bild jeweils rechts unten aufgeführt.

#### 3.8.2.2 Versuche zum Nachweis des Dimerisierungsverhalten der INSIG-Proteine mittels Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC) und Immunpräzipitation (IPP)

Mit BiFC-Analysen (Abschnitt 2.18.7) sollte untersucht werden, ob die INSIG-Proteine in der Lage sind, miteinander zu interagieren. Dazu wurden die selbst nicht fluoreszierenden Venus-Teilpeptide (V1 und V2) N-terminal an INSIG1 (Venus1-INSIG1, Venus2-INSIG1) sowie INSIG2 (Venus1-INSIG2, Venus2-INSIG2) fusioniert. HeLa-Zellen wurden anschließend entweder mit zwei INSIG1 bzw. zwei INSIG2 oder Kombinationen von INSIG1 mit INSIG2 co-transfiziert, der Zellkern mit DAPI gefärbt und die Zellen auf Venus-Fluoreszenz hin untersucht.

Als Kontrolle diente UDP-N-Acetylglucosamin-2-Epimerase (GNE), ein Protein welches im Cytoplasma lokalisiert ist und nicht mit den INSIGs interagiert. Weiterhin erfolgte zur Kontrolle die Transfektion ohne Plasmid (mock). Hier zeigte sich wie erwartet keine Expression der INSIG-Proteine und keine Venus-Fluoreszenz (Abbildung 3.32, Zeile 1).



**Abbildung 3.32: Interaktion der INSIG-Proteine im BiFC-Assay.** Die Zellen wurden, links in der Abbildung dargestellt, wie folgt transfiziert: Vektorkontrolle (Zeile 1), Venus1-INSIG1 mit Venus2-INSIG1: Venus1-Cy3 = GFP-AK gekoppelt mit Cy3 zum Nachweis von INSIG1; I1-DL649 = spezif. INSIG1-AK gekoppelt mit DL649 zum Nachweis von INSIG1 (Zeile 2), Venus1-INSIG2 mit Venus2-INSIG2: Venus1-Cy3 = GFP-AK gekoppelt mit Cy3 zum Nachweis von INSIG2; I2-DL649 = spezif. INSIG2-AK zum Nachweis von INSIG2 (Zeile 3), Venus1-INSIG1 mit Venus2-INSIG2: Venus1-Cy3 = GFP-AK gekoppelt mit Cy3 zum Nachweis von INSIG1; I2-DL649 = spezif. INSIG2-AK gekoppelt mit DL649 zum Nachweis von INSIG2 (Zeile 4), Venus1-INSIG1 mit Venus2-GNE: I1-DL649 = spezif. INSIG1-AK gekoppelt mit DL649 zum Nachweis von INSIG1 (Zeile 5), Venus1-GNE mit Venus2-INSIG2: I2-DL649 = spezif. INSIG2-AK gekoppelt mit DL649 zum Nachweis von INSIG2, (Zeile 6) Venus1-GNE mit Venus2-GNE (Zeile 7). Der Zellkern wurde mit DAPI angefärbt. Venus = Eigenfluoreszenz zeigt die Rekonstitution zweier Venus-Teilpeptide an; GNE-A594 = spezif. GNE-AK gekoppelt mit A594 zum Nachweis von GNE. Die Expositionszeiten sind in jedem Bild jeweils rechts unten aufgeführt.

INSIG1 und INSIG2 wurden in Einzeltransfektionen ausschließlich im ER lokalisiert nachgewiesen (Abbildung 3.31).

Wurden zwei komplementäre Venus-INSIG1 Konstrukte (V1-INSIG1 und V2-INSIG1) in einer Zelle co-exprimiert konnte ein Venus Signal detektiert werden (Abbildung 3.32, Zeile 2). Die gleiche Beobachtung

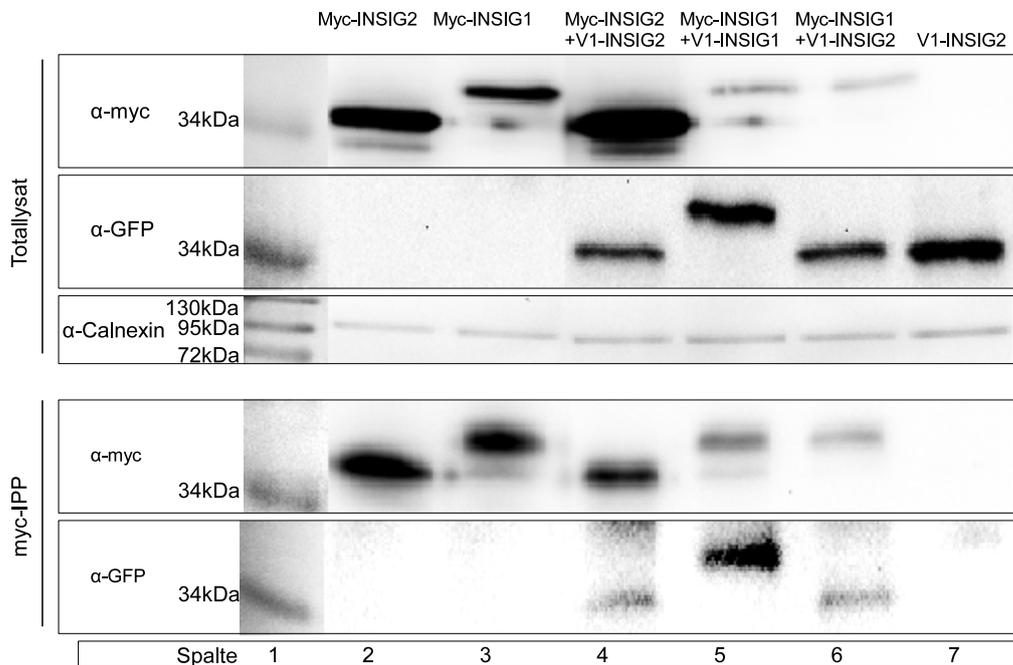
konnte bei Co-Expression von zwei INSIG2 Konstrukten (V1-INSIG2 und V2-INSIG2) gemacht werden (Abbildung 3.32, Zeile 3).

INSIG1 Proteine und INSIG2 Proteine interagieren jeweils untereinander, was zur Rekonstitution und Fluoreszenz von Venus führte.

Auch die Co-Expression von Venus1-INSIG1 mit Venus2-INSIG2 zeigte neben der Fluoreszenz für eine erfolgreiche Proteinexpression ein Venus Signal. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit Venus1-INSIG1 und Venus2-GNE (Abbildung 3.32, Zeile 5) bzw. Venus1-GNE und Venus2-INSIG2 (Abbildung 3.32, Zeile 6) co-transfiziert, die zwar exprimiert werden konnten, aber kein Venus-Signal zeigten. Die Transfektion zweier GNE-Konstrukte (Venus1-GNE und Venus2-GNE) diente für die BiFC-Analysen als Positivkontrolle und zeigte sowohl Proteinexpression als auch Venussignal (Abbildung 3.32, Zeile 7).

Zur Bestätigung der gewonnenen Daten aus der BiFC-Studie dienten Immunpräzipitationsversuche (IPP) mit HeLa-Zellen. Dazu wurden HeLa-Zellen mit Myc-INSIG2, Myc-INSIG1, Myc-INSIG2 und V1-INSIG2, Myc-INSIG1 und V1-INSIG1, Myc-INSIG1 und V1-INSIG2 sowie V1-INSIG2 als Kontrolle transfiziert. Totallysate wurden durch SDS-PAGE (Abschnitt 2.18.3) und Western Blot-Analysen (Abschnitt 2.18.4) mit Antikörpern gegen die mit Myc fusionierten INSIG-Varianten ( $\alpha$ -myc) und gegen GFP bei den mit Venus 1 fusionierten INSIG-Varianten ( $\alpha$ -GFP) analysiert. Als Ladekontrolle diente  $\alpha$ -Calnexin (Abbildung 3.33). Die mit einem Antikörper ( $\alpha$ -myc) gegen die Myc-INSIG Varianten durchgeführte Immunpräzipitation aus HeLa-Totallysaten wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse auf co-immunopräzipitiertes INSIG1 bzw. INSIG2 ( $\alpha$ -GFP) hin untersucht (Abbildung 3.33). Hier zeigte sich in der Co-Immunopräzipitation, dass V1-INSIG2 (Abbildung 3.33, Spalte 4) mit Myc-INSIG2 und V1-INSIG1 mit Myc-INSIG1 (Abbildung 3.33, Spalte 5) sowie V1-INSIG2 mit Myc-INSIG1 (Abbildung 3.33, Spalte 6) präzipitiert werden kann. Dies bestätigt auch die BiFC-Analyse (Abbildung 3.32).

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sowohl INSIG1 als auch INSIG2-Proteine sowohl Homomere als auch Heteromere bilden.



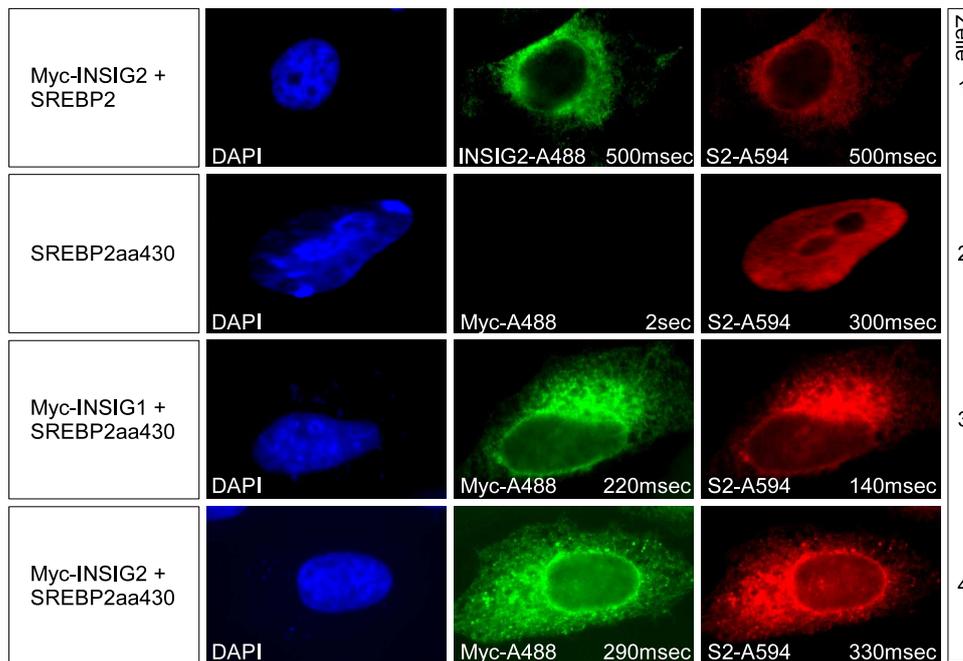
**Abbildung 3.33: Interaktion der INSIG-Proteine in Co-Immunopräzipitationsstudien.** HeLa-Zellen wurden wie folgt transfiziert: Einzeltransfektion von Myc-INSIG2 (Spalte 2); Myc-INSIG1 (Spalte 3) und V1-INSIG2 (Spalte 7); Co-Transfektion von Myc-INSIG2 und V1-INSIG2 (Spalte 4) bzw. V1-INSIG1 (Spalte 5); Myc-INSIG1 und V1-INSIG2 (Spalte 6). HeLa-Zell-Lysat wurde in Western Blot-Analysen gegen Myc ( $\alpha$ -myc), gegen Venus 1 ( $\alpha$ -GFP) und die Ladekontrolle Calnexin ( $\alpha$ -Calnexin) untersucht.

### 3.8.2.3 INSIG ist in der Lage SREBP2 am ER zurückzuhalten

Um zu untersuchen ob *Xenopus*-SREBP2 mit den INSIGs interagiert, wurden BiFC-Interaktionsstudien durchgeführt (Abbildung 3.34). Dazu wurden HeLa-Zellen einzeln mit SREBP2aa430 (Zeile 2) oder SREBP2 mit INSIG2 (Zeile 1), SREBP2aa430 mit INSIG1 (Zeile 3) als auch mit INSIG2 (Zeile 4) co-transfiziert und auf Immunfluoreszenz hin untersucht.

Dem N-terminalen Teil von *Xenopus*-SREBP2: SREBP2aa430 fehlt die C-terminale Domäne. Aus dem Mensch ist bekannt, dass die Interaktion der Proteine und damit verbunden die Regulation der Cholesterinbiosynthese über diese C-terminale Domäne von SREBP mit dem C-Terminus von SCAP vermittelt wird (Sakai *et al.*, 1997). Das heißt, wenn es in der Zelle zu einen Überschuss an Cholesterin kommt halten die INSIG-Proteine, vermittelt über SCAP, SREBP am ER zurück, sodass die Prozessierung von SREBP verhindert wird. Dies zeigten auch die HeLa-Co-Transfektion vom Wildtyp-SREBP2 mit Myc-INSIG2, bei der SREBP2 zusammen mit INSIG2 im Cytoplasma lokalisiert wurde (Abbildung 3.34, Zeile 2). Die Co-Transfektionen mit dem N-terminalen Anteil von SREBP, dem die C-terminale Domäne fehlte zeigte allerdings erstaunlicherweise noch ein anderes Bild. Bis dato nicht neu, zeigte sich die Lokalisation von SREBP2aa430 ausschließlich auf den Zellkern (Abbildung 3.34, Zeile 2). Neu ist allerdings, dass sich bei Co-Transfektion von SREBP2aa430 mit INSIG1 (Abbildung 3.34, Zeile 3) bzw. INSIG2 (Abbildung 3.34, Zeile 4) der SREBP2 N-Terminus außerhalb des Zellkerns befand. Dabei zeigt SREBP2 genau wie die INSIG-Proteine die typische Netzstruktur des ER. Beide INSIG-Proteine sind also in der Lage SREBP2aa430 daran zu hindern, den Zellkern zu erreichen.

Zusammenfassend zeigte sich, dass zu der bekannten C-terminal vermittelten Interaktion möglicherweise auch eine N-terminal vermittelte Interaktion von SREBP2 mit den INSIG-Proteinen stattfinden kann.

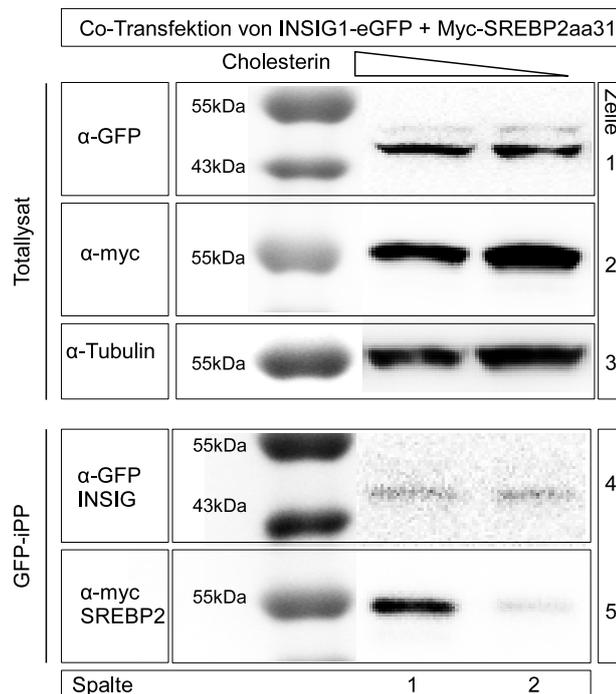


**Abbildung 3.34: SREBP2aa430 wird von den INSIGs am ER zurückgehalten.** HeLa-Zellen wurden wie folgt transfiziert: (Zeile 1) Co-Transfektion von SREBP2 mit INSIG2, (Zeile 2) SREBP2aa430, (Zeile 3) Co-Transfektion von SREBP2aa430 mit Myc-INSIG1 bzw. Myc-INSIG2 (Zeile 4). Erklärung der Abkürzungen: S2-A594 = SREBP2-AK gekoppelt mit Alexa594 zum Nachweis von SREBP2, Myc-A488 = Myc-AK gekoppelt mit Alexa488 zum Nachweis von INSIG1 bzw. INSIG2. Sichtbarmachung der Zellkerne mit DAPI. Die Expositionszeiten sind in jedem Bild jeweils rechts unten aufgeführt.

### 3.8.3 Die Interaktion von SREBP2 mit INSIG-Proteinen ist Cholesterinabhängig

Zur Klärung der Frage, ob die SREBP2-INSIG-Interaktion cholesterinabhängig ist, wurden mit INSIG1-eGFP und Myc-SREBP2aa311 co-transfizierte B35-Zellen bei hoher und niedriger Cholesterinsupplementen-

tation im Medium kultiviert. Die Expression von INSIG1 und SREBP2aa311 erfolgte in der Immunpräzipitation und anschließender Western Blot-Analyse. Die B35-Zellysate wurden dafür in der IPP und anschließender Western Blot-Analyse mit Antikörpern gegen den eGFP-tag ( $\alpha$ -GFP) von INSIG1 ( $\alpha$ -GFP) und gegen den Myc-tag von Myc-SREBP2aa311 ( $\alpha$ -myc) sowie Tubulin ( $\alpha$ -Tubulin) als Ladekontrolle untersucht. Im Totallysat konnten annähernd gleichbleibende Mengen an INSIG1 (Abbildung 3.35, Zeile 1) und SREBP2aa311 (Abbildung 3.35, Zeile 2) detektiert werden. In der Immunpräzipitation konnten bei unterschiedlicher Cholesterinzugabe, gleichbleibende Mengen an INSIG1-eGFP spezifisch durch den GFP-Antikörper immunopräzipitiert werden (Abbildung 3.35, Zeile 4). Befindet sich viel Cholesterin im Medium (FCS + 20  $\mu$ g/ml Cholesterin), dann konnte viel SREBP2aa311 co-immunopräzipitiert werden (Abbildung 3.35; Zeile 5, Spalte 1). Bei reduzierten Cholesterinkonzentrationen im Medium (DMEM ohne FCS), ist auch deutlich weniger SREBP2aa311 an INSIG1 gebunden (Abbildung 3.35; Zeile 5, Spalte 2). Diese Ergebnisse sprechen für eine cholesterinabhängige Interaktion der INSIG-Proteine mit SREBP2.



**Abbildung 3.35: Cholesterinabhängige Interaktion von INSIG1 mit dem N-terminalen Part von SREBP2.** B35-Zellen wurden wie folgt co-transfiziert: INSIG1-eGFP und Myc-SREBP2aa311 und unter hohen Cholesterinbedingungen (mit FCS, Spalte 1) und niedrigen Cholesterinbedingungen (ohne FCS, Spalte 2) für 24 h kultiviert. Die Proteine des Totallysates (Zeile 1–3) bzw. das GFP-Immunopräzipitates (Zeile 4 und 5) wurden durch Antikörper gegen die fusionierten Protein-tags: anti-GFP (Zeile 1 und 4), anti-myc (Zeile 2 und 5) und anti-Tubulin (Zeile 3), welches als Ladekontrolle diente, sichtbar gemacht.



# Kapitel 4

## Diskussion

Für die Funktion von Zellmembranen spielt Cholesterin eine zentrale Schlüsselrolle. Es ist für die Membranpermeabilität, Fluidität, Organellenidentität und für zahlreiche Proteinfunktionen zuständig. Zusätzlich fungiert es als Vorläufermolekül für die Synthese von Gallensäuren, Steroidhormonen und Oxysterolen, die unter anderem einen Effekt im Lipid- als auch im Glucosemetabolismus haben (Woollett, 2008). Weitaus weniger bekannt ist die Rolle von Cholesterin in der Embryonalentwicklung. In der vorliegenden Arbeit wurden die drei ausgewählten Proteine SREBP2, INSIG1 und INSIG2 des Cholesterinregulationsprozesses betrachtet und ihre Funktion in der Embryonalentwicklung des Krallenfroschs *Xenopus laevis* beschrieben.

