

Aus dem Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. Guido Posern)

**Expressionsanalyse von *tripartite-motif29* und *tripartite-motif36* – zwei putative E3-Ligasen  
in der frühen Embryogenese von *Xenopus laevis***

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Stefanie Kerstin Förster  
geboren am 19.12.1989 in Rodewisch

Betreuer: Prof. Dr. Thomas Hollemann

Gutachterin/Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Hollemann

Prof. Dr. Michael Kühl (Ulm)

Prof. Dr. Annette Borchers (Marburg)

20.09.2016

09.06.2017

## Referat

In dieser Arbeit wird die Expression der beiden Gene *trim29* und *trim36* während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* analysiert.

*Xenopus laevis* dient hierbei als Modellorganismus. Für die Analyse wird die whole mount in situ Hybridisierung und die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion genutzt. Diese Verfahren ermöglichen die Expression sowohl zeitlich als auch anatomiebezogen zu betrachten. Tripartite-motif-Proteine besitzen eine charakteristische Struktur aus B-Box-, RING- und Coiled-Coil-Domäne. Aufgrund der RING-Domäne wird den Proteinen eine E3-Ligase-Aktivität zugeschrieben.

*TRIM29* spielt im menschlichen Organismus eine Rolle in der Entstehung diverser maligner Neoplasien. Die Expression und Funktion im Modellorganismus *Xenopus laevis* ist bisher unbekannt. In der Analyse kann eine Expression im ektodermalen Gewebe nachgewiesen werden. Neuroektodermale Derivate zeigen in der Regel keine Aktivität des Gens.

Hinsichtlich der Expression von *TRIM36* existieren bereits einige Daten. Das zugehörige Protein konnte beim Menschen in Gehirn, Hoden, Prostata, Niere, Herz und Lunge nachgewiesen werden (Balint *et al.*, 2004). Ebenso erfolgte bereits ein Expressionsnachweis im Modellorganismus *Xenopus laevis*. Es zeigte sich eine Aktivierung des Gens im vegetativen Pol der befruchteten Eizelle, in Blastula- und Morulastadien sowie in Geweben des zentralen Nervensystems während der Neurulation und Organogenese (Cuykendall und Houston, 2009). Hier gilt es, die bestehende Datenlage nachzuvollziehen und eine detaillierte Expressionsanalyse bezüglich der Expression in neuralen Strukturen zu erlangen.

Des Weiteren werden die Proteinstrukturen homologer Proteine für Trim29 und Trim36 in verschiedenen Organismen verglichen. Bei gleicher Grundstruktur der Trim-Proteine zeigen sich doch deutliche Unterschiede in den Proteinsequenzen von Mensch und *Xenopus*.

Zusammenfassend hat die folgende Expressionsanalyse das Ziel, durch detaillierte Betrachtung die Gene *trim29* und *trim36* in die große Familie der *tripartite-motif*-Gene einzuordnen und Hinweise auf die Funktion der Proteine zu erlangen.

## Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <b>1 Einleitung</b> .....  | 1  |
| 1.1 <i>Xenopus laevis</i> als Modellorganismus .....                                       | 1  |
| 1.2 Embryonalentwicklung von <i>Xenopus laevis</i> .....                                   | 1  |
| 1.3 Entwicklung der Epidermis, des Nervensystems und des Auges als Derivate des Ektoderms4 |    |
| 1.4 Ubiquitinierung mit Focus auf die E3-Ligasen.....                                      | 7  |
| 1.5 Tripartite-motif-Proteine .....  | 8  |
| 1.6 <i>Trim29</i> .....  | 11 |
| 1.7 <i>Trim36</i> .....  | 13 |
| <b>2 Zielsetzung</b> .....   | 16 |
| <b>3 Material und Methoden</b> .....   | 17 |
| 3.1 Material .....   | 17 |
| 3.1.1 Der Modellorganismus <i>Xenopus laevis</i> .....                                     | 17 |
| 3.1.2 Chemikalien .....  | 17 |
| 3.1.3 Enzyme.....  | 18 |
| 3.1.4 Hormone.....   | 18 |
| 3.1.5 Antikörper .....   | 18 |
| 3.1.6 Kits .....   | 19 |
| 3.1.7 Lösungen, Puffer, Medien.....  | 19 |
| 3.1.8 Primer .....   | 20 |
| 3.1.9 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....  | 21 |
| 3.2 Methoden .....   | 22 |
| 3.2.1 Ovulationsstimulation in <i>Xenopus</i> -Weibchen.....                               | 22 |
| 3.2.2 In vitro Fertilisation .....   | 23 |
| 3.2.3 RNA-Präparation .....  | 23 |
| 3.2.4 Konzentrationsmessung der RNA.....   | 24 |
| 3.2.5 Synthese der komplementären DNA (cDNA).....  | 24 |
| 3.2.6 Primerdesign .....   | 24 |
| 3.2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....   | 25 |
| 3.2.8 Agarosegel-Elektrophorese .....  | 26 |
| 3.2.9 Whole mount in situ Hybridisierung.....  | 26 |

## Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| 3.2.10 Herstellung von Vibratom-Schnitten .....                                  | 30        |
| 3.2.11 Fotografie der Embryonen und derer Schnitte .....                         | 30        |
| <b>4 Ergebnisse</b> .....  | <b>31</b> |
| 4.1 Expression von <i>trim29</i> in der whole mount in situ Hybridisierung ..... | 31        |
| 4.1.1 Expression in den Stadien NF-Stadien 0, 3, 6 und 9 .....                   | 31        |
| 4.1.2 Expression im NF-Stadium 12 .....  | 32        |
| 4.1.3 Expression im NF-Stadium 15 .....  | 33        |
| 4.1.4 Expression im NF-Stadium 18 .....  | 34        |
| 4.1.5 Expression im NF-Stadium 21 .....  | 35        |
| 4.1.6 Expression im NF-Stadium 24 .....  | 36        |
| 4.1.7 Expression im NF-Stadium 27 .....  | 37        |
| 4.1.8 Expression im NF-Stadium 30 .....  | 37        |
| 4.1.9 Expression im NF-Stadium 33 .....  | 39        |
| 4.1.10 Expression im NF-Stadium 36 .....   | 40        |
| 4.2 Expression von <i>trim36</i> in der Whole mount in situ Hybridisierung ..... | 40        |
| 4.2.1 Expression in den NF-Stadien 0, 3, 6 und 9 .....                           | 40        |
| 4.2.2 Expression im NF-Stadium 12 .....  | 42        |
| 4.2.3 Expression im NF-Stadium 15 .....  | 43        |
| 4.2.4 Expression im NF-Stadium 18 .....  | 44        |
| 4.2.5 Expression im NF-Stadium 20 .....  | 45        |
| 4.2.6 Expression im NF-Stadium 24 .....  | 45        |
| 4.2.7 Expression im NF-Stadium 27 .....  | 47        |
| 4.2.8 Expression im NF-Stadium 30 .....  | 48        |
| 4.2.9 Expression im NF-Stadium 33 .....  | 49        |
| 4.2.10 Expression im NF-Stadium 36 .....   | 51        |
| 4.3 Expressionsanalyse mittels RT-PCR .....                                      | 51        |
| 4.3.1 RT-PCR von <i>trim29</i> .....   | 52        |
| 4.3.2 RT-PCR von <i>trim36</i> .....   | 52        |
| 4.4 Homologie und Struktur der Proteine in verschiedenen Organismen .....        | 53        |

## Inhaltsverzeichnis

|   |             |
|---|-------------|
| 4.4.1 Homologie und Struktur bezüglich Trim29 .....                                 | 53          |
| 4.4.2 Homologie und Struktur bezüglich Trim36 .....                                 | 55          |
| 4.5 Syntenie- benachbarte Gene und deren Abfolge in verschiedenen Organismen .....  | 59          |
| 4.5.1 Syntenie bezüglich <i>trim29</i> .....  | 59          |
| 4.5.2 Syntenie bezüglich <i>trim36</i> .....  | 60          |
| <b>5. Diskussion</b> .....  | <b>61</b>   |
| 5.1 Bedeutung und Funktion der Tripartite-motif-Familie .....                       | 61          |
| 5.2 Expression von <i>trim29</i> .....  | 62          |
| 5.3 Expression von <i>trim36</i> .....  | 65          |
| 5.4 Korrelation zwischen Ergebnissen der in situ Hybridisierung und der RT-PCR..... | 67          |
| 5.4.1 Korrelation bezüglich <i>trim29</i> .....                                     | 67          |
| 5.4.2 Korrelation bezüglich <i>trim36</i> .....                                     | 68          |
| 5.5 Homologie und Struktur der Proteine in verschiedenen Organismen.....            | 69          |
| 5.5.1 Homologie und Struktur bezüglich Trim29 .....                                 | 69          |
| 5.5.2 Homologie und Struktur bezüglich Trim36 .....                                 | 70          |
| 5.6 Syntenie- benachbarte Gene und deren Abfolge in verschiedenen Organismen .....  | 70          |
| 5.6.1 Syntenie bezüglich <i>trim29</i> .....  | 70          |
| 5.6.2 Syntenie bezüglich <i>trim36</i> .....  | 70          |
| 5.7 Besonderheiten und Schwierigkeiten in der Versuchsdurchführung .....            | 71          |
| <b>6. Zusammenfassung</b> .....   | <b>73</b>   |
| <b>7. Literaturverzeichnis</b> .....  | <b>75</b>   |
| <b>8. Thesen</b> .....  | <b>80</b>   |
| <b>9. Lebenslauf</b> .....  | <b>V</b>    |
| <b>10. Selbständigkeitserklärung</b> .....  | <b>VI</b>   |
| <b>11. Erklärung über frühere Promotionsversuche</b> .....                          | <b>VII</b>  |
| <b>12. Danksagung</b> .....   | <b>VIII</b> |

**Abkürzungsverzeichnis**

|                |  |
|----------------|--|
| APB            | Alkalische Phosphatase-Puffer  |
| ATDC           | Ataxia Telangiectasia Group D Complementing Gene                             |
| BCIP           | 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat p-Toluidinsalz                            |
| BMB            | Boehringer Mannheim Blocking Reagent Nr. 1096176                             |
| BSA            | Bovines Serum-Albumin  |
| CHAPS          | 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propan-sulfonat                      |
| DEPC           | Diethylpyrocarbonat  |
| DNA            | Desoxyribonukleinsäure   |
| DTT            | Dithiothreitol   |
| EDTA           | Ethylendiamintetraessigsäure   |
| FGF            | Fibroblastenwachstumsfaktor  |
| FN3            | Fibronectin 3  |
| dNTP           | Desoxyribunukleosidtriphosphate  |
| FN3            | Fibronectin III  |
| hCG            | Humanes Choriongonadotropin  |
| LPGDS          | Lipocalin-type Prostaglandin D-Synthase                                      |
| MAB            | Maleinsäurepuffer  |
| MBS            | Modified Barth's Solution  |
| MOPS           | 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure   |
| NBT            | Nitroblautetrazoliumchlorid  |
| NF             | <i>Nieuwkoop Faber</i>   |
| PCR            | Polymerase-Ketten-Reaktion   |
| PML            | Promyelotic Leukemia Protein   |
| PVP            | Polyvinylpyrrolidon  |
| RALDH2         | Retinaldehyddehydrogenase 2  |
| RBCC           | RING-Domäne, B-Box-Domäne, Coiled-coil-Domäne                                |
| RING           | Really Interesting New Gene  |
| RNA            | Ribonukleinsäure   |
| RPE            | Retinales Pigmentepithel   |
| RT-PCR         | Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion                              |
| SPRY           | SplA-Kinase und Ryanodine Rezeptor   |
| TNM-Stadium    | Stadieneinteilung bezüglich Tumorgröße, Lymphknotenbefall und Metastasierung |
| Taq-Polymerase | <i>Thermus-aquaticus</i> -Polymerase   |
| TBE-Puffer     | Tris-Borat-EDTA-Puffer   |
| Trim           | Tripartite-motif   |
| Tris           | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan  |
| Tween20        | Polysorbat 20  |
| WMISH          | Whole mount in situ Hybridisierung   |