### 4.1 Sequenzhomologie und Expressionsverhalten von SREBP2, INSIG1 und INSIG2

Durch Abgleich der humanen SREBP2-Aminosäuresequenz mit der *Xenopus*-Datenbank gelang die Identifizierung eines *Xenopus*-SREBP2-Homologes (Accession-Nummer BC072922). Damit konnte über die EST-Datenbank ein passender *Xenopus*-SREBP2 Klon bestellt werden, welcher die UTR's sowie den gesamten offenen Leserahmen von SREBP2 enthielt. Der Aminosäureabgleich über UNIPROT ergab für SREBP2 eine 67 %ige Ähnlichkeit zum Menschen. Der Bereich des bHLHZ, welcher für die Bindung an die DNA und von Importin- $\beta$  entscheidend ist, zeigt eine 94 %ige Ähnlichkeit (Abbildung 1.4). Dieser hohe Identitätsgrad über weite Aminosäurebereiche spricht nicht nur für eine strukturelle, sondern auch für eine funktionelle Konservierung von SREBP2 in diesen beiden Species. Allgemein kann bei langen Aminosäureresten, welche eine Ähnlichkeit von mehr als 30 % aufweisen von einer wahrscheinlichen strukturellen sowie funktionellen Konservierung ausgegangen werden (Sander & Schneider, 1991; Yona *et al.*, 1998). Auch der Sequenzvergleich von *Xenopus* SREBP2 mit anderen Vertebraten zeigt in dieser Region starke Ähnlichkeit und spricht für eine hohe Konservierung (Abbildung 3.2).

Der Sequenzvergleich zwischen dem humanen INSIG1 und INSIG2 zeigt ebenfalls eine starke Sequenzidentität von 85 % (Lee & DeBose-Boyd, 2010) und deutet somit auf eine hohe Konservierung zwischen diesen beiden Proteinen hin. Auch der Sequenzvergleich zwischen Mensch und *Xenopus* zeigte für INSIG1 eine 74 %ige sowie für INSIG2 eine 83 %ige Sequenzähnlichkeit. Beide Ergebnisse, sowohl für INSIG1 als auch für INSIG2, sprechen für eine starke Konservierung zwischen beiden Species. Vor diesem Hintergrund konnten beide Species miteinander verglichen und gewonnene, embryonale *Xenopus*-Daten auf das humane System übertragen werden.

Mit dieser Arbeit erfolgte erstmalig die Dokumentation des Expressionsprofils von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 während der Eireifung und der Embryonalentwicklung in *Xenopus laevis*. Zum Nachweis der Expression wurden RT-PCR-Analysen verwendet. Diese zeigten SREBP2 und INSIG-Transkripte in allen Oozytenstadien (I–VI) bis hin zur sog. Midblastulatransition (MBT), dem Ende der maternalen und dem

Beginn der zygotischen Genexpression im NF St. 8,5 (Abbildung 3.8, Abbildung 3.9). Rizzo und Kollegen (Rizzo, 1994) postulierten, dass der *Xenopus*-Embryo in seiner frühen Entwicklung ein geschlossenes System darstellt, der anfänglich von den Reserven der Mutter lebt. Diese Aussage würde sich mit den erhaltenen Daten in dieser Arbeit decken, da bereits vor der MBT Komponenten des Cholesterinregulationsprozesses (SREBP2 sowie INSIG1 und INSIG2) exprimiert werden, um dem Embryo zur Verfügung zu stehen.

Vom Maussystem ist bekannt, dass die Embryo-eigene Cholesterinbiosynthese ab E4-5 startet (Pratt *et al.*, 1980). Anhand von Studien mit Megalin und ApoB *Knockout*-Mäusen wurde gezeigt, dass die maternale Cholesterinbiosynthese essenziell für die Maus-Embryonalentwicklung ist (Farese *et al.*, 1995; Willnow *et al.*, 1996).

Kurz nach der Befruchtung teilt sich die Zygote durch schnelle und synchrone Zellteilungen, bis der Froschembryo im Blastulastadium eine Zellzahl von etwa 4000 aufweist. Dabei nimmt der Embryo nicht in seinem Volumen zu, aber er unterliegt einer strikten Vergrößerung seiner Zelloberfläche. Somit besteht ein stetiger Bedarf an Phospholipiden, Cholesterin und anderen Membrankomponenten (Rizzo, 1994). Zudem fördert Cholesterin selbst die zelluläre Proliferation (Cuthbert & Lipsky, 1987; Fernández *et al.*, 2005). Wie der Transport von Cholesterin nach seiner Synthese zwischen Mutter und Embryo geschieht, konnte bislang noch nicht geklärt werden. Im Mensch scheinen aber Lipoproteine, die für den Transport des Cholesterins im Körper verantwortlich sind, eine gewisse Rolle zu spielen (Witsch-Baumgartner *et al.*, 2004). Der menschliche Embryo kann im Gegenzug zum Froschembryo seinen frühen Bedarf an Cholesterin über den transplazentalen Rezeptor-vermittelten Lipoproteintransfer abdecken (Witsch-Baumgartner *et al.*, 2004). Dem Froschembryo fehlt dieser Lipoproteintransfer, sodass er auf die maternalen Transkripte angewiesen ist, um seine eigene Sterolsynthese abdecken zu können. Die in dieser Arbeit erhobenen RT-PCR-Daten (Abbildung 3.8, Abbildung 3.9) lassen vermuten, dass auch *Xenopus*-Embryonen genau wie Mausembryonen auf maternale Komponenten (SREBP2 sowie INSIG1 und INSIG2) für eine geregelte Embryonalentwicklung zurückgreifen.

Während der Gastrulation bis hin zur späten Neurulation wurden schwache bzw. keine SREBP2 sowie INSIG-Transkripte detektiert (Abbildung 3.9). Der Embryo scheint in diesen Entwicklungsstadien seinen maternalen Speicher an SREBP2 sowie INSIG-Transkripten zu nutzen, sodass er seine eigene Cholesterinbiosynthese erst zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt hochfährt. Ab der späten Neurogenese bis hin zum untersuchten NF St. 36 wurden erneut SREBP2 sowie INSIG-Transkripte detektiert (Abbildung 3.9).

Zusätzlich zu den RT-PCR Analysen wurden WMISH-Analysen durchgeführt, die eine synchrone Darstellung der zeitlichen und räumlichen Expression von Genen ermöglichen. Die in dieser Arbeit durchgeführten SREBP2 sowie INSIG-Expressionsanalysen an *Xenopus laevis* Embryonen zeigten in sehr frühen Embryonalstadien eine ubiquitäre Expressionsverteilung. Mit fortschreitender Entwicklung begrenzten sich die SREBP2 sowie INSIG Transkripte allerdings lokal (Abbildung 3.10).

Die ersten detektierbaren SREBP2 und INSIG-Transkripte wurden flächig im NF St. 5 am animalen Pol der Blastula beobachtet. Während der Gastrulation und der frühen Neurulation wurden keine SREBP2, INSIG1 und INSIG2 Transkripte detektiert, was sich mit den gewonnenen Daten aus den RT-PCR Untersuchungen deckt. Mit fortschreitender Embryonalentwicklung begrenzten sich dann die SREBP2 und INSIG-Transkripte lokal (Abbildung 3.7) und zeigten ein dynamisches Expressionsmuster, welches sich anfangs auf das Neuralrohr beschränkte und ab dem NF St. 30–33 auf das sich entwickelnde Gehirn ausdehnte (Abbildung 3.7).

Die räumliche Expression von Cholesterinbiosyntheseenzymen in der Embryonalentwicklung wird kontrovers diskutiert. So postulieren einige Autoren, dass die fetale Cholesterinbiosynthese ubiquitär abläuft, verstärkt aber in der Leber, den Nieren und im Gehirn (Woollett, 2001; Herz & Farese, 1999). Andere Autoren beschreiben die zeitlich und räumlich begrenzte Expression von Schlüsselenzymen der Cholesterinbiosynthese auf spezifische Regionen während der Embryonalentwicklung von Maus (Laubner *et al.*, 2003) und *Xenopus* (Tadjuidje & Hollemann, 2006). Laubner und Kollegen zeigten im Mausembryo, dass HMGCR, Idi1, Nsdhl, Ebp und DHCR7 vor allem im Neuralrohr, den Schwanzknospfen- und Gliedern,

Neuralleistenzellen und im Gehirn exprimiert werden. Alle diese Gene stehen unter Expressionskontrolle von SREBP und gehören einer sogenannten Synexpressionsgruppe an, was die räumliche gleiche Expression erklären würde (Laubner *et al.*, 2003).

Die Expression von SREBP2 im Gehirn lässt sich damit erklären, dass gerade das Gehirn beachtliche Mengen an Cholesterin für die Myelinisierung und Synaptogenese benötigt. Beim Menschen ist belegt, obwohl das Zentralnervensystem nur 2,1 % des gesamten Körpergewichtes ausmacht, 23 % des gesamten Cholesterinreservoirs im Zentralnervensystem liegen (Dietschy & Turley, 2004). Somit muss gerade in diesen Strukturen eine korrekte Regulation der Cholesterinbiosynthese gewährleistet sein. Um diesen Bedarf an Cholesterin im Gehirn decken zu können, ist es aufgrund der Barriere Blut-Hirn-Schranke lebenslang auf die zelleigene *de novo*-Synthese angewiesen.

SREBP2 Transkripte konnten ebenfalls in Gelatin-Albumin-Schnitten der im anterioren Bereich des Kopfes gelegenen Augen beobachtet werden (Abbildung 3.7). Dieses Ergebnis deutet auf eine mögliche Funktion von SREBP2 in der Augenentwicklung hin. Die Spezifizierung der Augenanlagen wird durch eine Reihe von Transkriptionsfaktoren realisiert, die unter dem Begriff *eye field transcription factors* (EFTF's) zusammengefasst werden. Zu ihnen zählen unter anderem Rx1, Pax6 und Six3, die essenziell für die Augenformation sind. Sie wurden als Augenmarkergene für die SREBP2 sowie INSIG Funktionsverluststudien ausgewählt. Die ausgewählten Markergene zeigten allerdings keine Änderung in ihrer Expression (Abbildung 3.19). In einer neueren Studie am Mausmodell wurde gezeigt, dass eine spontane Mutation im SREBP2-Gen zum grauen Star und dauerhaften Hautwunden in der Linse führt (Merath *et al.*, 2011). Diese Ergebnisse legen nahe, dass SREBP2 auch essenziell für die normale Linsenfunktion zu sein scheint. Jedoch wurde die Augenentwicklung in dieser Arbeit nicht fokussiert. Es wären weiterführende Untersuchungen notwendig, um die bisher gewonnenen Ergebnisse zu untermauern oder gegebenenfalls zu widerlegen.

Innerhalb dieser Studie erfolgten erstmalig SREBP2 sowie INSIG Expressionsanalysen im adulten Frosch (Abbildung 3.10). Vom humanen System ist bekannt, dass Cholesterin prinzipiell von jeder Zelle synthetisiert werden kann. Allerdings sind die Leber und die Darmschleimhaut Hauptorte der endogenen Cholesterinsynthese (Thews & Vaupel, 2005). Im adulten Frosch konnte wie im humanen System eine Expression von SREBP2 in allen untersuchten Geweben beobachtet werden. Allerdings wird im Gegensatz zum Mensch keine erhöhte Expression in der Leber und im Darm verzeichnet. Auffallend ist eine erhöhte Transkriptmenge im Ovar und den Testis. Bekannt ist, dass Hormone, welche durch den Fetus und/oder die Plazenta synthetisiert werden, die Sterolsyntheserate beeinflussen können (Carr & Simpson, 1984). Gerade Östrogen, Glucocorticoide und Progesteron führen zu einer Steigerung der Sterolsynthese. Beim Mensch versorgt die Mutter den Embryo über die Nabelschnur, der Froschembryo wächst außerhalb des Mutterleibes auf. Möglicherweise geben beim Frosch beide Elternteile durch ihre erhöhte Transkriptmenge von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in den Gonaden, nach der Befruchtung dem Embryo somit schon einen Teil der benötigten Menge mit auf den Weg.

## 4.2 Der Einfluss eines SREBP2 sowie INSIG Funktionsverlustes auf *Xenopus*-Embryonen

Mit dem Ziel die Funktion von SREBP2 sowie INSIG1 und INSIG2 in der Embryonalentwicklung zu untersuchen, wurden Funktionsverluststudien mit Morpholino-*Antisense*-Oligonukleotiden (MØ) durchgeführt. Diese erlauben die spezifische Hemmung der Translation des zu untersuchenden Proteins.

Bei der Einstellung der optimalen Morpholino-Dosis zeigte sich bei Injektion von 2,5 pmol SREBP2-Morpholino pro Blastomere und anschließender Kultivierung der Embryonen entweder ein massives Absterben der Embryonen oder aber Gastrulationsdefekte. Diese Gastrulationsdefekte traten dann auf, wenn das prospektive Mesoderm nicht durch die Blastopore invaginieren konnte. Daraus resultiert ein Exemplar, mit zwei Ausstülpungen die über einen dünnen Steg miteinander verbunden sind: der ektodermale

Sack und eine Ausstülpung bei dem das Notochord und die Somiten durch das Endoderm bedeckt werden (Sharpe & Mason., 2008). Diese „pilzartig“ aussehenden Gebilde werden als Exogastrulae bezeichnet. Diese sind nicht überlebensfähig und 80 % der mit 2,5 pmol SREBP2-MØ injizierten Embryonen starben zu einem Zeitpunkt äquivalent zu NF St. 13–14 (Abbildung 3.12). Bei Herabsenkung der Morpholinomengen auf 1,6 pmol pro Blastomere konnte hingegen die Überlebensrate auf über 70 % gesteigert werden (Abbildung 3.12).

Die Spezifität der eingesetzten SREBP2 sowie INSIG Morpholinos konnte zum einen durch die Injektion eines Kontrollmorpholinos, welches nicht zu einer Änderung des Phänotyps führte, bestätigt werden. Zum anderen konnte durch den Einsatz eines SREBP2aa9–430 Konstrukts im gekoppelten Transkriptions- und Translationsassay, welches keine Bindestelle für den SREBP2 Morpholino besitzt, die Spezifität des SREBP2-MØ *in vitro* nachgewiesen werden (Abbildung 3.11). Dieses Konstrukt könnte in zukünftigen Rescue-Experimenten eingesetzt werden. Damit wäre es möglich die Ausprägung des Funktionsverlust-Phänotypen zu verhindern, welcher durch die Injektion des SREBP2-MØ die endogene SREBP2-Proteinsynthese inhibierte.

Makroskopisch resultiert die Hemmung der Translation von SREBP2 und INSIG1 durch Morpholino-*Antisense*-Oligonukleotide in Embryonen mit reduzierten Kopfstrukturen sowie gekrümmten Körperachsen (sog. *bent-axis*-Formationen). Die INSIG2 Morpholino injizierten Embryonen wiesen perikardiale Ödeme auf. Zunächst sollte geklärt werden, was die Ursache für die gekrümmten Körperachsen zur SREBP2-MØ injizierten Seite ist. Die Ursache könnte einerseits sein, dass der Organismus überflüssige Zellen durch programmierten Zelltod eliminiert, es also zu einer gesteigerten Apoptoserate kommt. Andererseits könnte der Organismus nicht mehr in der Lage sein, seine benötigte Zellzahl zu erreichen, resultierend aus einer verminderten Proliferationsrate. Die dazu durchgeführten Proliferations- sowie Apoptoseanalysen im NF Stadium 30–32 zeigen eine signifikant gesteigerte Apoptose im Bereich des Kopfes und der Finne, im Vergleich zur nicht-injizierten Kontrollseite und zu den nicht-injizierten Kontrollembryonen (Abbildung 3.13). Dies korreliert auch mit einer verminderten Proliferationsrate in dieser Region im Vergleich zur nicht-injizierten Kontrollseite und den nicht-injizierten Kontrollembryonen. Bei Funktionsverlust von SREBP2 steht der Zelle nicht mehr ausreichend neu-synthetisiertes Cholesterin zur Verfügung. Letzteres benötigt sie aber während der Entwicklung, unter anderem für den Aufbau von Zellmembranen. Proliferationsuntersuchungen zeigten weniger sich teilende Zellen und im Apoptoseassay einen verstärkten Zellabbau. Dies könnte das Auftreten von gekrümmten Körperachsen sowie reduzierten Kopfstrukturen auf der injizierten Seite erklären.

*Knockout/Knockdown*-Versuche in unterschiedlichen Modellorganismen zeigen, dass eine Fehlregulation bzw. ein Funktionsverlust von SREBP fatal für den Organismus ist. *Drosophila* kann Cholesterin nicht *de novo* synthetisieren, sodass die Prozessierung von dSREBP cholesterinunabhängig ist. Allerdings hat ein Verlust von dSREBP Einfluss auf die Fettsäuresynthese. Kunte und Kollegen (Kunte *et al.*, 2006) zeigten, dass eine Nullmutation im dSREBP Gen von *Drosophila* zum transkriptionellen Verlust von Genen der Fettsäuresynthese, einem reduzierten Fettsäuregehalt und schlimmstenfalls zu einer hohen Letalität in der frühen Embryogenese führte. Die Letalität der Larven konnte durch Zufütterung von Fettsäuren aufgehoben werden. Das zeigt, dass dSREBP in Fliegen essenziell für die Aufrechterhaltung der Fettsäurehomöostase ist (Kunte *et al.*, 2006).

*Knockout*-Mäuse ohne transkriptionsaktives SREBP sterben in der frühen Embryogenese. Beispielsweise führt eine Keimbahndeletion der S1-Protease dazu, dass den Mäusen die Fähigkeit fehlt SREBP zu prozessieren. Sie sterben vor dem vierten Entwicklungstag (Yang *et al.*, 2001; Mitchell *et al.*, 2001).

Somit scheint die intrazelluläre Konzentration an SREBP2 in der Zelle nicht nur essenziell für eine strikte Regulation der Cholesterin- und Fettsäurebiosynthese zu sein, sondern auch entscheidend für die Entwicklung des Organismus. Dennoch kann die Herabregulierung von SREBP auch genutzt werden, wie neueste Studien zeigen (Tang *et al.*, 2011). Forscher identifizierten Betulin als Inhibitor der SREBP-Reifung, indem sie die Interaktion von SCAP mit INSIGs förderten. Die Inhibition von SREBP durch Betulin führt zur Senkung der Cholesterin- und Fettsäuresynthese. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass Betulin

die Senkung der Lipid-Konzentration im Serum und Gewebe fördert, Fettleibigkeit reduziert und die Insulin-Sensitivität erhöht. Somit könnte in Zukunft die Inhibierung des SREBP-Weges durch Betulin für therapeutische Zwecke genutzt werden um metabolische Krankheiten, Typ II Diabetes und Arteriosklerose zu behandeln.

### **4.3 Der SREBP2, INSIG1 und INSIG2 Funktionsverlust führt zur Einschränkung der Neurogenese und hat im Falle von SREBP2 Einfluss auf Gehirnstrukturen**

Erst seit den 1990er Jahren beschäftigt sich die Wissenschaft auch mit der Rolle von Cholesterin in der embryonalen und fetalen Entwicklung. Forscher stellten fest, dass Cholesterin in hohen Konzentrationen im neuralen Gewebe vorkommt (Dietschy & Turley, 2001) und wichtig für die neuronale Funktion und für das Neuritenwachstum ist (Funfschilling *et al.*, 2012; Suzuki *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2010; Herrera & Amusquivar, 2000; Fukata & Fukata, 2010).