## **1 Einleitung**

### **1.1 *Xenopus laevis* als Modellorganismus**

Zu den 18 Arten der *Xenopodinae* (Krallenfrösche) gehört unter anderen der afrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis*. Dieser zählt zur Familie der *Pipidae* (zungenlose Frösche), welche sich durch ihre überwiegend aquatile Lebensweise auszeichnen. Dennoch wird *Xenopus laevis* zu den Amphibien gerechnet, denn unter widrigen Bedingungen besitzt er die Möglichkeit, sich auf Landstrecken in seiner natürlichen Umgebung, südlich der *Sahara*, zur nächsten Wasserstelle fortzubewegen.

Besondere Aufmerksamkeit erlangte *Xenopus laevis* Anfang der dreißiger Jahre mit Entdeckung des *Hogben*-Tests. Durch Injektion hCG-haltigen Urins in das Froschweibchen, welches umgangssprachlich als Apothekerfrosch bezeichnet wird, konnte durch Eiablage eine Gravidität nachgewiesen werden.

Die kontrollierte Stimulation zur Eiablage trug zur Etablierung der *Xenopodinae* als Modellorganismen in der Entwicklungsbiologie bei. Die Haltung der überwiegend dämmerungs- bzw. nachtaktiven Frösche bereitet wenige Schwierigkeiten. Sie tolerieren relativ große Temperaturschwankungen. Jahreszeitlich unabhängig kann die Stimulation eines *Xenopus*-Weibchens zur Eiablage von bis zu mehreren hundert Eiern erfolgen. Die Aufzucht der Embryonen nach der Befruchtung gestaltet sich unkompliziert. Die Eier zeichnen sich durch Robustheit und hohe Resistenz gegenüber Infektionen aus. Durch ihre Größe lassen sich unter Auflichtmikroskopie leicht markante Entwicklungszeitpunkte feststellen.

### **1.2 Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis***

Die Entwicklung des Krallenfrosches umfasst sechs Abschnitte (Abb. 1) und gliedert sich in Fertilisation, Furchungsteilungen, Gastrulation, Neurulation, Organogenese und Metamorphose (Newport und Kirschner, 1982).

Vor der Fertilisation legt das Froschweibchen Eier, welche bereits eine Zweiteilung in animalen und vegetativen Pol aufweisen (Newport und Kirschner, 1982). Diese Zweiteilung ist bei pigmentierten Fröschen durch eine pigmentierte und eine nicht pigmentierte Seite sichtbar. Bei Albinofröschen ist die Teilung der Eizellen in zwei Hemisphären nicht sichtbar.

Nach der Befruchtung und Verschmelzung der Zellkerne beginnen die Furchungsteilungen. Hierbei handelt es sich um eine Reihe rasch ablaufender Mitosen. Nach etwa zwölf mitotischen Teilungen nennt man den Embryo Blastula (Newport und Kirschner, 1982). Die Blastula besitzt eine flüssigkeitsgefüllte Höhle, das Blastocoel. Diese wird von vielen Zellen des animalen Pols umhüllt. Am Boden dieser Formation befinden sich die dottergefüllten Zellen des vegetativen Pols.

## Einleitung

Durch Interaktion zwischen den Zellen und daraus resultierender Ausbildung der Keimblätter schließt sich nun die Gastrulation an (Feroze *et al.*, 2014). Aus den einzelnen Keimblättern entwickeln sich im weiteren Verlauf verschiedene Organe. Zellen des Ektoderms bilden sich zu Haut- und Nervengewebe aus. Mesodermales Gewebe wandelt sich zu Muskeln, Knorpel, Knochen und inneren Organen wie Herz oder Niere. Aus entodermalen Zellen resultieren Darm, Lunge und Leber. Die Gastrulation an sich ist durch extreme Umstrukturierungsprozesse gekennzeichnet. Es findet eine Involution meso- und entodermaler Zellen bei gleichzeitiger Expansion ektodermalen Gewebes statt. Die Einstülpung beginnt im Bereich der Blastopore. Durch diesen Vorgang wird das Blastocoel verdrängt und eine neue Körperhöhle, der Urdarm, geformt (Feroze *et al.*, 2014). Im Anschluss an die komplexen Umordnungsprozesse entstehen entlang der bereits früher determinierten Körperachsen, Leitstrukturen, wie die Chorda dorsalis, die zur Entwicklung des Nervensystems beiträgt. Des Weiteren orientieren sich entlang der Chorda dorsalis die Somiten, die den segmentalen Aufbau der Wirbeltiere bedingen.