Im *Xenopus*-System wurde die Rolle von DHCR7, eines Schlüsselenzyms der Cholesterinbiosynthese, und seinen Einfluss in der Embryogenese beschrieben. Arbeiten von Tadjuidje & Hollemann sowie von Koide und Kollegen (Tadjuidje & Hollemann, 2006; Koide *et al.*, 2006) zeigen, dass die Expression von DHCR7 in der frühen Embryonalentwicklung auf Signalzentren (Spemann-Organisator und Notochord) beschränkt ist. Dies lässt vermuten, dass ein Bedarf an *de novo* synthetisierten Cholesterin für frühe Musterereignisse in *Xenopus* unerlässlich ist, da viele Musterbildungssignale während der Vertebraten Entwicklung von diesen Strukturen segregiert werden (Cleaver *et al.*, 2000; De Robertis *et al.*, 2000; Fleming *et al.*, 2004). Sie zeigten weiterhin mit neuralen Markern, dass der Funktionsverlust- bzw. Gewinn von DHCR7 zu verkleinerten Augen sowie placodaler Strukturen führte und zogen die Schlussfolgerung, dass dieser Phänotyp wahrscheinlich durch eine teilweise Unterdrückung der Neurogenese zustande kommt. Zusammenfassend zeigten diese Studien, dass für eine geregelte neuronale Entwicklung eine strikte Kontrolle der *de novo* Cholesterinbiosynthese unerlässlich ist. Sie lassen ebenfalls die Vermutung zu, dass auch Komponenten der Cholesterinregulation, wie SREBP2 und die INSIGs, Einfluss auf die Neurogenese bzw. die Gehirnentwicklung haben könnten.

Dies bestätigten auch die histologischen Analysen von markierter endogener SREBP2-mRNA, mittels der SREBP-Transkripte im Neuralrohr sowie im Vorder-, Mittel-, und Hinterhirn detektiert wurden (Abbildung 3.7). Bei den durchgeführten SREBP2-Funktionsverluststudien wurden makroskopisch verkleinerte Kopfstrukturen beobachtet (Abbildung 3.12). Diese Ergebnisse gaben einen ersten Hinweis darauf, dass die Neurogenese und die Gehirnentwicklung durch SREBP2 beeinflusst werden. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden die Auswirkungen des SREBP2 sowie des INSIG-Funktionsverlustes auf die Entwicklung des Gehirns und speziell auf die Neurogenese mit Hilfe von Markergenen untersucht und charakterisiert. Die Mikroinjektion des SREBP2- sowie der INSIG-Morpholinos führten zu keiner Änderung der frühen Expressionsdomäne (Neurulastadium) des panneuralen Markers Sox3 (Abbildung 3.14). Auch in späteren Stadien (Schwanzknospenstadium) konnte keine Änderung der Sox3-Expression detektiert werden (Abbildung 3.14). Hingegen wurde bei Betrachtung der N-Tubulin Expressionsdomäne eine Suppression sowohl im Neurula- als auch im Schwanzknospenstadium detektiert (Abbildung 3.16). Die primäre Neurogenese ist von molekularen Ereignissen gekennzeichnet, die einer zeitlichen Kaskade folgen. Sox3 steht exemplarisch als Marker für die frühe neurale Induktion, während N-Tubulin in der Kaskade unten stehend, die terminale Differenzierung repräsentiert.

Die vorliegenden Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die primäre neurale Induktion unbeeinflusst bleibt (repräsentiert durch die Expression von Sox3). Sie zeigen weiterhin, dass der SREBP2-Funktionsverlust die neurale Spezifizierung der primären Neuronen stört (repräsentiert durch die Expression von N-Tubulin). Das bedeutet, dass ein Funktionsverlust von SREBP2 die primäre Neurogenese auf

der Ebene der neuronalen Differenzierung beeinflusst.

Im Mausmodell ist in einer aktuellen Studie ebenfalls über eine andere Komponente der Cholesterinbiosynthese (Acetoacetyl-CoA synthetase), der Einfluss von SREBP2 auf die neuronale Differenzierung beschrieben worden (Hasegawa *et al.*, 2012).

Angeborene Störungen der Cholesterinbiosynthese werden durch eine Reihe unterschiedlicher Entwicklungsdefekte charakterisiert. So kann eine Fehlregulation der Cholesterinbiosynthese beispielsweise fatale Folgen in der Gehirnentwicklung haben. Ein bekanntes Beispiel für eine Fehlregulation von einem Enzym der Cholesterinbiosynthese stellt die verminderte Aktivität der 7-Dehydrocholesterin-Reduktase (DHCR7) dar. Bei dem entstehenden Krankheitsbild des Smith-Lemli-Opitz Syndroms (SLOS) fehlt den Patienten die Fähigkeit, 7-Dehydrocholesterin (7-DHC) in Cholesterin zu konvertieren. Dadurch kommt es zum Absinken der Cholesterinbiosyntheserate und die daraus resultierenden Defekte reichen von sehr milden (z. B. Lernschwierigkeiten) bis hin zu schwerwiegenden Fehlfunktionen wie beispielsweise mentale Retardierung, angeborene Abnormalitäten oder Deformationen des Gehirns (Kelley & Hennekam, 2000; Porter, 2000; Nowaczyk *et al.*, 2012). Im schlimmsten Fall zeigen die Patienten Holoprosenzephalie, bei der es zur unvollständigen Teilung bzw. Differenzierung des Vorderhirns kommt. Die zunehmende Datenlage zeigt, dass der SLOS-Phänotyp möglicherweise auf einen gestörten Hedgehog-Signalweg zurückzuführen ist. Die Hedgehog-Proteinfamilie wirkt als Morphogen an Musterbildungsprozessen, bei der Gehirn- und Knochenentwicklung und in der Organogenese mit. Tadjuidje & Hollemann zeigten in *Xenopus*, dass die zeitliche und die räumliche Expression von DHCR7 stark mit der Expression von Sonic Hedgehog (Shh) korreliert (Tadjuidje & Hollemann, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Shh nach Mikroinjektion des SREBP2-MØ untersucht (Daten nicht gezeigt). Es konnte keine Änderung der Shh-Expressionsdomäne detektiert werden, was vermuten lässt, dass SREBP2 den Hedgehog-Signalweg nicht beeinflusst.

Der Phänotyp der reduzierten Kopfstrukturen nach Injektion von SREBP2-MØ sowie INSIG-MØ sollte auf molekularer Ebene durch Markergene die die Gehirnentwicklung repräsentieren näher verifiziert werden. Das Froschgehirn besteht aus Vorder-, Mittel-, und Hinterhirn. Exemplarisch wurden die Gehirnmarker En2 (Mittelhirn/Hinterhirn Grenze) sowie Krox20 (Hinterhirn) ausgesucht und ihre Expression nach SREBP2 sowie INSIG-Funktionsverlust untersucht. In Neurulastadien konnte eine Suppression der Markergene En2 und Krox20 nach Injektion des SREBP2-MØ nachgewiesen werden (Abbildung 3.18). Hingegen ist die Expression dieser Marker im Schwanzknospenstadien unbeeinflusst (Abbildung 3.18). Diese Daten lassen vermuten, dass SREBP2 Einfluss auf die Neurulation hat, nicht aber auf die späte Gehirnentwicklung.

Am stärksten wirkt sich die Hemmung von SREBP2 sowie der INSIGs auf die Expression des Markers Olig3 aus. Injektion des SREBP2-MØ sowie der INSIG-MØ resultierte in der Suppression der Olig3-Expressionsdomäne (Abbildung 3.15). Oligodendrozyten zählen zu den Stützzellen (Glia) des Zentralnervensystems. Ihre zellulären Fortsätze bilden Markscheiden aus Myelin, die die Zellfortsätze (Axone) der Nervenzellen umhüllen und so elektrisch isolieren. Der Cholesterinanteil der Oligodendrozyten ist sehr hoch, da Myelin einen Lipidgehalt von 75 % besitzt von dem wiederum 25 % Cholesterin entsprechen. Neuere Studien zeigen, dass eine fehlerhafte Cholesterinbiosynthese im Gehirn zu einer mangelhaften Myelinisierung führt (Saher *et al.*, 2005; Verheijen *et al.*, 2009). So gehen metabolische Krankheiten (z. B. SLOS) oft mit einer fehlerhaften Myelinisierung einher (Saher *et al.*, 2005). Die Suppression von Olig3 nach Mikroinjektion des SREBP2-Morpholinos ist ein deutliches Zeichen dafür, dass die Oligodendrozytenspezifizierung gestört ist und zeigt, dass auch die *Xenopus*-Oligodendrozyten auf Cholesterin angewiesen sind.

Ein angestrebtes Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Hemmung der Translation von SREBP2 sowie der INSIGs auf ausgewählte Markergene des Notch-Signalweges zu untersuchen. Es konnten jedoch bei allen Markergenen Xngnr1, Notch, Delta1 und Delta2 keine Änderung in ihrer Expression bei Funktionsverlust von SREBP2 und den INSIGs nachgewiesen werden (Abbildung 3.17). Aufgrund dieser Datenlage ist ein Einfluss von SREBP2 sowie von INSIG1 und INSIG2 im Notch-Signalweg unwahrscheinlich.

## 4.4 Überexpression von SREBP2, INSIG1 und INSIG2

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt eines SREBP2 und INSIG Funktionsgewinnes in *Xenopus laevis* Embryonen zu untersuchen. Dazu wurde in Voruntersuchungen die Funktionalität der generierten SREBP2 sowie INSIG Konstrukte getestet. Es konnte bei allen generierten Konstrukten Proteinexpression nachgewiesen werden (Abbildung 3.21).

Bei der Optimierung der einzusetzenden RNA-Menge zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den Funktionsverluststudien. Die Injektion von 200 pg SREBP2 oder INSIG RNA führt zu einem massiven Absterben der Embryonen. Selbst bei der Injektion von 50 pg SREBP2 RNA sterben 43 % der Embryonen (Abbildung 3.22, A). Der Phänotyp äußert sich, ebenso wie in den Funktionsverluststudien, in einer gekrümmten Körperachse sowie dem teilweisen Verlust anteriorer Kopfstrukturen (Abbildung 3.22, B). Bei einer weiteren Absenkung der Konzentration auf 10 pg SREBP2 RNA kann zwar das Überleben der Embryonen auf 79 % gesteigert werden, allerdings zeigen die Embryonen keinen auffälligen Phänotypen mehr (Abbildung 3.22, A).

Die erhaltenen Daten lassen vermuten, dass der sich entwickelnde *Xenopus*-Organismus noch sensitiver auf ein Überangebot an SREBP2 als auf ein Mangel reagiert. So zeigen die durchgeführten Apoptoseanalysen ein übermäßiges Absterben von Zellen auf der SREBP2 injizierten Seite (Abbildung 3.13). In zukünftigen Rescue-Experimenten könnte versucht werden durch Koinjektion der SREBP2-mRNA mit INSIG-mRNA den SREBP2-Überexpressionsphänotypen zu verhindern. Dadurch könnte das übermäßige Sterben der Embryonen aufgehoben bzw. zumindest reduziert werden. Die im Gegenzug zu den Apoptoseuntersuchungen durchgeführten Zellproliferationsanalysen ergaben eine verminderte Proliferationsrate auf der SREBP2 injizierten Seite (Abbildung 3.13).

Tierische Zellen müssen ihre Biosynthesewege regulieren, um genau die Menge ihrer Endprodukte zu produzieren, welche sie benötigen, ohne dabei eine Überexpression zu riskieren. Gerade in der Cholesterinhomöostase ist eine strikte Kontrolle wichtig, da Cholesterin für eine Vielzahl von zellulären Funktionen essenziell ist. So kann eine Überproduktion von Cholesterin die Bildung löslicher Kristalle fördern, die tödlich für Zellen sind (Brown & Goldstein, 1997). Auch ein Überangebot von Cholesterin in der Blutbahn ist letal, da es sich in Arterien einlagert und dadurch Artherosklerose verursacht (Small & Shipley, 1974). Zwar wurde der Cholesteringehalt in den Embryonen nicht untersucht, dennoch zeigte sich, dass die Embryonen stark auf ein Überangebot (Funktionsgewinnstudien) und auch auf Mangel (Funktionsverluststudien) von SREBP2 reagierten. Diese Sensitivität der Embryonen lässt verschiedene Interpretationen zu. Ein möglicher Grund könnte sein, dass durch die Injektion des SREBP2 Morpholinos zwar die Cholesterinproduktion heruntergefahren wird, aber eventuell dem Embryo noch genug gespeichertes maternales Cholesterin zur Verfügung steht. Eine Speichermöglichkeit stellen dabei Caveolae's dar, sackförmige Einbuchtungen der Plasmamembran. Caveolae's werden durch Caveolin 1 gebildet, hoch-affine Cholesterin bindende Proteine (Frank *et al.*, 2006). Die Expression der Caveoline und somit die Bildung der Caveolae's ist dabei stark von der Verfügbarkeit von Cholesterin abhängig (Fielding *et al.*, 1997; Gargalovic & Dory, 2003).

Während der frühen *Xenopus*-Neurogenese konnten keine SREBP2-Transkripte detektiert werden (Abbildung 3.9). Dies liegt wahrscheinlich daran, dass zuerst die Reserven von der Mutter aufgebraucht werden bevor die eigene Synthese zu einem späteren Zeitpunkt (ab NF St. 19) hochgefahren wird. Denkt man in dieser Richtung weiter, könnte bei einer Überexpression von SREBP2 im Embryo nun dieser Effekt potenziert werden. D.h. die SREBP2-Überexpression führt möglicherweise zu einer unphysiologischen Cholesterin-Eigenproduktion und zusätzlich zu den Reserven von der Mutter wird dem Embryo damit zu viel Cholesterin zur Verfügung gestellt. In transgenen Mäusen welche eine dominant-positive Form von SREBP2 in Leber und adipösen Gewebe exprimieren, konnte gezeigt werden, dass die mRNA's für Cholesterinbiosynthesenzyme stark erhöht waren (Horton *et al.*, 1998). Die Leber der transgenen Mäuse zeigten einen 28-fachen Anstieg in der Cholesterinsyntheserate. Möglicherweise übersteigt die erhöhte Cholesterinkonzentration in den *Xenopus*-Embryonen toxische Werte für die Zelle, wie die vermehrt

auftretenden apoptotischen Zellen in den Apoptoseanalysen zeigen. Zusätzlich kann man davon ausgehen, dass durch das Hochfahren der Synthese unnötig viel ATP verbraucht, was aber für das Zellwachstum benötigt wird. Dieser gestörte Energiestoffwechsel kann auch die schlecht wachsenden Zellen/Embryonen erklären. Ein gegensätzlicher Gedankenansatz wäre, dass aufgrund der raschen Zellteilungen gerade in frühen Embryostadien (ca. aller 30–40 Minuten bei 14 °C) ein vermehrter Bedarf an Cholesterin als Membranbaustein besteht. An der ER-Membran wird infolge der SREBP2-Überexpression dieses vermehrt synthetisiert. Dadurch wird dem Organismus signalisiert, wie unter cholesterinreduzierten Bedingungen, dass die Zelle Cholesterin benötigt. D.h. das synthetisierte SREBP2 würde seiner Bestimmung folgend in den Kern transportiert werden um dort als Transkriptionsfaktor die Cholesterinbiosynthese hochzufahren. SREBP2 ist aber möglicherweise aufgrund der raschen Zellteilungen nicht in der Lage, schnell genug in den Zellkern zu gelangen. Der Körper würde trotz Überangebot an SREBP, „cholesterinunterversorgt“ bleiben. Das hätte wiederum eine Verzögerung der eigenen Cholesterinbiosynthese des Embryos zur Folge. Weiterhin könnte man spekulieren, dass die Zelle Cholesterin-unterversorgt bliebe, weil die Translationsmaschinerie aufgrund der Überexpression überlastet ist. Damit würde zwar genügend SREBP2 mRNA zur Verfügung stehen, aber nicht genügend Ribosomen.

Noch vor einigen Jahren bestand das Hauptproblem bei der Analyse der Genfunktion während der *Xenopus* Entwicklung darin, dass die Genexpression nicht zeitlich kontrolliert werden konnte. 1995 gelang es Kolm und Sive (Kolm & Sive, 1995) ein hormon-induzierbares Fusionsprotein zu generieren, welches in zeitlich kontrollierter Weise die Induktion der Genexpression erlaubt. Um dem massiven Absterben der Embryonen bei Überexpression von SREBP2 im Gastrulastadium entgegen zu wirken und somit die SREBP2-Aktivität besser kontrollieren zu können, wurden Hormon-induzierbare Fusionsproteine generiert. Bei diesen Hormon-induzierbaren Konstrukten (SREBP2-VP16-GR, SREBP2-EngR-GR und SREBP2-GR) konnte die Proteinexpression im TnT-Test nachgewiesen werden (Abbildung 3.21), sodass die entsprechende mRNA anschließend *in vivo* injiziert wurde. Zum Induzieren des Systems wurde Dexamethason eingesetzt, von dem bekannt ist, dass es keinen erkennbaren Effekt auf die *Xenopus* Entwicklung hat (Gammill & Sive, 1997). Die Zugabe von Dexamethason im NF Stadium 11,5 ermöglichte das Hochfahren der SREBP2 abhängigen Proteinexpression ungefähr drei Stadien nach der Zugabe in das Embryomedium. Dadurch konnte das übermäßige Absterben der Embryonen während der Gastrulation reduziert werden.

Weiterhin ermöglicht das hormoninduzierbare System, potenzielle Zielgene von *Xenopus* SREBP2 zu identifizieren. Bisher sind in der Maus über 30 Zielgene für SREBP bekannt (Horton *et al.*, 2003), die unter anderem eine Rolle während der Cholesterinsynthese- und Aufnahme, im Sterolmetabolismus sowie bei der Fettsäure-, Triglycerid- und der Phospholipidsynthese haben. In dieser Arbeit wurden drei dieser Zielgene – INSIG1, HMGCoAR und LDL – sowie die Gene Sox3 und Xbra daraufhin überprüft, ob sie Zielgene von SREBP2 im *Xenopus* System sind. Als Versuchssystem boten sich animale Gewebeexplantate an. Dabei handelt es sich um embryonale *Xenopus*-Blastulazellen die als undifferenzierte Zellen die Charakteristika von embryonalen Stammzellen besitzen und sich durch ihre Pluripotenz auszeichnen. In den animalen Kappenexperimenten wurde nach Überexpression von SREBP2 die Induktion von potenziellen Zielgenen durch RT-PCR sichtbar gemacht. Dabei bestätigte sich, dass Sox3 zwar als ektodermaler Marker Expression zeigt, allerdings nicht durch SREBP2 reguliert wird. Im Gegenzug dazu, zeigt Xbra als mesodermaler Marker, wie zu erwarten, keine Expression in den ektodermalen Gewebeexplantaten. Von den ausgewählten Genen der Cholesterinbiosynthese sind folgende potenzielle *Xenopus* SREBP2 Zielgene, die hochreguliert werden: HMGCoA-Reduktase, LDL und INSIG1 (Abbildung 3.27). Diese Ergebnisse erweitern die publizierten potenziellen Zielgene auch für das *Xenopus*-System. Ob die drei Gene, HMGCoAR, LDL und INSIG1 direkte oder indirekte Zielgene von *Xenopus* SREBP2 sind, bleibt bislang allerdings ungeklärt. Zur Beantwortung dieser Fragestellung könnte in zukünftigen animalen Kappenexperimenten Cycloheximid als Hemmer der Proteintranslation eingesetzt werden. Von diesem ist bekannt, dass es ab dem Zeitpunkt der Zugabe in das Embryomedium nachweislich die Proteinbiosynthese hemmt. Alle nachweisbaren Transkripte in der RT-PCR wären dann auf eine direkte Regulation durch SREBP2 zurückzuführen.