Nach der Gastrulation folgt der Neurulationsprozess. Aus ektodermalen Zellen an der dorsalen Seite des Embryos entwickelt sich eine Neuralplatte. Die äußeren Abschnitte der Neuralplatte verdicken und formieren sich zu Neuralfalten, welche sich einander annähern und verschmelzen. Resultierend bleibt zentral das Neuralrohr erhalten (Schroeder, 1970). Aus diesen Strukturen bilden sich im weiteren Verlauf Gehirn und Rückenmark. Zwischen Neuralrohr und Epidermis kommt es zur Ausbildung eines multipotenten Zellverbandes mit hoher Migrationsneigung (Hoppler und Wheeler, 2015). Aus dem sogenannten Neuralleistenmaterial entstehen diverse Zellgruppen. Dazu gehören unter anderem sensorische Neurone, sympathische Neurone, Gliazellen (z.B. Schwann-Zellen), Pigmentzellen der Haut, Odontoblasten, glatte Muskelzellen sowie Chondro- und Osteozyten im Kopfbereich des Embryos (Huang *et al.*, 2016).

Während der anschließenden Organogenese entwickeln sich die bereits angelegten Organstrukturen. Hier zeigt sich ein ausgesprochenes Längenwachstum des Embryos. Nach der Organogenese wird der Organismus als Larve bzw. umgangssprachlich als Kaulquappe bezeichnet.

Den letzten Abschnitt der *Xenopus*-Entwicklung stellt die Metamorphose dar. Ausgelöst wird diese Transformation zum adulten Organismus durch Schilddrüsenhormone der Froschlarve (Guihong *et al.*, 2014). Unter anderem bilden sich dabei die Extremitäten und ein knöcherner Schädel anstelle der knorpeligen Vorstufe aus. Ebenfalls schreitet die pulmonale Entwicklung voran. Am Ende der Metamorphose beginnt die Gametogenese. Die Entwicklungsstadien für *Xenopus laevis* wurden bereits 1956 von *Nieuwkoop* und *Faber* detailliert dokumentiert (Abb. 2).

# Einleitung

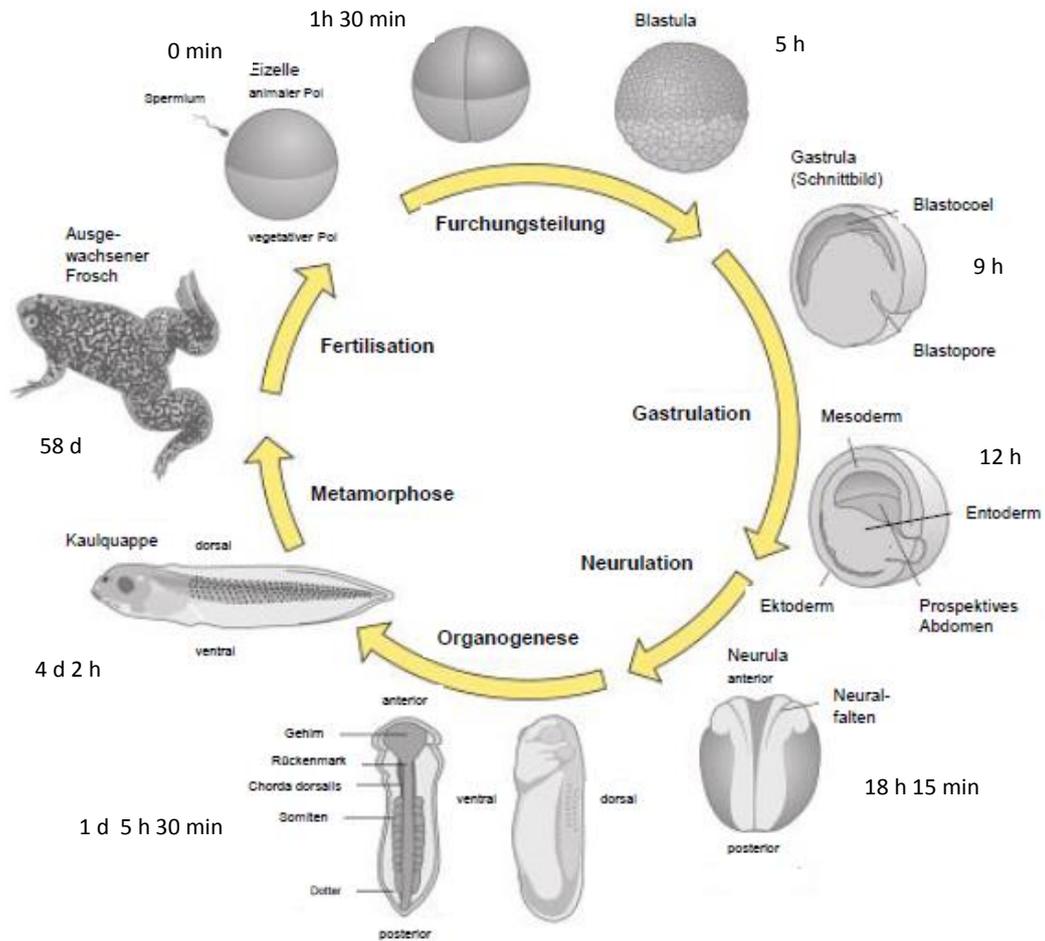


Abb. 1: Entwicklung des *Xenopus laevis* in schematischer Darstellung. Gezeigt werden Fertilisation, Furchungsteilung, Gastrulation, Neurulation, Organogenese sowie Metamorphose. Die angegebenen Zeiten beziehen sich auf die Zeit ab der Befruchtung.