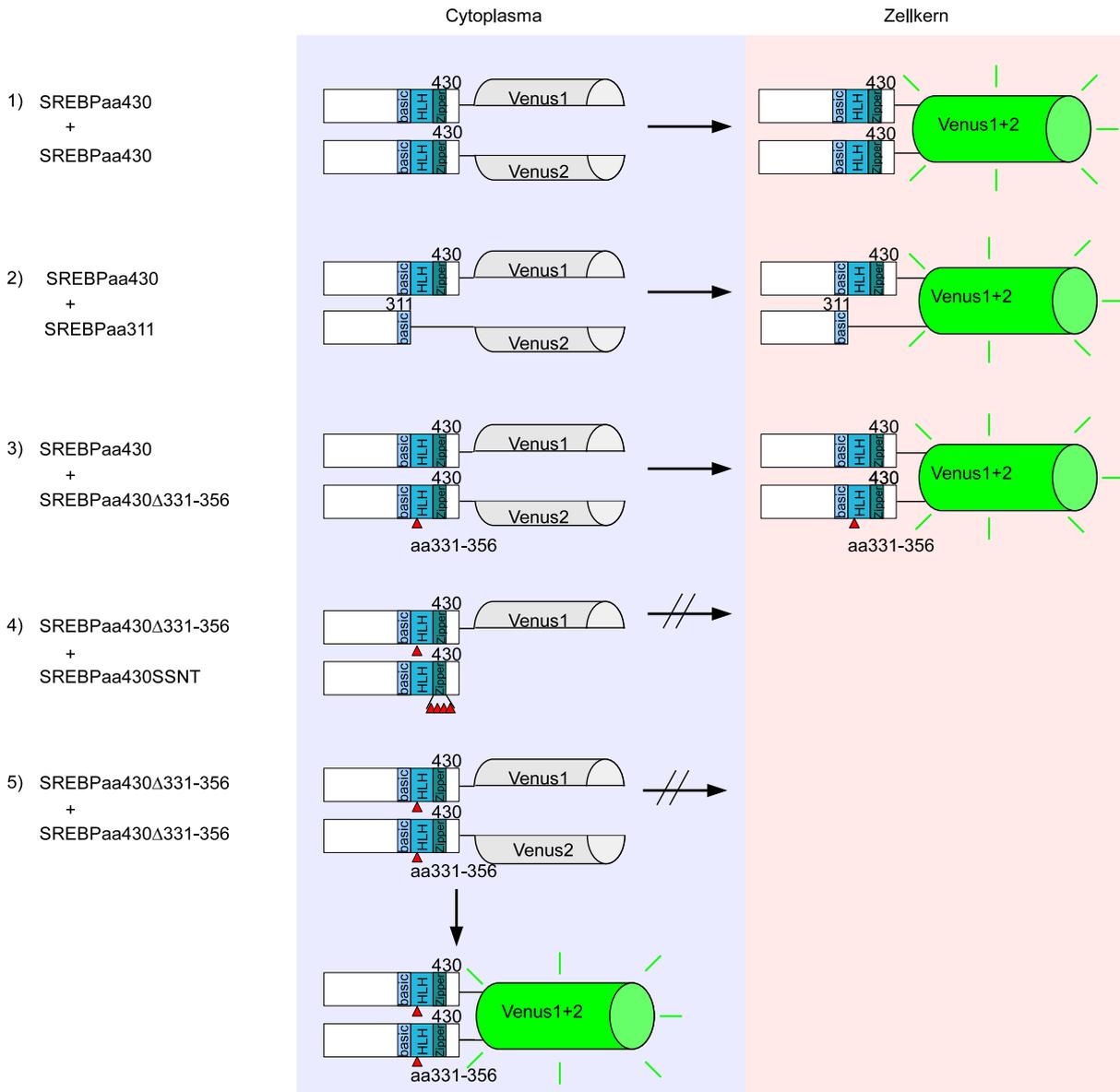
## 4.5 Expression von SREBP2, INSIG1 und INSIG2 in HeLa-Zellen

### 4.5.1 Lokalisierung und Dimerisierung von SREBP

Zur näheren Analyse des SREB-Proteins und seinen Domänen, wurden der gesamte offene Leserahmen, verkürzte Varianten des N-terminalen Teiles von SREBP (SREBP2aa311/430) sowie Deletionskonstrukte von SREBP2 kloniert (Abschnitt A.2). Diese zeigen im *in vitro* Transkription und Translationsassay eine erfolgreiche Proteinexpression (Abbildung 3.21). Auch die INSIG-Proteine konnten mit diesem System erfolgreich nachgewiesen werden (Abbildung 3.21). Somit können die Konstrukte in weiterführenden Experimenten in der Immunfluoreszenz eingesetzt werden.

Eine wichtige Fragestellung war, ob es möglich ist *Xenopus*-SREBP2 sowie die *Xenopus*-INSIGs im humanen System (HeLa-Zellen) sowie in der Ratte (B35-Zellen) zu exprimieren. Es zeigte sich, dass alle generierten *Xenopus* Konstrukte in HeLa-Zellen (Mensch) sowie in B35-Zellen (Ratte) exprimiert werden konnten und noch erstaunlicher, dass SREBP2 prozessiert wird. Das heißt, *Xenopus*-SREBP2 ist in der Lage, alle für die Prozessierung notwendigen Komponenten (z. B. S1 und S2-Protease, Sec-Proteine usw.) vom menschlichen System sowie der Ratte zu nutzen. Als Transkriptionsfaktor wirkend, muss SREBP2 in den Zellkern translozieren um dort die Genexpression seiner Zielgene anzuschalten. Dieser Kerntransport ist ein wichtiger Schritt in der Kontrolle der Proteinbiosynthese in eukaryontischen Zellen und bedarf einer Serie von fein choreographierten Protein-Protein Wechselwirkungen (Weis, 2003). Gerade als Antwort auf extrazelluläre Signale oder intrazelluläre Veränderungen, müssen viele Transkriptionsfaktoren, wie SREBPs, oder ihre Co-Faktoren in den Zellkern gelangen um die Expression ihrer Zielgene zu kontrollieren. Da SREB-Proteinen ein Standard-Erkennungssignal für den Kerntransport fehlt, wird der nukleäre Transport durch das Transportprotein Importin- $\beta$  vermittelt. Importin- $\beta$  Proteine binden ihre Ladung im Cytoplasma und können mit dem nuklearen Kernkomplex interagieren und durch diesen in den Zellkern gelangen (Alberts *et al.*, 2002). Für die Bindung von Importin- $\beta$  mit SREBP2 ist eine direkte Interaktion der SREBP2 bHLHZ-Domäne, welche sich im cytosolischen N-terminalen Teil befindet (Abbildung 1.4), mit Importin- $\beta$  von Nöten (Lee *et al.*, 2003). In Korrelation mit den Literaturdaten (Lee *et al.*, 2003) zeigte sich in den Lokalisationsstudien dieser Arbeit, dass der N-terminale SREBP2aa430 Teil in den Zellkern translozieren kann (Abbildung 3.28, Zeile 2; Abbildung 3.29, Zeile 5; Abbildung 3.30, Zeile 5). Diesem N-terminalen Teil von SREBP2 fehlt die C-terminale Domäne, die für die regulatorische Funktion und die ER-Membranverankerung zuständig ist. Sie besitzt aber die bHLHZ-Domäne, die für den Kerntransport essenziell ist (Lee *et al.*, 2003). Wie *in vivo* Studien in *Xenopus* zeigen wirkt auch die verkürzte Variante SREBP2aa430 als Transkriptionsfaktor (Abbildung 3.26), sodass davon ausgegangen werden kann, dass diese Proteinfunktion (Prozessierung und Regulierung) durch die Verkürzung relativ unbeeinflusst bleibt. Die Co-Transfektion von zwei *Xenopus*-SREBP2aa430 Konstrukten zeigte, dass beide Proteine im Zellkern lokalisiert werden konnten. Zusätzlich konnte Venusfluoreszenz nachgewiesen werden, was bedeutet, dass beide Proteine miteinander interagieren (Abbildung 3.29, Zeile 1). Diese Beobachtung deckt sich mit Daten von Nagoshi & Yoneda, 2001, welche beschreiben, dass der Kerntransport eine Dimerisierung von SREBP2 voraussetzt. Die Autoren beschreiben weiterhin, dass Importin- $\beta$  direkt mit der dimerisierten SREBP2 bHLHZ Region interagiert (Nagoshi & Yoneda, 2001; Nagoshi *et al.*, 1999). Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass der Kerntransport scheinbar auch nur mit einem intakten SREBP2aa430 erfolgen kann. Das zeigen die durchgeführten Co-Transfektionen in dieser Arbeit, bei denen SREBP2aa430 mit unterschiedlichen Konstrukten denen der Bereich der Importin- $\beta$  Bindung fehlte bzw. mutiert war, co-transfiziert wurde. Diese mutierten Konstrukte unterscheiden sich dahingehend, dass bei der verkürzten Variante SREBP2aa311 der bHLHZ-Bereich fehlt (Abbildung 3.29, A2) und bei der SREBP2aa430 $\Delta$ 331–356-Variante die Aminosäuren 331–356 im Bereich des HLH deletiert wurden (Abbildung 3.29, A1). Bei beiden Co-Transfektionen, konnte die Lokalisation sowie Interaktion im Zellkern nachgewiesen werden (Abbildung 3.29, Zeile 2 und 3; Abbildung 3.30, Zeile 2). Auch bei der Co-Transfektion von SREBP2aa430

mit SREBP2aa430 SSNT (Abbildung 3.30, A) konnte die Interaktion nachgewiesen werden (Abbildung 3.30, Zeile 4). Bei dem SREBP2aa430 SSNT-Konstrukt wurde bei dem Aminosäureaustausch darauf Bezug genommen, dass die Bindung von Importin- $\beta$  mit SREBP2 hauptsächlich durch hydrophobe Interaktionen vermittelt wird (Nagoshi *et al.*, 1999), die den entstehenden Bindungskomplex stabilisieren (Lee *et al.*, 2003). Dabei wurde von den vier ausgewählten Aminosäuren YYLV (Abbildung 3.30, A) die feste Bindung durch die aromatischen Ringe des Tyrosins verursacht (Lee *et al.*, 2003). Die Co-Transfektion von zwei deletierten SREBP2aa430 $\Delta$ 331–356-Varianten, die nicht im Zellkern nachgewiesen werden konnten (Abbildung 3.29, Zeile 4), bestätigten das SREBP2 nicht in der Lage ist in den Zellkern zu gelangen, sobald der Bereich der Importin- $\beta$  Bindung gestört ist. Abbildung 4.1 zeigt in einem Modell das Interaktionsverhalten unterschiedlicher SREBP2-Varianten.



**Abbildung 4.1: Modellhafte Darstellung des Interaktionsverhaltens unterschiedlicher SREBP2- Varianten und ihre Lokalisation in der Zelle.** Bei der Co-Transfektion von 1) zwei SREBPaa430-Wildtypen kommt es zur Dimerisierung und Interaktion (repräsentiert durch Venusfluoreszenz, grün) im Zellkern; 2) SREBP2aa430 mit SREBP2aa311, welches keine Importin- $\beta$  Region besitzt, kann durch den Wildtyp in den Kern transportiert werden; 3) SREBP2aa430 mit SREBP2aa430 $\Delta$ 331–356, dem die Aminosäuren 331–356 im Bereich des HLH deletiert wurden interagieren und zeigen Kernpräsenz; 4) SREBP2aa430 $\Delta$ 331–356 mit SREBP2aa430 SSNT, bei dem vier Aminosäuren im Bereich des Zipper ausgetauscht wurden, können nicht in den Zellkern translokieren und verbleiben im Cytoplasma; 5) zwei SREBP2aa430 $\Delta$ 331–356 können nicht in den Zellkern translokieren zeigen aber Interaktion im Cytoplasma.

Es konnte innerhalb dieser Studie gezeigt werden, dass beim *Xenopus*-SREBP2, die für den Kerntransport nötige Erkennung im Bereich des bHLHZ liegen muss. Zusätzlich konnte die Information gewonnen werden,

dass ein Wildtyp-Dimermolekül ausreicht um seinen in der bHLHZ-Region mutierten Dimerpartner mit in den Kern zu transportieren. Möglicherweise wird das in der bHLHZ-Region mutierte SREBP2-Protein durch einen zusätzlichen Interaktionsbereich mit dem ersten intakten Wildtyp-Protein, mit in den Kern transportiert.

#### 4.5.2 Lokalisierung und Dimerisierung von INSIG

Innerhalb dieser Studie sollte die Lokalisierung von *Xenopus*-INSIG Proteine in HeLa-Zellen gezeigt und beschrieben werden. In den ausgeführten Lokalisationsstudien konnte gezeigt werden, dass *Xenopus* INSIG1 und INSIG2 netzartig um den Zellkern lokalisiert sind. Diese retikuläre Expression findet man bei ER-assoziierten Proteinen (Abbildung 3.31), was auf eine ER-Assoziation- bzw. Integration der *Xenopus*-INSIG Proteine hindeutet. Dieses netzartige Expressionsmuster ist durch die Morphologie des ER erklärbar, welches mit seinem weit verzweigten Netzwerk aus Röhren und Zisternen das Cytoplasma durchspannt. Das bestätigen Arbeiten, die auch zeigten, dass die beiden INSIG Proteine die ER-Membran mit 6 Transmembranhelices durchspannen und somit tief im ER verankert vorliegen (Feramisco *et al.*, 2004; Goldstein *et al.*, 2006). In weiterführenden Experimenten dieser Arbeit, wurden die beiden INSIG-Proteine jeweils in Kombination miteinander oder INSIG1 bzw. INSIG2 doppelt transfiziert. Dabei zeigt sich erstaunlicherweise, dass sowohl INSIG1 mit INSIG1 (Abbildung 3.32, Zeile 2) als auch INSIG2 mit INSIG2 (Abbildung 3.32, Zeile 3) miteinander am ER interagieren, indem sie Homomere bilden. Auch die Co-Transfektion von INSIG1 mit INSIG2 zeigt Interaktion am ER (Abbildung 3.32, Zeile 4). Diese gewonnenen Daten konnten zusätzlich durch Immunpräzipitationsversuche bestärkt werden (Abbildung 3.33). Radhakrishnan postulierte 2007 erstmalig über eine Dimerisierung von INSIG2 in FOS-Choline13 Micellen (Radhakrishnan *et al.*, 2007). Bislang ist über den Grund der Zusammenlagerung der INSIG-Proteine wenig bekannt, es wird aber spekuliert, dass durch diese Bindung ein mutiertes inaktives INSIG mit seinem endogenen Äquivalent ein aktiven Komplex bilden kann, welcher die Sterin-induzierte Bindung an SCAP ermöglicht (Lee & DeBose-Boyd, 2010).

### 4.6 INSIG1 und INSIG2 Proteine sind in der Lage cholesterinabhängig auch die N-terminale Variante von SREBP2 am ER zurückzuhalten

Eine wichtige Fragestellung beschäftigte sich damit, ob sich *Xenopus*-SREBP2 bei Co-Transfektion mit den INSIGs in seiner Lokalisation wie das humane SREBP2 verhält. Zur Beantwortung wurden Co-Transfektionen mit HeLa-Zellen durchgeführt und die Lokalisation von SREBP2 in der Zelle beschrieben. Es zeigte sich, dass sich *Xenopus*-SREBP2 in seiner Lokalisation analog der humanen SREBP2-Form verhält. Diese Lokalisation ist mit der beschriebenen regulatorischen Funktion von SREBP im humanen System erklärbar (Brown & Goldstein, 1997). Vom Mensch ist bekannt, dass die Interaktion zwischen SREBP und INSIG das Bindeglied SCAP erfordert. Weiter ist in der Literatur beschrieben, dass dieser am ER liegende SREBP-SCAP Komplex sich durch die Interaktion des SREBP C-Terminus mit dem C-Terminus von SCAP bildet (Sakai *et al.*, 1997). Die Co-Immunfluoreszenz von *Xenopus*-SREBP2 mit INSIG2 bestätigte, dass auch bei den *Xenopus*-Varianten eine cholesterinabhängige Interaktion stattfinden muss, da SREBP2 außerhalb des Zellkerns lokalisiert werden konnte (Abbildung 3.34, Zeile 1). Befindet sich die Zelle hingegen unter cholesterinverarmten Bedingungen, kann der transkriptionsaktive Teil von SREBP in den Zellkern translozieren und ist demzufolge dort nachweisbar.

Neu zeigte sich die Co-Transfektion von den INSIGs mit der verkürzten N-terminalen *Xenopus*-Variante SREBP2aa430. In diesen Co-Transfektionen von SREBP2aa430 mit INSIG1 (Abbildung 3.34, Zeile 3) bzw. mit INSIG2 (Abbildung 3.34, Zeile 4) wurde SREBP2aa430 außerhalb des Zellkerns im Cytoplasma/ER lokalisiert. Vergleicht man die Lokalisation von den INSIGs mit SREBP2aa430 in diesen Zelltransfektions-

experimenten, dann zeigt SREBP2aa430 das gleiche netzartige Expressionsmuster wie die INSIG-Proteine, was für eine Lokalisation von SREBPaa430 am ER spricht (Abbildung 3.34). Das ist interessant, denn dieser kurzen SREBP2-Form fehlt der C-Terminus, welcher maßgeblich für die Interaktion mit SCAP zuständig ist (Sakai *et al.*, 1997). Mit der verkürzten Variante SREBP2aa311 bzw. SREBP2aa430, wäre somit die C-terminale Interaktion mit SCAP nicht mehr möglich.

Die aufgrund der beobachteten Effekte in den Zellokalisationsexperimenten durchgeführten Immunpräzipitationsversuche, bestätigten diese Beobachtungen. Auch hier wurde eine Komplexbildung der N-terminalen SREBP2-Variante mit den INSIGs festgestellt (Abbildung 3.35). Weiterhin zeigt sich, dass diese Interaktion cholesterinabhängig ist (Abbildung 3.35). Neu im Zusammenhang der cholesterinabhängigen Regulation ist die N-terminal vermittelte Interaktion von SREBP2 mit den INSIGs (Abbildung 3.35). Die Immunpräzipitationsexperimente unter niedrigen Cholesterinbedingungen wiesen eine schwächere Interaktion von INSIG1 mit SREBP2aa311 auf (Abbildung 3.35, Spalte 2), als unter hohen Cholesterinbedingungen (Abbildung 3.35, Spalte 1). Cholesterinreduzierte Bedingungen wurden durch die Kultivierung der Zellen in serumfreiem Medium erreicht. Diese reduzierten Bedingungen bewirken, dass die Zellen nicht mit ausreichend Cholesterin versorgt werden. Somit müssen sich die schnell wachsenden und teilenden HeLa-Zellen auf eine gesteigerte *de novo* Synthese umstellen. Daraus resultiert, dass SREBP um diesen Neubedarf an Cholesterin decken zu können, in den Zellkern transportiert wird, um dort als Transkriptionsfaktor Gene der Cholesterinbiosynthese anzuschalten. Das würde die verminderte Bindung von SREBP an INSIG erklären, welche als Retentionsfaktoren unter Sterin-induzierten Bedingungen für die Rückhaltung von SREBP am ER zuständig sind. Im Gegenzug konnte unter hohen Cholesterinbedingungen im Medium (mit FCS) eine verstärkte Bindung von SREBP an INSIG1 beobachtet werden.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die in den Immunpräzipitationsversuchen nachgewiesene Interaktion vermutlich nicht nur zwischen INSIG1 mit SREBP2aa311 abläuft (Abbildung 3.35), sondern auch eine Interaktion zwischen INSIG2 mit SREBP2aa311 stattfindet.

Die Interaktion konnte nicht nur für die Variante SREBP2aa430, sondern auch für SREBP2aa311 mit den INSIGs in Immunpräzipitationsversuchen nachgewiesen werden (Abbildung 3.35). Damit kann der Aminosäurebereich 311–430 von SREBP2, welcher auch die bHLHZ-Region beinhaltet, als Interaktionsdomäne ausgeschlossen werden.

Die in der Immunfluoreszenz und den Immunpräzipitationsversuchen beobachtete Interaktion von SREBP mit den INSIG Proteinen lässt bisher noch keine Aussage zu, ob es sich dabei um eine direkte oder indirekte Interaktion handelt. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit, dass SCAP als Bindeglied zwischen SREBP und INSIG dient recht groß, da die beobachtete N-terminal vermittelte Interaktion von SREBP2aa311/430 dem gleichen cholesterinabhängigen System folgt, wie für den Wildtyp von SREBP2 (gesamter Leserahmen) publiziert wurde (Brown & Goldstein, 1997).