Quelle: modifiziert nach Wolpert *et al.*, 2007

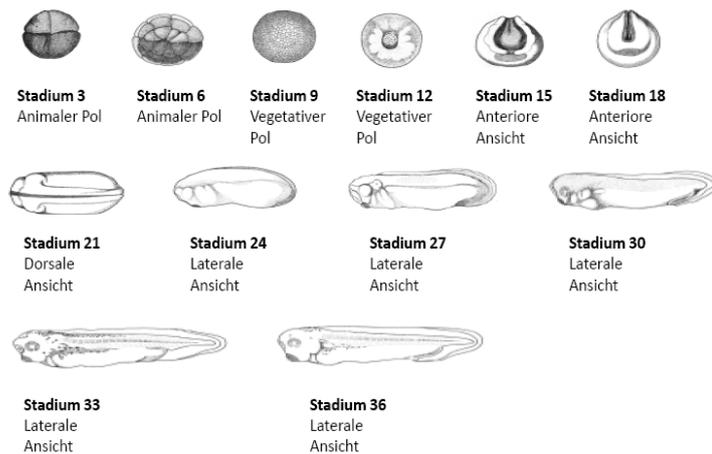


Abb. 2: Relevante Entwicklungsstadien nach *Nieuwkoop and Faber* für die Expressionsanalyse.

Quelle: modifiziert nach <http://www.xenbase.org/anatomy/alldev.do>, 30.10.2014.

### **1.3 Entwicklung der Epidermis, des Nervensystems und des Auges als Derivate des Ektoderms**

Hinsichtlich der hier vorgestellten Expressionsanalyse richtet sich der Focus in Bezug auf die Embryologie vor allem auf die Entwicklung der prospektiven Epidermis, des Nervensystems und der Augenanlage. Die drei Organe stellen wesentliche Keimblattderivate des Ektoderms dar.

Während der Gastrulation bildet sich das Mesoderm zwischen Ento- und Ektoderm aus. Entodermale Anteile stülpen sich ins Innere des Embryos ein. Zeitgleich expandiert das ektodermale Gewebe und formt eine Hülle um den Organismus. (Feroze *et al.*, 2014). Das ektodermale Keimblatt ist generell zweischichtig und besteht aus einer oberflächlichen (apikalen) und einer tiefen (basalen) Schicht. Einzige Ausnahme ist eine bestimmte Region des Neuralrohres, welche nach Stadium 20 einschichtig wird. Das Ektoderm kann in 7 Zonen eingeteilt werden, von denen 5 paarig erscheinen. Die eigentliche Epidermis des Embryos bildet sich unter Einfluss von BMP (Miyagi *et al.*, 2015) aus der lateralen oberflächlichen und der lateralen tiefen Zone (Schroeder, 1970). Unter anderem spielt hierbei der Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF) eine Rolle. In Geweben mit niedrigem Wnt-Spiegel wird die Differenzierung ektodermalen zu neuroektodermalen Gewebes durch Blockade der FGF-vermittelten Hemmung der BMP-Expression verhindert (Wilson und Edlund, 2001).

Das draus resultierende epidermale Gewebe besteht aus einer äußeren Zellschicht, welche aus mucus-sezernierenden Zellen und dazwischenliegenden multiziliären und mitochondrienreichen Zellen besteht und einer inneren Basalzellschicht, welche zum großen Teil undifferenzierte Zellen beinhaltet (Castillo-Briceno und Kodjabachian, 2014). Multiziliäre Zellen beginnen mit ihrer Differenzierung bereits in der Basalzellschicht. Nachdem ihre Vorläuferzellen in den späten Neurulastadien versuchen mit der oberflächlichen Schicht zu interkalieren, bilden sie die typische apikale Oberfläche aus und beginnen mit Ziliogenese. Bei diesem Vorgang ist die Ausbildung der Zellpolarität essentiell. Ein wichtiges Schlüsselprotein zur Ausbildung der apicobasalen Zellpolarität ist Rab11. Die GTPase sei verantwortlich für den Vesikeltransport zur apikalen Zelloberfläche sowie für die Einbindung der ziliären Zellen in die oberflächliche Zellschicht (Kyeongmi *et al.*, 2012). Des Weiteren scheint der Wnt-Signalweg für die Ausbildung der Zellpolarität ausschlaggebend zu sein (Sokol, 2015).

Die Neuralentwicklung beginnt bereits während der Gastrulation durch Ausbildung der Neuralplatte aus ektodermalem Gewebe (Hartenstein, 1989). Die Neuralplatte kann in verschiedene neurale Territorien untergliedert werden (Juraver-Geslin und Durand, 2015). Genauer entwickeln sich aus den vorderen Anteilen der Neuralplatte das Prosencephalon, welches sich weiterhin in Tel- und Diencephalon unterteilen lässt, und aus epichordalen Anteilen, neben dem Rückenmark, das Rhombencephalon und Mesencephalon. Aus der

## Einleitung

Neuralplatte verdicken sich an den lateralen Arealen die Neuralwülste. Diese verschmelzen im Verlauf der Neurulation und generieren zentral die Struktur des Neuralrohrs. Dieser Vorgang wird u.a. durch die Akkumulation von F-Aktin am apikalen Pol der oberflächlichen Neuralzellen vermittelt. F-Aktin ist wie ein Band zwischen den Zellen vernetzt und durch die Actomyosin-Interaktion kann die Zelloberfläche verkleinert werden. Dies führt zur Formänderung der Zellen und somit zur Neuralfaltenbildung und Anneinandernäherung der Neuralfalten (Wilson und Edlund, 2001). Das Neuralrohr liegt dorsal der Chorda dorsalis, welche ein Derivat mesodermaler Zellen darstellt, und wird von ektodermalem Gewebe überdeckt. Im Stadium 20 ist die Ausbildung des Neuralrohres vollendet und es löst sich vom Oberflächenektoderm ab (Schröder, 1970). Die Induktion des Neuralgewebes basiert auf einem, u.a. durch maternales Wnt gesteuerten, Signalzentrum (Popov *et al.*, 2016), dem Spemann-Organisator, welcher sich im Bereich der dorsalen Urmundlippe des Embryos befindet (Cho *et al.*, 1991). Dieser sezerniert BMP-Inhibitoren, wie z.B. Follistatin, Chordin und Noggin, welche zur Differenzierung von neuroektodermalem Gewebe aus ektodermalem Gewebe führen (Wilson und Edlund, 2001). Weiterhin wird über dieses Signalzentrum durch eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren die Ausbildung einer dorsoventralen und anterior-posterioren Körperachse sowie die dorso-ventralen Musterbildung des Embryos beeinflusst (Popov *et al.*, 2016).

Niedrige BMP-Spiegel im Gewebe führen zu einer Differenzierung des Ektoderms ins zentrale Nervensystem, ein hoher Spiegel führt zur Differenzierung in Epidermis. Nebenbei spielen BMP-Gradienten ebenfalls in der Differenzierung des mesodermalen Gewebes eine Rolle. Mit steigendem BMP-Anteil im Gewebe entwickeln sich mesodermale Zellen zur Chorda dorsalis, Skelettmuskel, Nierengewebe oder Blutzellen. Chordin besitzt dabei die Funktion BMP zu binden und so den Gradienten zu regulieren. Chordin wird wiederum von Tolloid, einer Metalloproteinase reguliert (Bier und De Roberts, 2015).

Gewebe mit mäßig hohem Anteil an BMP können sich zu Neuralleistenmaterial entwickeln (Bier und De Roberts, 2015). Die Induktion der Neuralleiste erfolgt durch ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren, welche von umgebenden Geweben (Ektoderm, Neuroepithel, Mesoderm) gebildet werden. Neben BMP spielt auch FGF eine Rolle. Das Schicksal der entstandenen Neuralleistenzellen ist häufig nicht von Beginn an determiniert, sondern wird während der Migration der Zellen durch verschiedene Signale beeinflusst (Mayor und Theveneau, 2013). Die Migration erfolgt in zwei Phasen, zunächst als zusammenhängender Zellverband, später in Form von kleinen Zellformationen oder Individualzellen. Zell-Kontakte werden unter anderem durch E-Cadherin vermittelt. Ebenfalls zeigt sich E-Cadherin neben der Zellkontakthemmung als essentiell bei der gerichteten Bewegung der Neuralleistenzellen (Huang *et al.*, 2016). Die Neuralleistenzellen unterliegen zum Teil der epithelialen-

## Einleitung

mesenchymalen Transition (Hoppler und Wheeler, 2015). Daher können verschiedene Zellen, wie beispielsweise Gliazellen, Chondrozyten oder Odontoblasten entstehen.

Im Bereich der anterioren Neuralplatte entwickeln sich des Weiteren ektodermale Verdickungen, aus welchen u.a. paarige sensorische Organe entwickeln. Induziert wird die Bildung solcher Plakoden durch Retinsäure. Die Retinsäure wird entweder lokal im Bereich der anterioren Neuralplatte durch RALDH<sub>2</sub> gebildet oder durch LPGDS dort hin transportiert. Beide Proteine werden wiederum durch Zic1 induziert (Jaurena *et al.*, 2015). Die Plakoden werden erst ab Stadium 22 morphologisch sichtbar. Man unterscheidet hier zwischen der olfaktorischen, der Plakode der Adenohypophyse, der Ohrenplakode und der Linsenplakode (Schlosser, 2014).

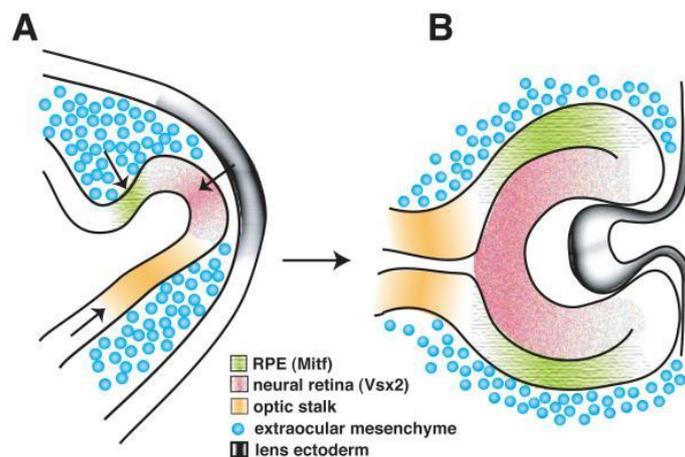


Abb. 3: Schematische Darstellung der Augenentwicklung.

A) zeigt das Augenvesikel mit prospektiven Anteilen des retinalen Pigmentepithels (RPE), der neurosensorischen Retina (neural retina) und des Sehnervs (optic stalk). B) zeigt die Ausbildung des Augenbechers durch Einstülpung der Linsenanlage (lens ectoderm) und den daraus resultierenden zweischichtigen Aufbau der Retina.