Vor dieser Beobachtung wäre in zukünftigen Untersuchungen eine weitere Eingrenzung der N-terminalen Interaktionsdomäne interessant. Außerdem könnte versucht werden, weitere Interaktionspartner von SREBP zu identifizieren, beispielsweise mit Pulldown mit Immunpräzipitation, Massenspektrometrie, Gelfiltrationschromatografie zur Analyse der Komplexgrößen.

# Kapitel 5

## Zusammenfassung

Die Regulation der Cholesterinbiosynthese erfolgt in der Zelle über einen streng regulierten Feedbackmechanismus, der über das Zusammenspiel verschiedener Faktoren ermöglicht wird. Zwei wichtige Gruppen stellen dabei (a) die *sterol regulatory element binding proteins* (SREBPs) dar, die als Transkriptionsfaktoren die Sterolbiosynthese auf transkriptioneller Ebene steuern und (b) *insulin-induced genes* (INSIGs), die für die Rückhaltung von SREBPs am ER unter Sterol-induzierten Bedingungen zuständig sind. Bisherige Arbeiten haben in Zellkulturversuchen und an Modellorganismen wie Fadenwurm, Fruchtfliege sowie im Säugersystem die Regulation der Cholesterinbiosynthese erforscht, allerdings ist bisher wenig über die Rolle von den Komponenten des Regulationsprozesses während der Embryonalentwicklung bekannt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* als Modellorganismus ausgewählt, um die in dem Cholesterinregulationsprozess involvierten Faktoren SREBP2 sowie INSIG1 und INSIG2 aus entwicklungsbiologischer Sicht zu untersuchen und zu charakterisieren. Zeitliche Expressionsanalysen zeigten, dass alle drei Gene maternal exprimiert werden. Weiterhin wurden Transkripte während der Gastrulation, der späten Neurulation und der gesamten Organogenese nachgewiesen. Die räumliche Expression zeigte in der frühen Embryonalentwicklung eine ubiquitäre Verteilung in Blastulastadien. Mit fortschreitender Embryonalentwicklung wurden Expressionsterritorien im Neuralrohr sowie dem Bereich des präsumtiven Kopfes lokalisiert. Im adulten Frosch, wurde im Gegensatz zum Froschembryo, in allen untersuchten Organen und Geweben ein ubiquitäres Verteilungsmuster nachgewiesen.

Für Funktionsverluststudien, wurde die Protein-Expression durch die Injektion eines SREBP2 sowie für die INSIGs spezifischen *antisense* Oligonukleotid-Morpholinos inhibiert. Dabei zeigte sich, dass SREBP2 sowie INSIG1 und INSIG2 während der Induktion der Neurogenese (am Beispiel von XSox3) weder notwendig noch hinreichend sind. Mit fortschreitender Neurogenese hat der Funktionsverlust der drei untersuchten Gene schwerwiegende Folgen, wie die supprimierte Expression des Oligodendrozytenmarkers Olig3 und des neuronalen Differenzierungsmarkers N-Tubulin zeigte.

Bei Überexpression von SREBP2 reagierten die Embryonen sensitiv, was durch ein massives Absterben bemerkbar wurde. Die überlebenden Embryonen zeigten reduzierte Kopfstrukturen sowie gekrümmte Finnen zur injizierten Seite. Zur Klärung der Frage, durch welche zellulären Prozesse dieser Phänotyp verursacht wird, wurden Apoptose- und Proliferationsanalysen durchgeführt. Die Analysen ergaben vermehrte Apoptosevorgänge auf der SREBP2-injizierten Seite. Weitere SREBP2-Funktionsverluststudien mit den Markern En2 (Grenze Mittelhirn/Hinterhirn) und Krox20 (Hinterhirn) zeigten, dass die Gehirnentwicklung gestört ist.

Wie in der Literatur für andere Modellorganismen beschrieben, konnte auch im *Xenopus*-System festgestellt werden, dass SREBP2 als Transkriptionsaktivator fungiert. Auf dieser Erkenntnis aufbauend wurden durch animale Kappenexperimente mit anschließenden RT-PCR Analysen die putativen SREBP2 Zielgene INSIG1, LDLR und HMGCoAR gefunden. In weiterführenden Experimenten kann verifiziert werden, ob es sich dabei um direkte oder indirekte Zielgene von SREBP2 handelt.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit die subzelluläre Lokalisation als auch das Interaktionsverhalten der drei untersuchten Proteine in HeLa-Zelltransfektionsexperimenten untersucht. Alle *Xenopus*-Konstrukte konnten im menschlichen System exprimiert und prozessiert werden. In Einzeltransfektionen der *Xenopus*-INSIG Konstrukte konnte eine retikuläre Expression dieser Proteine am ER nachgewiesen werden. Weiterhin zeigen die BiFC-Immunfluoreszenz- sowie die Immunpräzipitationsversuche, dass *Xenopus*-INSIG-Proteine sowohl Homo-als auch Heteromere miteinander bilden können.

Die Einzeltransfektion von *Xenopus*-SREBP2 zeigte in den HeLa-Zellen eine Lokalisation sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern und verhielt sich somit wie für die humane Form beschrieben. Bei den verkürzten Varianten SREBP2aa311 und SREBP2aa430 konnte die Lokalisation ausschließlich im Zellkern nachgewiesen werden. Durch BiFC-Analysen konnte weiterhin gezeigt werden, dass SREBP2 Proteine miteinander interagieren. Dabei zeigte sich interessanterweise, dass für die in der Literatur beschriebene benötigte Dimerisierung für den Zellkerntransport nur ein SREBP2 (SREBP2aa430) eine funktionsfähige SREBP-SREBP-Interaktionsdomäne aufweisen muss. Dieses SREBP2aa430 kann seinen deletierten Partner mit in den Zellkern transportieren. Dies zeigten Daten mit drei verschiedenen in der HLHZ-Region mutierten SREBP2-Varianten.

Absolut neu stellen sich die Ergebnisse innerhalb der Immunfluoreszenzstudien bei Co-Transfektion von SREBP2aa430 und SREBP2aa311 mit INSIG1 oder INSIG2 dar. Hier zeigt sich erstaunlicherweise, obwohl dem eingesetzten SREBP2aa311 sowie dem SREBP2aa430 Konstrukt die in der Literatur beschriebene C-terminale Interaktionsdomäne für SCAP und somit auch für die INSIGs fehlt, eine Interaktion der Proteine. Diese Beobachtungen konnten in den darauf durchgeführten Immunpräzipitationsversuchen bestätigt werden. Außerdem zeigte sich, dass diese Interaktion abhängig vom zellulären Cholesteringehalt ist. Aufgrund der nachgewiesenen Interaktion zwischen SREBP2aa311 als auch SREBP2aa430 mit beiden INSIG-Proteinen, konnte dieser Bereich als Interaktionsdomäne ausgeschlossen werden.

# Anhang A

## Anhang

### A.1 Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

#### A.1.1 Darstellung der Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *Xenopus* SREBP2

```
N.: atg gaa aca tcg gga cta gag aac atg gag acg ctg acg gaa ctc Gga gat gag ctc act ctt ggg gat att gac gaa atg ctg cag ttt 90
AS.: M E T S G L E N M E T L T E L G D E L T L G D I D E M L Q F
Gtc agt aac cag gtg ggt gaa ttt cca gat ctc ttt gag gag cag Ctg tgc cag agt tat caa gga aat aat gca atg gac aca acg tta 180
V S N Q V G E F P D L F E E Q L C Q S Y Q G N N A M D T T L
Ccc aaa gct tat aac cag gca gct cag cag cca tat act act tca Gca cct cag cct cag ctc tta cct gta aaa gct cct ccg caa gcc 270
P K A Y N Q A A Q Q P Y T T S A P Q P Q L L P V K A P P Q A
Aca ccc cag aga act gca cct ctt ctc cag ccc aga ccc gtg gtt Cag act tct cct cag cct cag ctg caa caa cag aca gtg atg ctc 360
T P Q R T A P L L Q P R P V V Q T S P Q P Q L Q Q Q T V M L
Acc occ aat ttc agc acc gcc cca cag acc cga ata ata cag cag Cca ctc atc tat cag aat gct gct act aca agt ttt cag gtg ctg 450
T P N F S T A P Q T R I I Q Q P L I Y Q N A A T T S F Q V L
Caa cct cca gtt cag agt cta atg aca aca cag cag atg cag cct Gtc aca att cag cag caa gta cag aca gtt caa gcc cag aga gtt 540
Q P P V Q S L M T T Q Q M Q P V T I Q Q Q V Q T V Q A Q R V
Cta act caa gca gct aat ggt aca atc caa aca ctg acc cca gct Act gtt cag acg gtt acc cct cac gtc cag caa gtt cct gtg ctt 630
L T Q A A N G T I Q T L T P A T V Q T V T P H V Q Q V P V L
Gta cag ccg cag ata atc aaa acg gag tct ttg gtg ctt act gca Gtg aag gca gat ggc agc cct gtg atg acc gct gtg caa aat cca 720
V Q P Q I I K T E S L V L T A V K A D G S P V M T A V Q N P
Gct ata aca aca ctt gct ggt act tta cag aca acc gct ctc caa Gta cct acc ctt atg ggc agc aat gga act att ctt acc aca atg 810
A I T T L A G T L Q T T A L Q V P T L M G S N G T I L T T M
Cca gta atg atg gga caa gaa aac atg ccc ata aaa caa gta cca Gga agt ctt aag ctg gca gag gtg cct aag gaa ggt gag agg aga 900
P V M M G E K M P I K Q V P A T V K L A E V P K E G E R R
Aca aca cac aac ata ata gag aaa agg tac cgt tca tct atc aac Gac aaa att atg gag ctc aag gac ttg gtt atg ggc acg gac gcc 990
T T H N I I E K R Y R S S I N D K I M E L K D L V M G T D A
Aag atg cac aaa tca gga gtc ctg aag aag gcc att gat tat ata Aaa tac ttg caa caa gtc aac cag aaa ctg cgc cag gaa aac atg 1080
K M H K I D Y I K Y L K A I D Y I K Y L Q V N Q K L A E V P K E G E R R
Gct tta aaa cta gcc aat cag aaa aac aaa tac tta aaa ggt att Gat ctt agc agt ttg gtg gat aca agc att gga atg aag ata gat 1170
A L K L A N Q K N K Y L K G I D L S S L V D T S I G M K I D
Gaa ttc aat caa aac gcc ttg atg atg tct cct cca gca tct gat Tct ggt tcc cct gct gtg ttc tct cca tac tct gtg gat tct gaa 1260
E F N Q N A L M M S P P A S D S G S P A V F S P Y S V D S E
Cca ggg agc cct ttg tta gat gat gaa aag gta aaa gat gaa cca Gac tgc ccc aca gga ttg ggt atg atg gat cgc tca cgg atg ctt 1350
P G S P L L D D E K V K D E P T G L G M M D R S R M L
Ctc tgc acc atg aca ttc cta tgc tta tca ttc aac ccc ctg act Tct ctg tta cac cct gaa agt ggc cag tac tct gag aga gca gtg 1440
L C T M T F L C L S F N P L T S L L H P E S G Q Y S E R A V
Caa cat gga aca ggg aga acc atg ctt ggt gtt gaa atg tca ggt Ttt tat ggc agc tgg ttt gat tgg ctc ata ccc aca ata atc ctt 1530
Q H G T G R T M L G V E M S G F Y G S W F D W L I P T I I L
Tgg ctt gtt aat gga gtg att gtt ctc agc gtt ttc atg aaa cta Ctc atc cat gga gag cct gtg acc cgt cta cat tcc cgc tca tct 1620
W L V N G V I V L S V F M K L L I H G E P V T R L H S R S S
Gtc aaa ttc tgg aga cat cgc aag cag gca gat ttg gat ctt gct Aag ggg gat ttt ggt gca gca gcc ttg aac ttg cag aca tgc ttg 1710
V K F W R H R K Q A D L D L A K G D F G A A A L N L Q T C L
Tgt gtt ttg gga cgc tca tta cct gcc aca cgg cta gat cta gca Tgc agc ctt tcc tgg aac atc att cgg tgt agc ctg caa aag atc 1800
C V L Y R S L P A T R L D L A C S L S W N I I R C L N L A L C
Agc ctt gtc cgc tgg ttg cta aaa cac tgc cct ggg tac tgc aaa Aaa gct gag ttt cag gat gaa gca aca acc agt gca agg gat gct 1890
S L V R W L L K H S P G Y C K K A E F Q D E A T T S A R D A
Gct ctg gta tac cac aaa ctg cac caa ctg cat ctc aca ggg aag Ctg cca tct aat tgg aac tgt tca ggt ctc aac ctt gcc ctc tgt 1980
A L V Y H K L H T G A G L P S N W N C S G L N L A L C
Gct gta aac cta gcc gaa tgt gct ggc aac aag atc tca cca act Tta ctt gca gaa atc cac ctc aca aca gcc att caa atg aaa acc 2070
A V N L A E C A G N K I S P T L L A E I H L T T A I Q M K T
Agt ttc cca agt aga ttc cgc ttt ctc act gca tat ttc ctt ggg Tat gca caa aat gct tct tct gag gaa act ctt ccg gac ccc atg 2160
S F P S R F R F L T A Y F L G Y A Q N A S S E E T L P D P M
```

Cga	tgg	ctt	gca	cat	cct	ttg	gga	aaa	tac	ttt	ttc	atc	aat	tct	Aac	tgg	gct	ctg	aag	agt	gcg	gcg	aaa	gac	tct	ctt	tat	acc	tct	2250
R	W	L	A	H	P	L	G	K	Y	F	F	I	N	S	N	W	A	L	K	S	A	A	K	D	S	L	Y	T	S	
Aca	aga	aac	cca	gcc	aat	cca	gtt	aca	cag	att	cat	ogt	gct	ttt	Tgt	gag	tct	ctg	ctg	gaa	aaa	gca	atg	tac	acc	atg	gca	aaa	cca	2340
T	R	N	P	A	N	P	V	T	Q	I	H	R	A	F	C	E	S	L	L	E	K	A	M	Y	T	M	A	K	P	
Gaa	acc	agt	aaa	gca	gcc	tct	gaa	gaa	gaa	agt	tgt	gag	ttt	tcc	Aga	gct	caa	gaa	tat	ttg	aaa	ctt	ctt	agt	ggg	ttt	gca	gat	tca	2430
E	T	S	K	A	A	S	E	E	E	S	C	E	F	S	R	A	Q	E	Y	L	K	L	S	G	F	A	D	S		
Gtt	gga	aac	ggt	gcc	tct	ctt	ccc	ctc	ggt	gga	tct	tcc	ccc	atg	Tct	tct	gca	gat	cct	att	tgt	ogt	tgg	tgg	tac	tct	gta	tct	tcc	2520
V	G	N	V	A	S	L	P	L	G	G	S	S	P	M	S	S	A	D	P	I	C	R	W	W	Y	S	V	S	S	
Atg	gct	att	ggt	tgg	tta	caa	ggg	gac	gac	tct	gtg	gtg	aag	tcc	Cac	ttt	gca	gaa	gta	gaa	aga	att	cct	aag	ctc	ctt	gac	tct	gat	2610
M	A	I	Q	W	L	S	D	D	A	S	V	V	K	R	C	F	A	E	V	E	R	I	P	K	L	L	S	D		
Aac	cct	ctg	gtg	aaa	gca	gtg	atc	cat	atg	tgc	aga	gcc	atg	caa	Gca	gct	gta	ctt	ggc	aaa	tgt	gat	ggc	cag	cag	aac	tca	ttc	tat	2700
N	P	L	V	K	A	V	I	H	M	C	R	A	M	Q	A	A	V	L	G	K	C	D	G	Q	Q	N	S	F	Y	
Cac	tgt	gag	aaa	gcc	agc	gca	ttc	ttg	tgg	aac	agt	ctt	aat	ata	Agc	agc	acc	ggc	aac	aca	aat	ctc	aac	aag	gtg	gtg	cag	ctt	tta	2790
H	C	E	K	A	S	A	F	L	W	N	S	L	N	I	S	S	T	G	N	T	N	L	N	K	V	V	Q	L	L	
att	tgc	gac	ctt	ctg	ctt	tca	ttg	cgc	act	tcc	tta	tgg	cag	aaa	cag	tcc	tcc	agt	cca	gca	gcc	gga	gat	tct	att	cat	gcc	ccc	act	2880
I	C	D	L	L	S	L	R	T	S	L	W	Q	K	Q	S	S	S	P	A	A	G	D	S	I	H	A	P	T		
cct	gcc	cta	aca	gga	ttc	cag	cgt	gat	ctc	agc	agc	cta	cgt	ogt	ttg	tct	ctg	acc	ttt	aaa	cct	gcc	cac	tgc	aag	ctc	ttc	ctc	cat	2970
P	A	L	T	G	F	Q	R	D	L	S	S	L	R	R	L	S	L	T	F	K	P	A	H	C	K	L	F	L	H	
gaa	gcc	aca	gta	cga	ttg	atg	gcc	gat	gct	agt	cca	act	cgt	aca	cat	caa	ctt	ctg	caa	cac	agc	cta	caa	aaa	tgc	acc	gca	ctt	gca	3060
E	A	T	V	R	L	M	A	D	A	S	P	T	R	T	H	Q	L	A	E	V	E	R	K	C	T	A	L	A		
aat	aaa	caa	ggt	gat	ctg	gac	tcg	tta	cct	ggg	cag	gag	aga	gct	aca	gca	att	ctc	ctg	gcc	tgc	cga	cac	cta	cca	ctt	tca	ttt	3150	
N	K	Q	G	D	L	D	S	L	P	G	Q	R	E	R	A	T	A	I	L	L	A	C	R	H	L	P	L	S	F	
ctg	tca	tcc	cct	ggg	cag	aga	gcc	atc	atg	ctt	gct	gaa	gct	gcc	cga	acg	ctt	gag	aaa	gtg	ggt	gac	cgt	cgt	tct	tac	cac	gat	tgc	3240
L	S	S	P	G	Q	R	A	I	M	L	A	E	A	A	R	T	L	E	K	V	G	D	R	R	S	Y	H	D	C	
cag	caa	atg	atg	gtg	aag	ttg	agc	ggt	ggc	act	gct	atg	gca	gcc	tcc	tga													3291	
Q	Q	M	M	V	K	L	S	G	G	T	A	M	A	A	S	*														

**Abbildung A.1:** Nukleotid- und Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens von *Xenopus* SREBP2 Die aus der Nukleotidsequenz (N) abgeleitete Aminosäuresequenz ist jeweils unterhalb der einzelnen Nukleotidsequenz-Zeile dargestellt. Die Zahlen am Ende jeder Zeile geben die Position (Pos.) des jeweils letzten Nukleotids des betreffenden Triplets an. In grün ist das Startcodon angegeben. Das Stopcodon ist rot dargestellt.

### A.1.2 Darstellung der Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *Xenopus* INSIG1

N.:	atg	caa	acg	cta	gag	gag	cac	tgc	tgg	agt	tgc	tct	tgc	acc	cga	gga	aga	gac	aag	aag	ggc	aca	aag	gtc	agc	gcc	tgg	cta	gcc	cga	90
AS.:	M	Q	T	L	E	E	H	C	W	S	C	S	C	T	R	G	R	D	K	K	K	G	T	K	V	S	A	W	L	A	
aga	gtt	gga	aaa	gcc	atg	tcc	tcc	tta	aac	tct	ctc	ctc	agt	ctg	gcc	tac	agc	aca	cta	gcc	agc	agt	gaa	ggt	cgt	agc	ctt	atc	cag	180	
R	V	G	K	A	M	S	L	N	S	L	L	S	L	A	Y	S	T	L	A	S	S	E	G	R	S	L	I	Q			
aga	agc	ctg	gta	ctc	ttt	acc	gtg	ggt	ggt	ttc	ctt	gca	ctg	gta	Ctc	aat	cta	ctt	cag	atc	caa	agg	aac	gtg	act	ctg	ttt	cca	gag	270	
R	S	L	V	L	F	T	V	G	V	F	L	A	L	V	L	N	L	L	Q	I	Q	R	N	V	T	L	F	P	E		
gaa	gtc	atc	gcc	acc	ata	ttt	tcc	tcg	gct	tgg	tgg	gtc	ccc	cca	tgt	tgt	gga	act	gca	gct	gct	ggt	gta	ggg	ctg	ctg	tat	ccc	tgc	360	
E	V	I	A	T	I	F	S	S	A	W	W	V	P	P	C	C	G	T	A	A	A	V	V	G	L	L	Y	P	C		
atc	gac	agc	cgt	att	gga	gaa	cca	cat	aaa	ttc	aag	cga	gaa	tgg	gcc	agc	gtg	atg	agg	tgc	ata	gcc	gtc	ttt	ggt	gga	atc	aac	cat	450	
I	D	S	R	I	G	E	P	H	K	F	K	R	E	W	A	S	V	M	R	C	I	A	V	F	V	G	I	N	H		
gcg	agt	gct	aaa	ctt	gat	ttt	gcc	aat	aac	gtc	cag	ctg	tct	tta	aca	cta	gca	gcc	ttg	tct	ttg	gga	ctg	tgg	tgg	acc	ttc	gat	cgt	540	
A	S	A	K	L	D	F	A	N	N	V	Q	L	S	L	T	L	A	A	L	S	L	G	L	W	W	T	F	D	R		
tcc	aga	agt	ggt	ctg	ggc	ctt	gga	att	act	atc	gcc	ttt	ctc	gcc	act	ctt	ata	acg	cag	ttt	ctt	gtc	tac	aat	ggc	gta	tac	cag	tac	630	
S	R	S	G	L	G	L	G	I	T	I	A	F	L	A	T	L	I	T	Q	F	L	V	Y	N	G	V	Y	Q	Y		
acc	tca	cca	gac	ttc	cta	tac	att	cga	tct	tgg	ctc	cct	tgt	atc	ttt	tct	gga	gga	gta	act	gtc	ggc	aac	ata	gga	aga	caa	tta	720		
T	S	P	D	F	L	Y	I	R	S	W	L	P	C	I	F	F	S	G	G	V	T	V	G	N	I	G	R	Q	L		
gca	atg	ggt	tct	tca	gaa	aag	aca	cac	ggc	gac	taa																		756		
A	M	G	S	S	E	K	T	H	G	D	*																				

**Abbildung A.2:** Nukleotid- und Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens von *Xenopus* INSIG1. Die aus der Nukleotidsequenz (N) abgeleitete Aminosäuresequenz ist jeweils unterhalb der einzelnen Nukleotidsequenz-Zeile dargestellt. Die Zahlen geben die Position (Pos.) des jeweils letzten Nukleotids des betreffenden Triplets an. In grün ist das Startcodon angegeben. Das Stopcodon ist rot dargestellt.

### A.1.3 Darstellung der Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *Xenopus* INSIG2

N.:	atg	ggc	gac	aga	gag	aat	gta	tca	tac	gga	tct	cgg	cgg	atc	cta	gcc	cag	aag	atg	aac	ctt	cta	ctc	cga	ggg	ttt	ctc	ctc	ttc	ctc	90
AS.:	M	G	D	R	E	N	V	S	Y	G	S	R	P	I	L	A	Q	K	M	N	L	L	L	R	G	F	L	L	F	L	
	att	ggg	gtc	ttc	ctg	gct	ttg	gtg	ttg	aac	ttg	ctg	cag	gtg	cag	agg	aat	gtc	acc	cta	ttt	ccc	cca	gat	gtg	ctt	tcc	agt	ctc	ttc	180
	I	G	V	F	L	A	L	V	L	N	L	L	Q	V	Q	R	N	V	T	L	F	P	P	D	V	L	S	S	L	F	
	tct	tcg	gct	tgg	tgg	gtg	cca	ctg	tgt	tgt	ggc	acg	gct	gcg	gcg	Gct	att	gga	ctc	ctg	tac	ccc	tgc	atc	gac	agg	cac	ctt	ggc	gag	270
	S	S	A	W	W	V	P	L	C	C	G	T	A	A	A	A	I	G	L	L	Y	P	C	I	D	R	H	L	G	E	
	cca	cac	aag	ttt	aag	agg	gag	tgg	tca	agt	gtc	atg	cgt	tgt	gtg	gca	gtg	ttt	gta	ggc	ata	aat	cat	gcc	agc	gca	aaa	gtg	gac	ttt	360
	P	H	K	F	K	R	E	W	S	S	V	M	R	C	V	A	V	F	V	G	I	N	H	A	S	A	K	V	D	F	
	gcc	aac	aac	atg	cag	ctc	tcg	ctc	acc	ctg	gct	gct	ctt	tcg	att	ggc	ctg	tgg	tgg	aca	ttt	gac	cgg	tct	cgg	agt	ggc	cta	ggg	ctt	450
	A	N	N	M	Q	L	S	L	T	L	A	A	L	S	I	G	L	W	W	T	F	D	R	S	R	S	G	L	G	L	
	gga	att	gga	att	tcc	ttt	ttt	gct	acg	ctc	gtc	tct	cag	ctt	ctg	gtg	tat	aat	gga	gtg	tat	gaa	tac	act	gct	cca	gat	ttc	ctt	tat	540
	G	I	G	I	S	F	F	A	T	L	V	S	Q	L	L	V	Y	N	G	V	Y	E	Y	T	A	P	D	F	L	Y	
	gtg	cgt	tct	tgg	ctt	cca	tgc	ata	ttc	ttt	gct	ggg	gga	att	act	atg	gga	aat	att	ggt	cga	cag	ctg	gaa	atg	tac	gag	cga	aag	gcc	630
	V	R	S	W	L	P	C	I	F	F	A	G	G	I	T	M	G	N	I	G	R	Q	L	E	M	Y	E	R	K	A	
	ctt	gta	gag	aaa	tca	cac	cgg	gat	tga																					657	
	L	V	E	K	S	H	R	D	*																						

**Abbildung A.3:** Nukleotid- und Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens von *Xenopus* INSIG2. Die aus der Nukleotidsequenz (N) abgeleitete Aminosäuresequenz ist jeweils unterhalb der einzelnen Nukleotidsequenz-Zeile dargestellt. Die Zahlen geben die Position (Pos.) des jeweils letzten Nukleotids des betreffenden Triplets an. In grün ist das Startcodon angegeben. Das Stopcodon ist rot dargestellt.

## A.2 Verwendete Konstrukte

**Tabelle A.1:** Liste der Konstrukte für whole mount *in situ* Hybridisierung; <sup>1</sup>Klisch *et al.*, 2006; <sup>2</sup>Wu *et al.*, 2009.

Konstrukte	Restriktions-enzym	RNA-Polymerase
Delta1 <sup>1</sup>	XhoI	T7
Delta2 <sup>1</sup>	SphI	Sp6
Notch-ICD <sup>1</sup>	ClaI	Sp6
N-Tubulin	BamHI	T3
Olig3	EcoRI	T7
Pax6	NotI	T7
Six3	NotI	T7
Sox3	BamHI	T7
Xngnr1	BamHI	T3
Xbra	BglII	T7
Rx1 <sup>2</sup>	XhoI	Sp6
En2 <sup>2</sup>	XbaI	T3
Krox20 <sup>2</sup>	EcoRI	T7

**Tabelle A.2:** Liste der pCS2+ Plasmide, V = Vektor; I = Insert; \* = Stilllegung interne EcoRI-site Pos. 1171; <sup>1</sup>Wu *et al.*, 2009.

Konstrukte	PCR-Primer	Ausgangs-plasmid	Ligation über Schnittstellen 5' und 3'
SREBP2-GR	1 und 2	Rx3-L-GR-4 (V) und 9D5 (I)	XbaI/XhoI
SREBP2-VP16-GR		9E5 (V) und 9D5 (I)	EcoRI/XhoI
SREBP2-EngR-GR	3 und 4	16C4 (V) und B12C7 (I)	XhoI
SREBP2aa1-430	5 und 6	16C7 (V) und 6H7 (I)	EcoRI/XhoI,*
SREBP2aa9-430	7 und 6	16C7 (V) und 6H7 (I)	EcoRI/XhoI,*
Myc-SREBP2aa430	5 und 6	16C8 (V) und 6H7 (I)	EcoRI/XhoI,*
Myc-SREBP2aa311	29 und 30	12E7	EcoRI/XhoI,*
5'UTR-INSIG1-myc	8 und 9	16C8 (V) und 2G7 (I)	BamHI/BamHI
Myc-INSIG1	10 und 11	16C8 (V) und 2G7 (I)	EcoRI/XhoI
Myc-INSIG2	12 und 13	16C8 (V) und	EcoRI/XhoI

Myc-SREBP2aa430 SSNT NLS-SREBP2aa430 SSNT NLS-SREBP2aa430 pCS2+ Myc-pCS2+ NLS-pCS2+ Rx3-L-EngR9 <sup>1</sup> Rx3m-Vp16-GRm <sup>1</sup> Rx3-L-GR-4 <sup>1</sup>	14 und 15 5 und 6	INSIG2-pCMVSPORT6 (I) 16C7 (V) und 15F4 (I) 9D6 16B2 (V) und 6H7 (I) 16C7 16C8 16B2	EcoRI/XhoI,* * EcoRI/XhoI,*
---	----------------------	---	-----------------------------------

**Tabelle A.3:** Liste der pCMV-Sport6 Plasmide, V = Vektor; I = Insert.

Konstrukte	Ausgangs-plasmid	Ligation über Schnittstellen 5' und 3'
SREBP2aa1096 INSIG2-eGFP INSIG1	6H7 2G7 (V) und 15C2 (I) 2G7	EcoRI/NotI

**Tabelle A.4:** Liste der eGFP Plasmide, V = Vektor; I = Insert.

Konstrukte	PCR-Primer	Ausgangs-plasmid	Ligation über Schnittstellen 5' und 3'
INSIG2-eGFP peGFP-N	12 und 16	16D4 (V) und INSIG2-pCMVSPORT6 (I) 16D4	EcoRI/BamHI

**Tabelle A.5:** Liste der Cherry Plasmide, V = Vektor; I = Insert.

Konstrukte	PCR-Primer	Ausgangs-plasmid	Ligation über Schnittstellen 5' und 3'
Calnexin SREBP2aa1096 pCherry-N	17 und 18 19 und 20	16D2 (V) und XL-cDNA St. 35 16D2 (V) und 6H7 (I) 16D2	EcoRI/BamHI BamHI/XhoI

**Tabelle A.6:** Liste der pVenus-Transfektionsplasmide, V = Vektor; I = Insert; <sup>1</sup>Weidemann *et al.*, 2011.

Konstrukte	PCR-Primer	Ausgangs-plasmid	Ligation über Schnittstellen 5' und 3'
Venus1-GNE <sup>1</sup> Venus2-GNE <sup>1</sup> Venus1-SREBP2aa430Δ331-356 Venus2-SREBP2aa430Δ331-356 Venus1-SREBP2aa311	1.PCR: 19 und 21 2.PCR: 22 und 23 1.PCR: 19 und 21 2.PCR: 22 und 23 19 und 24	16D6 (V) und 6H7 (I) 16D8 und 6H7 6D7 (V) und 6H7 (I) 16D6 (V) und 2G7 (I) 16D8 (V) und	XhoI/BamHI,* XhoI/BamHI,* XhoI/BamHI,* EcoRI/BamHI EcoRI/BamHI

pVenus1-C <sup>1</sup>	INSIG2-pCMV-Sport6 (I)
pVenus2-C <sup>1</sup>	16D6
	16D8

### A.3 Primer

Tabelle A.7: Liste der generellen Oligonukleotide

Nr.	Sequenz der Primer in 5' → 3' Richtung
1	GGCCGCTCGAGAATCCTGGTAACAAAAC
2	GCTCTAGATCACTTTTGATGAAACAGAAGT
3	CCGCTCGAGGCCCTGGAGGATCGC
4	CCGCTCGAGCAGGGATCCCAGAGCAGA
5	CCGAATTCAATGGAAACATCGGGACTAGAG
6	CCCTCGAGCTTTTCATCATCTAACAAAGG
7	CCGAATTCAATGGAGACGCTGACGGAACTC
8	CGGGATCCATGCAAACGCTAGAGGAGCAC
9	CGGGATCCGTCGCCGTGTGTCTTTTCTG
10	CCGAATTCAATGCAAACGCTAGAGGAGCACTGCTGGAGTTGC
11	CCGCTCGAGTTAGTCGCCGTGTGTCTTTTCTGAAGAACCCATTGC
12	CCGAATTCAATGGGCGACAGAGAGAATGTATCATAACGGATCTCGGCCG
13	CCGCTCGAGTCAATCCCGGTGTGATTTCTCTACAAGGGCCTTTCGC
14	GAAGGCCATTGATTCTATAAAATCCTTGCAACAAGTCAACC
15	GGTTGACTTGTGCAAGGATTTTATAGAATCAATGGCCTTC
16	CGGGATCCCGATCCCGGTGTGATTTCTCTACAAGGGCC
17	CCGAATTCATGGATCTGAAATGCTTTCTGTTAGTGACTCTTCTGGTGC
18	CGGGATCCATCTCTTCGAAGTTTTTCGATTTCTTGAGATCTGTTTATAATTCATCCTCC
19	CCGCTCGAGGATGGAAACATCGGGACTAGAG
20	CGGGATCCGGAGGCTGCCATAGCAGTG
21	CTGATTGGCTAGTTTTAAAGCCATGTTTTCTGGGCGTCCGTGCCATAACCAAGTCCTTGAGC
22	GCTCAAGGACTTGGTTATGGGCACGGACGCCAGGAAACATGGCTTTAAACTAGCCAATCAG
23	CGGGATCCCTTTTCATCATCTAACAAAGGGCTCCC
24	CGGGATCCACGGTACCTTTTCTCTATTATGTTGTGTG
25	CCGAATTCCAAACGCTAGAGGAGCACTGCTGGAG
26	CGGGATCCGTCGCCGTGTGTCTTTTCTGAAGAACCC
27	CCGAATTCGGCGACAGAGAGAATGTATCATAACGGATCTC
28	CGGGATCCATCCCGGTGTGATTTCTCTACAAGGGCC
29	GAGAAAAGGTACCGTTAATCTATCAACGAC
30	GTCGTTGATAGATTAACGGTACCTTTTCTC

Tabelle A.8: Liste der RT-PCR Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz der Primer in 5' → 3' Richtung
X-HMGR-1594-F	TGCCAAACACATCCCAGCC
X-HMGR-1594-R	AACCGGTCCACGAGTCATCC
H4-F	CGGGATAACATTCAAGGTATCACT
H4-R	ATCCATGGCGGTAACGTCTTCTCCT
X-INSIG1-R	ATCGAAGGTCCACCACAGTC
X-INSIG1-F	GTGGGTGTTTTCTTGCCTTGC
X-INSIG2-F	TTTGCTACGCTCGTCTCTCA
X-INSIG2-R	CGCTTCTCCAGCTCTCTGTT
X-LDLR-F	CTGGGGACAGACATGAGGAAC
X-LDLR-R	GGATCGGGCACTTTCAACTAC
ODC1-F	GCCATTGTGAAGACTCTCTCCATTC
ODC1-R	TTCGGGTGATTCTT
X-Sox3-F	GCGCACATGAACGGCTGGACTA
X-Sox3-R	GTGTGGGAGGTGATGGCTGGAG

X-SREBP2-F	TGCTGGCAACAAGATCTCAC
X-SREBP2-R	TGCCATGGTGTACATTGCTT
Xbra-F	GGATCGTTATCACCTCTG
Xbra-R	GTGTAGTCTGTAGCAGCA

*Antisense* Morpholinos wurden über die Firma Gene-Tools geordert und zu einer Stammlösung von 1 mM in H<sub>2</sub>O verdünnt.

**Tabelle A.9:** Liste der Oligonukleotide für Morpholinos

<b>Morpholino</b>	<b>Sequenz der Oligonukleotide in 5' → 3' Richtung</b>
Standard-MØ (Stand.-MØ)	CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA
SREBP2-MØ	TGTTCTCTAGTCCCGATGTTCCAT
INSIG1-MØ	ATTTGTTTACGACTGTATGGAACCA
INSIG2-MØ	ATGATACATTCTCTCTGTCGCCAT

# Literaturverzeichnis

- Adams CM, Goldstein JL & Brown MS** (2003). Cholesterol-induced conformational change in SCAP enhanced by Insig proteins and mimicked by cationic amphiphiles. *Proc Natl Acad Sci USA*. **100**: 10647-10652.
- Ahmed N, Howard L & Woodland HR** (2004). Early endodermal expression of the *Xenopus* Endodermin gene is driven by regulatory sequences containing essential Sox protein-binding elements. *Differentiation*. **72**: 171-184.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Peter Walter** (2002). *Molecular Biology of the Cell, 4th edition New York*: Garland Science.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res O'Reilly & Associates*. **25**: 3389-3402.
- Attie AD** (2004). Insig: a significant integrator of nutrient and hormonal signals. *J Clin Invest*. **113**: 1112-1114.
- Bagnat M, Keränen S, Shevchenko A, Shevchenko A & Simons K** (2000). Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*. **97**: 3254-3259.
- Beatus P & Lendahl U** (1998). Notch and neurogenesis. *J Neurosci Res*. **54**: 125-136.
- Belknap WM & Dietschy JM** (1988). Sterol synthesis and low density lipoprotein clearance *in vivo* in the pregnant rat, placenta and fetus. Sources for tissue cholesterol during fetal development. *J Clin Invest*. **82**: 2077-2085.
- Bertrand N, Castro DS, & Guillemot F** (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci*. **3**: 517-530.
- Briggs MR, Yokoyama C, Wang X, Brown MS & Goldstein JL** (1993). Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. *J Biol Chem*. **268**: 14490-14496.
- Bronchain OJ, Pollet N, Ymlahi-Ouazzani Q, Dhorne-Pollet S, Helbling, JC, Lecarpentier JE, Percheron K & Wegnez M** (2007). The olig family: phylogenetic analysis and early gene expression in *Xenopus tropicalis*. *Dev Genes Evol*. **217**: 485-497.
- Brown MS & Goldstein JL** (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. **89**: 331-340.
- Brown MS & Goldstein JL** (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci USA*. **96**: 11041-11048.