Quelle: Fuhrmann, 2010

Die Ausbildung der eigentlichen Linse ist durch Induktionsvorgänge geprägt. Durch BMP-Antagonisten, wie Chordin, Noggin oder Follistatin werden in der Vorderhirnregion Transkriptionsfaktoren induziert. Hierzu gehören u.a. ET (eye T-Box), Rx und Pax6. Durch diese werden weitere Signalmoleküle reguliert (Six3, Lhx2, Optx2), was zur späteren Ausbildung des Augenfeldes im Diencephalon führt (Luehders *et al.*, 2015). Wichtiger Schlüsselfaktor in der Linsen- bzw. Augenentwicklung stellt das Gen *pax6* dar. Um eine Linsenbildung durch ein Signal des Augenbläschens induzieren zu können, muss *pax6* im ektodermalen Gewebe des prospektiven Linsenbereiches exprimiert sein (Cvekl und Tamm, 2004). Das Auge entwickelt sich demnach aus ektodermalen und neuroektodermalen Bestandteilen. Als Derivat des Neuroektoderms formiert sich zunächst ein Augenbläschen, welches eine Ausstülpung des Diencephalons darstellt. Aus dem Augenbläschen bildet sich durch Einstülpung der Linsenplakode ein Augenbecher (Abb. 3).

## Einleitung

Die Einstülpung des Augenbechers führt zunächst zum Aufbau einer zweischichtigen Anlage aus einer inneren neurosensorischen Retina und aus dem äußeren retinalen Pigmentepithel. Ventral zur sensorischen Retina liegt vor Ausbildung des Glaskörpers die Linsenanlage, welche wiederum von ektodermalem Gewebe bedeckt wird (Adler und Canto-Soler, 2007). Die Ausbildung der eigentlichen Cornea beginnt um das NF-Stadium 30 mit der Migration von Neuralleistenmaterial zwischen Epidermis und Linse. (Wanzhou *et. al.*, 2013). Der grundsätzliche Aufbau des Auges ist damit vollendet.

### 1.4 Ubiquitinierung mit Focus auf die E3-Ligasen

Der Prozess der Ubiquitinierung, wie in Abbildung 4 gezeigt, stellt eine Form der posttranslationalen Modifikation dar. Von zentraler Bedeutung zeigt sich dabei das in allen eukaryotischen Zellen vorkommende Protein Ubiquitin. In einem dreistufigen Vorgang wird Ubiquitin auf sein Zielprotein übertragen.

Zunächst wird Ubiquitin durch ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1) aktiviert. Dabei bildet sich unter Spaltung von Adenosintriphosphat eine Thioesterbindung zwischen einer Carboxygruppe des Proteins und einem Cystein des aktivierenden Enzyms aus. Ubiquitin wird im zweiten Schritt auf einen Cystein-Rest des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) übertragen. Im letzten Schritt interagiert die Ubiquitin-Ligase (E3) mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym (E2) und dem Substrat und überträgt dabei das Protein Ubiquitin auf einen Lysin-Rest des Zielproteins (Meroni und Diez-Roux, 2005).

Es werden immer wieder neue Ubiquitin-Ligasen beschrieben. Im menschlichen Genom geht man von ca. 617 E3-Ligasen aus (Li *et al.*, 2008).

Je nach Länge der Ubiquitinkette am Zielprotein erfüllt die Ubiquitinierung verschiedene Aufgaben. Während Mono- oder Di-Ubiquitinierung eher eine Rolle bei der Endozytose spielen, führt eine Polyubiquitinierung zu einem proteasomalen Abbau bzw. unter Umständen auch zu einem lysosomalen Abbau (Meroni und Diez-Roux, 2005). Fehlgefaltete Proteine können auf diesem Weg der posttranslationalen Modifikation abgebaut werden.

Bei der Zellzyklusregulation spielt die Markierung mit Ubiquitin ebenfalls eine Rolle. Über Ubiquitinierung wird der Abbau von Cyclin E, einem wichtigen Protein der Zellzyklusregulation, gesteuert (Brandt *et al.*, 2011). Desweiteren kann über Ubiquitinierung eine Transkriptionskontrolle über die Modifizierung von Histonen erfolgen (Kim und Roeder, 2011). Darüber hinaus wird die Aktivität von NF- $\kappa$ B, eines essentiellen Transkriptionsfaktors, über die Ubiquitinierung reguliert (Shigetsugu *et al.*, 1999). Hierbei werden Proteine der I $\kappa$ B-Familie, welche für den Abbau von NF- $\kappa$ B verantwortlich sind, über Ubiquitinierung dem 26S-Proteasom zum Abbau zugeführt. Daraus resultiere eine vermehrte Aktivität von NF- $\kappa$ B im Zellkern (Zhijian und Lijun, 2009).

## Einleitung

Bezüglich des menschlichen Organismus ist bereits einiges hinsichtlich Erkrankungen, verursacht durch Mutationen in Genen, die für E3-Ligasen kodieren, bekannt. So wird beispielsweise das Angelman-Syndrom durch Mutation der E3-Ligase Ube3A (Greer et al., 2010), das von Hippel-Lindau-Syndrom durch Mutation des VHL-Genes, als Teil einer E3-Ligase (Doonachar *et al.*, 2015) und eine familiäre Form des Parkinson-Syndroms durch Mutation der E3-Ligase Parkin (Kazlauskaitė und Mugit, 2015), verursacht.