- Brown AJ, Sun L, Feramisco JD, Brown MS & Goldstein JL** (2002). Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism. *Mol Cell*. **10**: 237-245.
- Belknap WM & Dietschy JM** (1988). Sterol synthesis and low density lipoprotein clearance *in vivo* in the pregnant rat, placenta, and fetus. Sources for tissue cholesterol during fetal development. *J Clin Invest*. **82**: 2077-2085.
- Bylund M, Andersson E, Novitsch BG & Muhr J** (2003). Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci*. **6**: 1162-1168.
- Cavender CP, Turley SD & Dietschy JM** (1995). Sterol metabolism in fetal, newborn, and suckled lambs and their response to cholesterol after weaning. *Am J Physiol*. **269**: 331-340.
- Carr BR & Simpson ER** (1984). Cholesterol synthesis by human fetal hepatocytes: effect of lipoproteins. *Am J Obstet Gynecol*. **150**: 551-557.
- Chang TY, Chang CC, Ohgami N & Yamauchi Y** (2006). Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **22**: 129-157.
- Chen TS, & Salen G** (1994). Defective cholesterol biosynthesis associated with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *N Eng J Med*. **330**: 107-113.
- Chen G, Liang G, Ou J, Goldstein JL & Brown MS** (2004). Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci USA*. **101**: 11245-11250.
- Chen Y, Hollemann T, Pieler T & Grunz H** (2000). Planar signalling is not sufficient to generate a specific anterior/posterior neural pattern in pseudoexogastrula explants from *Xenopus* and *Triturus*. *Mech Dev*. **1**: 53-63.
- Chitnis A, Henrique D, Lewis J, Ish-Horowicz D & Kintner C** (1995). Primary neurogenesis in *Xenopus* embryos regulated by a homologue of the *Drosophila* neurogenic gene Delta. *Nature*. **375**: 761-766.
- Chitnis A & Kintner C** (1996). Sensitivity of proneural genes to lateral inhibition affects the pattern of primary neurons in *Xenopus* embryos. *Development*. **122**: 2295-2301.
- Cleaver O, Seufert DW, Krieg PA** (2000). Endoderm patterning by the notochord: development of the hypochord in *Xenopus*. *Development*. **127**: 869-879.
- Koide T, Hayata T & Cho KW** (2006). Negative regulation of Hedgehog signaling by the cholesterol-genic enzyme 7-dehydrocholesterol reductase. *Development*. **12**: 2395-2405.
- Coffman C, Harris W & Kintner C** (1990). Xotch, the *Xenopus* homolog of *Drosophila* Notch. *Science*. **249**: 1438-1441.
- Cooper MK, Wassif CA & Krakowiak PA** (2003). A defective response to Hedgehog signaling in disorders of cholesterol biosynthesis. *Nature Genetics*. **33**: 508-513.
- Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ & Korach KS** (1999). Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science*. **286**: 2328-2331.
- Cuthbert JA & Lipsky PE** (1987). Regulation of lymphocyte proliferation by cholesterol: the role of endogenous sterol metabolism and low density lipoprotein receptors. *Int J Tissue React*. **9**: 447-457.

- DeBose-Boyd RA, Brown MS, Li WP, Nohturfft A, Goldstein JL & Espenshade PJ** (1999). Transport-dependent proteolysis of SREBP: Relocation of Site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi. *Cell*. **99**: 703-712.
- Delaune E, Lemaire P & Kodjabachian L** (2005). Neural induction in *Xenopus* requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. *Development*. **2**: 299-310.
- De Robertis EM, Larrain J, Oelgeschlager M & Wessely O** (2000). The establishment of Spemann's organizer and patterning of the vertebrate embryo. *Nat Rev Genet*. **1**: 171-181.
- De Robertis EM & Kuroda K** (2004). Dorsal-Ventral Patterning and Neural Induction in *Xenopus* Embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **20**: 285-308.
- Dettmer U, Folkerts M, Kächler E & Sönnichsen A** (2005). Intensivkurs Biochemie. *Elsevier 1. Auflage*: 417.
- Dietschy JM, Turley SD & Spady DK** (1993). Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res*. **10**: 1637-59.
- Dietschy JM & Turley SD** (2001). Cholesterol metabolism in the brain. *J Lipid Res*. **12**: 105-112.
- Dietschy JM & Turley SD** (2004). Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res*. **45**: 1375-1397.
- Dobrosotskaya IY, Seegmiller AC, Brown MS, Goldstein JL & Rawson RB** (2002). Regulation of SREBP processing and membrane lipid production by phospholipids in *Drosophila*. *Science*. **296**: 879-883.
- Dobrosotskaya IY, Goldstein JL, Brown MS & Rawson RB** (2003). Reconstitution of sterol-regulated endoplasmic reticulum-to-Golgi transport of SREBP-2 in insect cells by co-expression of mammalian SCAP and Insigs. *J Biol Chem*. **278**: 35837-35843.
- Duncan EA, Brown MS, Goldstein JL & Sakai J** (1997). Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a leu-Ser bond in the luminal loop of sterol regulatory element-binding protein-2. *J Biol Chem*. **272**: 12778-12785.
- Edmond J, Korsak RA, Morrow JW, Torok-Both G & Catlin DH** (1991). Dietary cholesterol and the origin of cholesterol in the brain of developing rats. *J Nutr*. **121**: 1323-1330.
- Engelking LJ, Evers BM, Richardson JA, Goldstein JL, Brown MS & Liang G** (2006). Severe facial clefting in *Insig*-deficient mouse embryos caused by sterol accumulation and reversed by lovastatin. *J Clin Invest*. **116**: 2356-2365.
- Espenshade PJ, Cheng D, Goldstein JL & Brown MS** (1999). Autocatalytic processing of site-1 protease removes propeptide and permits cleavage of sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem*. **274**:22795-22804.
- Espenshade PJ, Li WP & Yabe D** (2002). Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER. *Proc Natl Acad Sci USA*. 11694-11699.
- Espenshade PJ & Hughes AL** (2007). Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet*. **41**: 401-427.
- Farese RV, Ruland SL, Flynn LM, Stokowski RP & Young SG** (1995). Knockout of the mouse apolipoprotein B gene results in embryonic lethality in homozygotes and protection against diet-induced hypercholesterolemia in heterozygotes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1774-1778.

- Feramisco JD, Goldstein JL & Brown MS** (2004). Membrane topology of human insig-1, a protein regulator of lipid synthesis. *J Biol Chem.* **279**: 8487-8496.
- Fernández C, Martin M, Gómez-Coronado D & Lasunción MA** (2005). Effects of distal cholesterol biosynthesis inhibitors on cell proliferation and cell cycle progression. *J Lipid Res.* **46**: 920-929.
- Fielding CJ, Bist A, Fielding PE** (1997). Caveolin mRNA levels are up-regulated by free cholesterol and down-regulated by oxysterols in fibroblast monolayers. *Proc Natl Acad Sci USA.* **8**: 3753-3758.
- Fielding CJ & Fielding PE** (2004). Membrane cholesterol and the regulation of signal transduction. *Biochem Soc Trans.* **32**: 65-69.
- Fleming A, Keynes R & Tannahill D** (2004). A central role for the notochord in vertebral patterning. *Development.* **131**: 873-880.
- Frank PG, Cheung MW, Pavlides S, Llaverias G, Park DS & Lisanti MP** (2006). Caveolin-1 and regulation of cellular cholesterol homeostasis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2**: 677-686.
- Fukata Y & Fukata M** (2010). Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* **11**: 161-175.
- Funfschilling U, Jockusch WJ, Sivakumar N, Mobius W, Corthals K, Li S, Quintes S, Kim Y, Schaap IA, Rhee JS, Nave KA & Saher G** (2012). Critical time window of neuronal cholesterol synthesis during neurite outgrowth. *J Neurosci.* **32**: 7632-7645.
- Gammill LS & Sive H** (1997). Identification of otx2 target genes and restrictions in ectodermal competence during *Xenopus* cement gland formation. *Development.* **124**: 471-481.
- Gargalovic P & Dory L** (2003). Caveolins and macrophage lipid metabolism. *J Lipid Res.* **44**: 11-21.
- Gey GO, Coffmann WD, Kubicek MT** (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of the cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**: 264-265.
- Ghysen A, Dambly-Chaudiere C, Jan LY & Jan YN** (1993). Cell interactions and gene interactions in peripheral neurogenesis. *Genes Dev.* **7**: 723-733.
- Gil G, Faust JR, Chin DJ, Goldstein JL & Brown MS** (1985). Membrane-bound domain of HMG CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme. *Cell.* **41**: 249-258.
- Goldstein JL, Rawson RB & Brown MS** (2002). Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. *Arch Biochem Biophys.* **397**: 139-148.
- Goldstein JL, DeBose-Boyd RA & Brown MS** (2006). Protein sensors for membrane sterols. *Cell.* **124**: 35-46.
- Gong Y, Lee JN, Lee PC, Goldstein JL, Brown MS & Ye J** (2006). Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake. *Cell Metab.* **3**: 15-24.
- Graham V, Khudyakov J, Ellis P & Pevny L** (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron.* **39**: 749-765.
- Hartenstein V** (1989). Early neurogenesis in *Xenopus*: the spatio-temporal pattern of proliferation and cell lineages in the embryonic spinal cord. *Neuron.* **3**: 399-411.
- Hasegawa S, Kume H, Iinuma S, Yamasaki M, Takahashi N, Fukui T** (2012). Acetoacetyl-CoA synthetase is essential for normal neuronal development. *Biochem Biophys Res Commun.* **2**: 398-403.

- Hennekam RCM** (2005). Congenital brain anomalies in distal cholesterol biosynthesis defects. *J Inherit Metab Dis.* **28**: 385-392.
- Henningfeld KA, Locker M & Perron M** (2007). Xenopus primary neurogenesis and retinogenesis. *Functional development and embryology.* **1**: 26-30.
- Hensey C & Gautier J** (1998). Programmed cell death during Xenopus development: a spatio-temporal analysis. *Dev Biol.* **203**: 36-48.
- Herman GE** (2003). Disorders of cholesterol biosynthesis: prototypic metabolic malformation syndromes. *Human Molecular Genetics.* **12**: 75-88.
- Herrera E & Amusquivar E** (2000). Lipid metabolism in the fetus and the newborn. *Dev Biol.* **16**: 202-210.
- Herz J & Farese RV Jr** (1999). The LDL receptor gene family, apolipoprotein B and cholesterol in embryonic development. *J Nutr.* **129**: 473S-475S.
- Hirano Y, Yoshida M, Shimizu M & Sato R** (2001). Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem.* **276**: 36431-36437.
- Hoekstra D & van Ijzendoorn SC** (2000). Lipid trafficking and sorting: how cholesterol is filling gaps. *Curr Opin Cell Biol.* **12**: 496-502.
- Ho KS & Scott MP** (2002). Sonic hedgehog in the nervous system: functions, modifications and mechanisms. *Curr Opin Neurobiol.* **12**: 57-63.
- Ho KS, Scott MP, Wijgerde M, McMahon JA, Rule M & McMahon AP** (2002). A direct requirement for Hedgehog signaling for normal specification of all ventral progenitor domains in the presumptive mammalian spinal cord. *Genes Dev.* **16**: 2849-2864.
- Holleman T** (2007). Cholesterol (WWW-Seite Labor Prof. Dr. rer. nat. Hollemann der Arbeitsgruppe Medizinische Molekularbiologie). <http://www1.medizin.uni-halle.de/ag-hollemann/chol.html>. **01.08.2012**: cho-pathway.jpg, RegCho.jpg.
- Horton JD, Shimomura I, Brown MS, Hammer RE, Goldstein JL & Shimano H** (1998). Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J Clin Invest.* **11**: 2331-2339.
- Horton JD, Goldstein JL & Brown MS** (2002). SREBP's: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in liver. *J Clin Invest.* **109**: 1125-1131.
- Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS & Goldstein JL** (2003). Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* **100**: 12027-12032.
- Hu CD & Kerppola TK** (2003). Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Nature Biotech.* **21**: 539-545.
- Hu CD, Chinenov Y & Kerppola TK** (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell.* **9**: 789-798.
- Hua X, Yokoyama C, Wu J, Briggs MR, Brown MS, Goldstein JL & Wang X** (1993). *SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element..* *Proc Natl Acad Sci USA.* **90**: 11603-11607.

- Hua X, Nohturfft A, Goldstein JL & Brown MS** (1996). Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein. *Cell*. **87**: 415-426.
- Hua X, Sakai J, Brown MS & Goldstein JL** (1996b). Regulated cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) requires sequences on both sides of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*. **271**: 10379-10384.
- Ikeda Y, Demartino GN, Brown MS, Lee JN, Goldstein JL & Ye J** (2009). Regulated endoplasmic reticulum-associated degradation of a polytopic protein: p97 recruits proteasomes to Insig-1 before extraction from membranes. *J Biol Chem*. **284**: 34889-34900.
- Janowski BA** (2002). The hypocholesterolemic agent LY295427 up-regulates INSIG-1, identifying the INSIG-1 protein as a mediator of cholesterol homeostasis through SREBP. *Proc Natl Acad Sci USA*. **20**: 12675-12680.
- Jen WC, Wettstein D, Turner D, Chitnis A & Kintner C** (1997). The Notch ligand, X-Delta-2, mediates segmentation of the paraxial mesoderm in *Xenopus* embryos. *Development*. **124**: 1169-1178.
- Jurevics HA, Kidwai FZ & Morell P** (1997). Sources of cholesterol during development of the rat fetus and fetal organs. *J Lipid Res*. **38**: 723-733.
- Kauppinen L, Myöhänen S, Halmekytö M, Alhonen L & Jänne J** (1993). Transgenic mice over-expressing the human spermidine synthase gene. *Biochem*. **293**: 513-516.
- Kelley RI & Hennekam RC** (2000). The Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Med Genet*. **37**: 321-335.
- Kim JB, Spotts GD, Halvorsen YD, Shih HM, Ellenberger T, Towle HC & Spiegelman BM** (1995). Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the *basic helix-loop-helix* domain. *Mol Cell Biol*. **15**: 2582-2588.
- Kiyota T, Jono H, Kuriyama S, Hasegawa K, Miyatani S & Kinoshita T** (2001). X-Serrate-1 is involved in primary neurogenesis in *Xenopus laevis* in a complementary manner with X-Delta-1. *Dev Genes Evol*. **211**: 367-376.
- Klisch, T.** (2006). Transcriptional control in the context of primary neurogenesis. Doktorarbeit.
- Klisch TJ, Souopgui J, Juergens K, Rust B, Pieler T & Henningfeld KA.** (2001). Mxi1 is essential for neurogenesis in *Xenopus* and acts by bridging the pan-neural and proneural genes. *Dev Biol*. **2**: 470-485.
- Kolf-Clauw M, Chevy F, Wolf C, Siliart B, Citadelle D & Roux C** (1996). Inhibition of 7-dehydrocholesterol reductase by the teratogen AY9944: a rat model for Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Teratology*. **54**: 115-125.
- Kolm P & Sive H** (1995). Efficient hormone-inducible protein function in *Xenopus laevis*. *Dev Biol*. **171**: 267-272.
- Korade Z & Kenworthy AK** (2008). Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology*. **55**: 1265-1273.
- Krakowiak PA, Wassif CA, Kratz L, Cozma D, Kovárová M, Harris G, Grinberg A, Yang Y, Hunter AG, Tsokos M, Kelley RI & Porter FD** (2003). Lathosterolosis: an inborn error of human and murine cholesterol synthesis due to lathosterol 5-desaturase deficiency. *Hum Mol Genet*. **12**: 1631-1641.
- Kramer MA** (2005). Trends In Cholesterol Research . *Nova Science Publishers Inc*. 1. Auflage, 76.

- Kudoh T, Concha ML, Houart C, Dawid IB & Wilson SW** (2004). Combinatorial Fgf and Bmp signalling patterns the gastrula ectoderm into prospective neural and epidermal domains. *Development*. **15**: 3581-3592.
- Kunte AS, Matthews KA & Rawson RB** (2006). Fatty acid auxotrophy in Drosophila larvae lacking SREBP. *Cell metabolism*. **6**: 439-448.
- Kuroda H, Wessely O & De Robertis EM** (2004). Neural induction in Xenopus: requirement for ectodermal and endomesodermal signals via Chordin, Noggin, beta-Catenin, and Cerberus. *PLoS Biol*. **5**: 623-634.
- Lai EC** (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development*. **131**: 965-973.
- Lamar E, Deblandre G, Wettstein D, Gawantka V, Pollet N, Niehrs C & Kintner C** (2001). Nrrp is a novel intracellular component of the Notch signaling pathway. *Genes & Development*. **15**: 1885-1899.
- Laubner D, Breitling R & Adamski J** (2003). Embryonic expression of cholesterologenic genes is restricted to distinct domains and colocalizes with apoptotic regions in mice. *Brain Res Mol Brain Res*. **1**: 87-92.
- Launay C, Fromentoux V, Shi DL & Boucaut JC** (1996). A truncated FGF receptor blocks neural induction by endogenous Xenopus inducers. *Development*. **3**: 869-880.
- Lee SJ, Sekimoto T, Yamashita E, Nagoshi E, Nakagawa A, Imamoto N, Yoshimura M, Sakai H, Chong KT, Tsukihara T & Yoneda Y** (2003). The structure of importin-beta bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor. *Science*. **302**: 1571-1575.
- Lee JN & Ye J** (2004). Proteolytic activation of sterol regulatory element-binding protein induced by cellular stress through depletion of Insig-1. *J Biol Chem*. **279**: 45257-45265.
- Lee MC, Miller EA, Goldberg J, Orci L & Schekman R** (2004). Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **20**: 87-123.
- Lee JN, Gong Y, Zhang X & Ye J** (2006). Proteasomal degradation of ubiquitinated Insig proteins is determined by serine residues flanking ubiquitinated lysines. *Proc Natl Acad Sci USA*. **103**: 4958-4963.
- Lee PCW & DeBose-Boyd RA** (2010). Intramembrane glycine mediates multimerization of Insig-2, a requirement for sterol regulation in Chinese hamster ovary cells. *J Lipid Res*. **51**: 192-201.
- Louvi A & Artavanis-Tsakonas S** (2006). Notch signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci*. **7**: 93-102.
- Mandey SH, Schneiders MS, Koster J & Waterham HR** (2006). Mutational spectrum and genotype-phenotype correlations in mevalonate kinase deficiency. *Hum Mutat*. **27**: 796-802.
- Mattioni T, Louvion JF & Picard D** (1994). Regulation of protein activities by fusion to steroid binding domains. *Methods Cell Biol*. **43**: 335-352.
- Merath KM, Chang B, Dubielzig R, Jeannotte R & Sidjanin DJ** (2011). A spontaneous mutation in Sreb2 leads to cataracts and persistent skin wounds in the lens opacity 13 (lop13) mouse. *Mamm Genome*. **22**: 661-673.
- Mitchell KJ, Pinson KI, Kelly OG, Brennan J, Zupicich J, Scherz P, Leighton PA, Goodrich LV, Lu X, Avery BJ, Tate P, Dill K, Pangilinan E, Wakenight P, Tessier-Lavigne M & Skarnes WC** (2001). Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development. *Nat Genet*. **3**: 241-249.

- Miyagi S, Saito T, Mizutani K, Masuyama N, Gotoh Y, Iwama A, Nakauchi H, Masui S, Niwa H, Nishimoto M, Muramatsu M & Okuda, A (2004). The Sox-2 regulatory regions display their activities in two distinct types of multipotent stem cells. *Mol Cell Biol.* **24**: 4207-4220.
- Moody SA, Miller V, Spanos A & Frankfurter A (1996). Developmental expression of a neuron-specific beta-tubulin in frog (*Xenopus laevis*): a marker for growing axons during the embryonic period. *J Comp Neurol.* **364**: 219-230.
- Mori M, Li G, Abe I, Nakayama J, Guo Z, Sawashita J, Ugawa T, Nishizono S, Serikawa T, Higuchi K & Shumiya S (2006). Lanosterol synthase mutations cause cholesterol deficiency-associated cataracts in the Shumiya cataract rat. *J Clin Invest.* **116**: 395-404.
- Murphy KC (2010). Reading Guide - Biology 102. *UMMS.* 27.12.
- Muller PY & Miserez AR (2002). Identification of mutations in the gene encoding sterol regulatory element binding protein (SREBP)-2 in hypercholesterolaemic subjects. *J Med Genet.* **4**: 271-275.
- Nabi IR & Le PU (2003). Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol.* **161**: 673-677.
- Nagoshi E, Imamoto N, Sato R & Yoneda Y (1999). Nuclear import of sterol regulatory element-binding protein-2, a *basic helix-loop-helix*-leucine zipper (bHLH-Zip)-containing transcription factor, occurs through the direct interaction of importin beta with HLH-Zip. *Mol Biol Cell.* **10**: 2221-2233.
- Nagoshi E & Yoneda Y (2001). Dimerization of sterol regulatory element-binding protein 2 via the helix-loop-helix-leucine zipper domain is a prerequisite for its nuclear localization mediated by importin beta. *Mol Cell Biol.* **21**: 2779-2789.
- Natarajan P, Ray KK, Cannon CP (2010). High-density lipoprotein and coronary heart disease: current and future therapies. *Journal of the American College of Cardiology* **55**: 1283-1299.
- Nieuwkoop PD & Faber P (1967). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). 2. Auflage, North-Holland Publ Co Amsterdam.
- Nohturfft A, Brown MS & Goldstein JL (1998a). Sterols regulate processing of carbohydrate chains of wild-type SREBP cleavage-activating protein (SCAP), but not sterol-resistant mutants Y298C or D443N. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**: 12848-12853.
- Nohturfft A, Brown MS & Goldstein JL (1998b). Topology of SREBP cleavage-activating protein, a polytopic membrane protein with a sterol-sensing domain. *J Biol Chem.* **273**: 17243-17250.
- Nohturfft A, Yabe D, Goldstein JL, Brown MS & Espenshade PJ (2000). Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes. *Cell.* **102**: 315-323.
- Nowaczyk MJ, Tan M, Hamid JS & Allanson JE (2012). Smith-Lemli-Opitz syndrome: Objective assessment of facial phenotype. *Am J Med Genet A.* **5**: 1020-1028.
- Ohashi K, Osuga J, Tozawa R, Kitamine T, Yagyu H, Sekiya M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Yahagi N, Iizuka Y, Harada K, Gotoda T, Shimano H, Yamada N & Ishibashi S (2003). Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase gene. *J Biol Chem.* **278**: 42936-42941.
- Osborne TF (2000). Sterol regulatory element binding proteins (SREBPs): Key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J Biol Chem.* **275**: 32379-32382.
- Oswald R, Richter K & Grunz H (1991). Localization of a nervous system-specific class II beta-tubulin gene in *Xenopus laevis* embryos by whole-mount *in situ* hybridization. *Int J Dev Biol.* **35**: 399-405.

- Parpal S, Karlsson M, Thorn H & Strålfors P** (2001). Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control. *J Biol Chem.* **276**: 9670-9678.
- Peng Y, Schwarz EJ, Lazar MA, Genin A, Spinner NB & Taub R** (1997). Cloning, human chromosomal assignment, and adipose and hepatic expression of the CL-6/INSIG1 gene. *Genomics.* **43**: 278-284.
- Penzel R, Oswald R, Chen Y, Tacke L & Grunz H** (1997). Characterization and early embryonic expression of a neural specific transcription factor xSOX3 in *Xenopus laevis*. *Int J Dev Biol.* **41**: 667-677.
- Pera EM, Ikeda A, Eivers E & De Robertis EM** (2003). Integration of IGF, FGF, and anti-BMP signals via Smad1 phosphorylation in neural induction. *Genes Dev.* **24**: 3023-3028.
- Porter FD** (2000). RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome: a multiple congenital anomaly/mental retardation syndrome due to an inborn error of cholesterol biosynthesis. *Mol Genet Metab.* **71**: 163-174.
- Pratt HP, Keith J & Chakraborty J.** (1980). Membrane sterols and the development of the preimplantation mouse embryo. *J Embryol Exp Morphol.* **60**: 303-319.
- Radhakrishnan A, Ikeda Y, Kwon HJ, Brown MS & Goldstein JL** (2007). Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc Natl Acad Sci USA.* **104**: 6511-6518.
- Rawson RB, DeBose-Boyd R, Goldstein JL & Brown MS** (1999). Failure to cleave sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) causes cholesterol auxotrophy in Chinese hamster ovary cells with genetic absence of SREBP cleavage-activating protein. *J Biol Chem.* **274**: 28549-28556.
- Rawson RB** (2003). The SREBP pathway-insights from Insigs and insects. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**: 631-640.
- Richard-Parpaillon L, Héligon C, Chesnel F, Boujard D & Philpott A** (2002). The IGF pathway regulates head formation by inhibiting Wnt signaling in *Xenopus*. *Dev Biol.* **244**: 407-417.
- Rizzo AM, Gornati R, Galli C, Bernardini G & Berra B** (1994). Cholesterol, triacylglycerols and phospholipids during *Xenopus* embryo development. *Cell Biol Int.* **18**: 1085-1090.
- Roessler E, Mittaz L, Du Y, Scott HS, Chang J, Rossier C, Guipponi M, Matsuda SP, Muenke M & Antonarakis SE** (1999). Structure of the human Lanosterol synthase gene and its analysis as a candidate for holoprosencephaly (HPE1). *Hum Genet.* **105**: 489-495.
- Saher G, Brugger B, Lappe-Siefke C, Mobius W, Tozawa R, Wehr MC, Wieland F, Ishibashi S & Nave KA** (2005). High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat Neurosci.* **8**: 468-475.
- Saka Y & Smith JC** (2001). Spatial and temporal patterns of cell division during early *Xenopus* embryogenesis. *Dev Biol.* **229**: 307-318.
- Sakai J, Duncan EA, Rawson RB, Hua X, Brown MS & Goldstein JL** (1996). Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Dev Biol.* **85**: 1037-1046.
- Sakai J, Nohturfft A, Cheng D, Ho YK, Brown MS & Goldstein JL** (1997). Identification of complexes between the COOH-terminal domains of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) and SREBP cleavage-activating protein. *J Biol Chem.* **272**: 20213-20221.

- Sakai J, Nohturfft A, Goldstein JL & Brown MS** (1998). Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from *in vivo* competition studies. *J Biol Chem.* **273**: 5785-5793.
- Sander C & Schneider R** (1991). Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins.* **9**: 56-68.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* **74**: 5463-5467.
- Sasai Y, Lu B, Piccolo S & De Robertis EM** (1996). Endoderm induction by the organizer-secreted factors chordin and noggin in *Xenopus* animal caps. *EMBO J.* **17**: 4547-4555.
- Sato R, Yang J, Wang X, Evans MJ, Ho YK, Goldstein JL & Brown MS** (1994). Assignment of the membrane attachment, DNA binding, and transcriptional activation domains of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1). *J Biol Chem.* **269**: 17267-17273.
- Sato R, Inoue J, Kawabe Y, Kodama T, Takano T & Maeda M** (1996). Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2. *J Biol Chem.* **271**: 26461-26464.
- Seegmiller AC, Dobrosotskaya I, Goldstein JL, Ho YK, Brown MS & Rawson RB.** (2002). The SREBP pathway in *Drosophila*: regulation by palmitate, not sterols. *Dev Cell.* **2**: 229-238.
- Sharpe PT & Mason I** (2008). Molecular embryology-Methods and protocols. *Humana Press.* **Vol.97**.
- Shimano H, Shimomura I, Hammer RE, Herz J, Goldstein JL, Brown MS & Horton JD** (1997). Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene. *J Clin Invest.* **8**: 2115-2124.
- Simons K & van Meer G** (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry.* **27**: 6197-6202.
- Simons K & Ikonen E** (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature.* **387**: 569-572.
- Simons K & Ehehalt R** (2002). Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest.* **110**: 597-603.
- Simons K & Vaz WL** (2004). Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* **33**: 269-295.
- Skalnik DG, Narita H, Kent C & Simoni RD** (1988). The membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase confers endoplasmic reticulum localization and sterol-regulated degradation onto  $\beta$ -galactosidase. *J Biol Chem.* **263**: 6836-6841.
- Small DM & Shipley GG** (1974). Physical-chemical basis of lipid deposition in atherosclerosis. *Science.* **185**: 222-229.
- Smart EJ, Ying Y, Donzell WC & Anderson RG** (1996). A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem.* **46**: 29427-29435.
- Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T & Lisanti MP** (1999). Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol.* **19**: 7289-7304.
- Smith JC, Price BM, Green JB, Weigel D & Herrmann BG** (1991). Expression of a *Xenopus* homolog of Brachyury (T) is an immediate-early response to mesoderm induction. *Cell.* **67**: 79-87.
- Stevely WS & Stocken LA** (1968). Variations in the phosphate content of histone F1 in normal and irradiated tissues. *Biochem J.* **110**: 187-191.

- Sun LP, Li L, Goldstein JL & Brown MS (2005). Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins *in vitro*. *J Biol Chem.* **280**: 26483-26490.
- Suzuki S, Kiyosue K, Hazama S, Ogura A, Kashihara M, Hara T, Koshimizu H & Kojima M (2007). Brain-derived neurotrophic factor regulates cholesterol metabolism for synapse development. *J Neurosci.* **27**: 6417-6427.
- Suzuki R, Lee K, Jing E, Biddinger SB, McDonald JG, Montine TJ, Craft S, Kahn CR (2010). Diabetes and insulin in regulation of brain cholesterol metabolism. *Cell Metab.* **12**: 567-579.
- Tadjuidje E (2004). Cholesterol homeostasis in development: Molecular cloning and functional characterisation of the *Xenopus* 7-dehydrocholesterol-reductase (Xdhcr7). *Dissertation*.
- Tadjuidje E & Hollemann T (2006). Cholesterol homeostasis in development: the role of *Xenopus* 7-dehydrocholesterol reductase (Xdhcr7) in neural development. *Dev Dyn.* **235**: 2095-2110.
- Tang JJ, Li JG, Qi W, Qiu WW, Li PS, Li BL & Song BL (2011). Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques. *Cell Metab.* **1**: 44-56.
- Thews G & Vaupel P (2005). Vegetative Physiologie. Berlin. *Springer-Verlag*.
- Thomas S, Pais AP, Casares S & Brumeanu TD (2004). Analysis of lipid rafts in T cells. *Molecular Immunology.* **41**: 399-409.
- Tsai M & O'Malley B (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Ann Rev Biochem.* **63**: 451-486.
- Tsien RY (1998). The *green fluorescent protein*. *Ann Rev Biochem.* **67**: 509-44.
- Tozawa R, Ishibashi S, Osuga J, Yagyu H, Oka T, Chen Z, Ohashi K, Perrey S, Shionoiri F & Yahagi N (1999). Embryonic lethality and defective neural tube closure in mice lacking squalene synthase. *J Biol Chem.* **274**: 30843-30848.
- Turley SD & Dietschy JM (1988). The metabolism and excretion of cholesterol by the liver. In *The Liver: Biology and Pathobiology*. 2nd Ed. Arias IM *Raven Press, Ltd., New York*. 617-641.
- Turley SD, Burns DK, Rosenfeld CR & Dietschy JM (1996). Brain does not utilize low density lipoproteincholesterol during fetal and neonatal development in the sheep. *J Lipid Res.* **37**: 1953-1961.
- Turley SD, Burns DK & Dietschy JM (1998). Preferential utilization of newly synthesized cholesterol for brain growth in neonatal lambs. *Am J Physiol.* **274**: 1099-1105.
- Uittenbogaard A, Ying Y & Smart EJ (1998). Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking. *J Biol Chem.* **11**: 6525-6532.
- Verheijen MH, Camargo N, Verdier V, Nadra K, de Preux Charles AS, Medard JJ, Luoma A, Crowther M, Inouye H, Shimano H, Chen S, Brouwers JF, Helms JB, Feltri ML, Wrabetz L, Kirschner D, Chrast R & Smit AB. (2009). SCAP is required for timely and proper myelin membrane synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **106**: 21383-21388.
- Waheed, AA & Freed EO (2009). Lipids and membrane microdomains in HIV-1 replication. *Virus Res.* **143**: 162-176.
- Wang X, Briggs MR, Hua X, Yokoyama C, Goldstein JL & Brown MS (1993). Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. II. Purification and characterization. *J Biol Chem.* **268**: 14497-14504.

- Wang X, Sato R, Brown MS, Hua X & Goldstein JL** (1994). SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell*. **77**: 53-62.
- Wassif CA, Zhu P, Kratz L, Krakowiak PA, Battaile KP, Weight FF, Grinberg A, Steiner RD, Nwokoro NA & Kelley RI** (2001). Biochemical, phenotypic and neurophysiological characterization of a genetic mouse model of RSH/Smith–Lemli–Opitz syndrome. *Hum Mol Genet*. **10**: 555-564.
- Waterham HR** (2006). Defects of cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett*. **580**: 5442-5449.
- Weidemann W, Reinhardt A, Thate A & Horstkorte R** (2011). Biochemical characterization of the M712T-mutation of the UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetyl-mannosaminekinase in hereditary inclusion body myopathy. *Neuromuscul Disord*. **12**: 824-831.
- Weis K** (2003). Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*. **112**: 441-451.
- Wettstein DA, Turner DL & Kintner C** (1997). The *Xenopus* homolog of *Drosophila* Suppressor of Hairless mediates Notch signaling during primary neurogenesis. *Development*. **124**: 693-702.
- Willnow TE, Hilpert J, Armstrong SA, Rohlmann A, Hammer RE, Burns DK & Herz J**. (1996). Defective forebrain development in mice lacking gp330/ megalin. *Proc Natl Acad Sci USA*. **16**: 8460-8464.
- Wilson SI, Graziano E, Harland R, Jessell TM & Edlund T** (2000). An early requirement for FGF signalling in the acquisition of neural cell fate in the chick embryo. *Curr Biol*. **8**: 421-429.
- Wilson SI & Edlund T** (2001). Neural induction: toward a unifying mechanism. *Nat Neurosci*. **4**: 1161-1168.
- Witsch-Baumgartner M, Gruber M, Kraft HG, Rossi M, Clayton P, Giros M, Haas D, Kelley RI, Krajewska-Walasek M & Utermann G** (2004). Maternal apo E genotype is a modifier of the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Med Genet*. **41**: 577-584.
- Woollett LA** (1996). Origin of cholesterol in the fetal golden Syrian hamster: contribution of de novo sterol synthesis and maternal-derived lipoprotein cholesterol. *J Lipid Res*. **37**: 1246-1257.
- Woollett LA** (2001). Fetal lipid metabolism. *Front Biosci*. **6**: 536-545.
- Woollett LA** (2008). Where does fetal and embryonic cholesterol originate and what does it do? *Annu Rev Nutr*. **28**: 97-114.
- Wu HY, Perron M & Hollemann T**. (2009). The role of *Xenopus* Rx-L in photoreceptor cell determination. *Dev Biol*. **2**: 352-365.
- Xiang TX, Chen J & Anderson BD** (2000). A quantitative model for the dependence of solute permeability on peptide and cholesterol content in biomembranes. *J Membr Biol*. **177**: 137-148.
- Yabe D, Brown MS & Goldstein JL** (2002a). Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. **99**: 12753-12758.
- Yabe D, Xia ZP, Adams CM & Rawson RB** (2002). Three mutations in sterol-sensing domain of SCAP block interaction with insig and render SREBP cleavage insensitive to sterols. *Proc Natl Acad Sci USA*. **99**: 16672-16677.

- Yabe D, Komuro R, Liang G, Goldstein JL & Brown MS** (2003). Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. **100**: 3155-3160.
- Yang J, Goldstein JL, Hammer RE, Moon YA, Brown MS & Horton JD** (2001). Decreased lipid synthesis in livers of mice with disrupted Site-1 protease gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. **24**: 13607-13612.
- Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, Goldstein JL, & Brown MS** (2002). Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell*. **110**: 489-500.
- Yeagle PL** (1985). Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta*. **822**: 267-287.
- Yeagle PL** (1989). Lipid regulation of cell membrane structure and function. *FASEB J*. **3**: 1833-1842.
- Yeh S, Tsai MY, Xu Q, Mu XM, Lardy H, Huang KE, Lin H, Yeh SD, Altuwajri S, Zhou X, Xing L, Boyce BF, Hung MC, Zhang S, Gan L & Chang C** (2002). Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an *in vivo* model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. **99**: 13498-13503.
- Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, Goldstein JL & Brown MS** (1993). SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell*. **75**: 187-197.
- Yona G, Linial N, Tishby N & Linial M** (1998). A map of the protein space-an automatic hierarchical classification of all protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*. **6**: 212-221.
- Yu H & Patel SB** (2005). Recent insights into the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Clin Genet*. **68**: 383-391.
- Zelenski NG, Rawson RB, Brown MS & Goldstein JL** (1999). Membrane topology of S2P, a protein required for intramembranous cleavage of sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem*. **274**: 21973-21980.



# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Hollemann, welcher mir die Möglichkeit gab diese Doktorarbeit an seinem Institut anzufertigen. Darüber hinaus ermöglichte er mir die Teilnahme am „*Xenopus* Course“ in New York sowie an anregenden Konferenzen.

Im Voraus möchte ich mich auch bei den beiden Gutachtern Dr. Wolf-Rüdiger Grosse und Prof. Dr. Michael Kühl bedanken, welche die Aufgabe übernommen haben meine Doktorarbeit zu bewerten.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Dörte Hülse bedanken, - für ihre guten Ratschläge und überaus kommunikative Zusammenarbeit, die sich in dieser Zeit zu einer echten Freundschaft entwickelt hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner gesamten Arbeitsgruppe. Danke an Frau Rebecca Wagner, die in der Endphase dieser Arbeit mir immer wieder Informationen per E-Mail zukommen ließ und Herrn Dr. Enrico Jandt für das Korrekturlesen. Darüber hinaus gilt mein ganz lieber Dank unseren beiden technischen Assistentinnen Frau Juliane Herfurth und Frau Undine Ziese, die mich in alle wichtigen Techniken des „*Xenopus*-Universums“ eingeführt und unterstützt haben. Sie fanden immer einen aufmunternden Spruch, wenn ein Experiment einmal nicht wie geplant funktionierte.

Meinen Dank möchte ich für die gute Zusammenarbeit mit der gesamten AG Horstkorte aussprechen. Danke auch für die kulinarischen Mittagessen jeden Donnerstag.

Insbesondere möchte ich meiner gesamten Familie danken - meinen Eltern und Schwiegereltern für die jahrelange uneingeschränkte Unterstützung. Vor allem meinem Ehemann Frank möchte ich für seine große Geduld während der Promotionszeit und die Hilfe mit dem Textsatzsystem  $\text{\LaTeX} 2_{\epsilon}$  danken.



# Lebenslauf

Name Corsing  
Vorname Anne  
Geburtsdatum 31.03.1980  
Geburtsort Cottbus  
Nationalität deutsch  
Familienstand verheiratet  
2 Kinder, geb. im August 2010 und im August 2012

ab 09/2007 **Doktorandin, DFG-Studentin**  
Martin-Luther-Universität Halle (Saale), Institut für Physiologische Chemie  
in der AG Molekulare Entwicklungsbiologie von Prof. Hollemann, Titel: „Die  
Rolle von SREBP2 und ferner INSIG während der Embryonalentwicklung von  
*Xenopus laevis*“

07/2010 - 07/2011 **Mutterschutz und Erziehungsjahr**

03/2007 - 08/2007 **Australienreise**

05/2006 - 03/2007 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**  
Martin-Luther-Universität Halle (Saale), Institut für Biologie, AG von Prof.  
G. Moritz

04/2005 - 05/2006 **Studentische Hilfskraft**  
Universitäts- und Landesbibliothek, Halle (Saale), Zweigbibliothek Zoologie

10/2004 - 04/2005 **Hilfswissenschaftler**  
Leibniz Institut für Biochemie, Halle (Saale), AG von Prof. Wasternack

03/2004 - 10/2004 **Hilfswissenschaftler**  
Institut für Physiologische Chemie, Halle (Saale), AG von Prof. Braun

08/2003 - 10/2003 **Berufspraktikum**  
Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin, Berlin, AG von Prof. Lewin

11/2005 - 04/2006 Abschluss **Diplom-Biologin**  
Diplomarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der AG  
Entwicklungsbiologie von Prof. G. Moritz, Titel: „Postkatatreptische Organo-  
genese bei *Thysanopteren*“

10/2000 - 04/2006 **Studiengang Biologie** an der Martin-Luther-Universität Halle (Saale)

09/1999 - 09/2000 **Freiwilliges Ökologisches Jahr**  
Museum der Westlausitz, Kamenz

08/1997 - 07/1999 Abschluss **Allgemeine Hochschulreife**  
Berufliches Gymnasium für Wirtschaftswissenschaften, Kamenz

08/1989 - 07/1997 Abschluss **Mittelschule**  
Kurt-Schlosser-Schule, Kamenz

08/1987 - 07/1989 Abschluss **Grundschule**  
3. Grund- und Mittelschule, Kamenz



#### Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Die Stellen, die anderen Werken wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere weiterhin, dass ich die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt habe.

Halle (Saale), den 15.12.2012