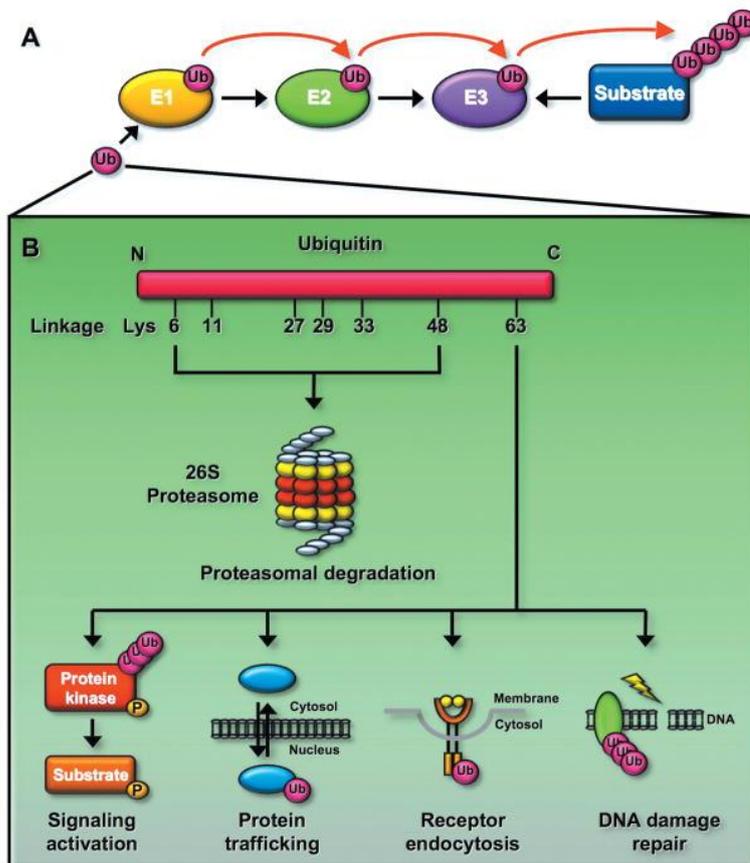


Abb. 4: Überblick über den Ubiquitinierungsprozess und dessen Aufgaben.

(A) zeigt den Ablauf der Ubiquitinierung.

(B) zeigt schematisch die Stellen von Lysin in der Aminosäuresequenz von Ubiquitin und weist auf die jeweilige Funktion des Lysins an Stelle x hin.

Quelle: Yang *et al.*, 2011

### 1.5 Tripartite-motif-Proteine

Die Tripartite-motif-Proteine erhielten ihren Namen aufgrund ihres charakteristischen Aufbaus aus den drei konservierten Strukturen RING-Finger-Domäne, B-Box und der Coiled-coil-Domäne. Daher werden Trim-Proteine häufig als RBCC-Proteine bezeichnet. Derzeit werden 70 Mitglieder zu dieser Familie gezählt (Horie-Inoue, 2013).

Die RING-Domäne beschreibt keine ringförmige Struktur, sondern steht für die Abkürzung von „really interesting new gene“ und wurde ursprünglich auch A-Box genannt. Gekennzeichnet wird diese Struktur durch die Bindung von typischerweise zwei Zinkionen, welche dann zur

## Einleitung

Ausbildung der fingerförmigen Aminosäurestrukturen führen. In Abhängigkeit vom Aufbau der Aminosäuresequenz verfügen die RING-Finger über die Möglichkeit der Bindung von DNA, RNA, Proteinen und auch Lipiden. Sie besitzen eine große Bedeutung als Bestandteil von E3-Ligasen im Ubiquitinlierungsprozess.

Ebenfalls wird die B-Box-Domäne durch Bindung von Zinkionen über die Aminosäuren Cystein und Histidin charakterisiert (Meroni und Diez-Roux, 2005). Es können jedoch auch andere Metalle gebunden werden. Die Ausbildung koordinativer Bindungen zwischen dem jeweiligen Metallion und den Aminosäuren Histidin und Cystein resultiert in einer schleifenförmigen Struktur der B-Box-Domäne, welche die Bindung verschiedener Zielstrukturen ermöglicht (Meroni und Diez-Roux, 2005). Es existieren zwei verschiedene Arten von B-Box-Domänen. Trim-Proteine mit typischer Struktur enthalten eine Typ-2-B-Box-Domäne. Teilweise folgen zwei B-Box-Domänen aufeinander, wobei es sich bei der letzteren um eine Typ-1-B-Box-Domäne handelt (Short und Cox, 2006).

Coiled-coil-Domänen hingegen bestehen aus zwei bis sieben Alpha-Helices. Diese sind nochmals spiralg ineinander verwunden und daher sehr stabil. Als besonders zeigt sich in solchen Domänen ein Heptadenmuster (Meroni und Diez-Roux, 2005), bestehend aus Abschnitten, von jeweils sieben Aminosäuren. Hydrophobe Aminosäurereste befinden sich jeweils an der ersten und vierten Aminosäure eines solchen Abschnittes. Die Funktionen der Coiled-coil-Domänen sind vielfältig. Unter anderem sind sie ein wichtiges Element im Rahmen der Homo-, Heterodimerbildung (Horie-Inoue, 2013) bzw. Multimerbildung (Van der Aa *et al.*, 2009).

An die beschriebene Grundstruktur schließen sich jeweils ein bis zwei C-terminale Domänen an, die für jedes Trim-Protein spezifisch sind (Nisole *et al.*, 2005). Diese Domänen seien wesentlich an der Interaktion von Trim-Proteinen untereinander sowie zwischen Trim-Proteinen und anderen Proteinen beteiligt. Anhand der C-terminalen Domänen sowie unter Betrachtung des Gesamtaufbaus kann eine Klassifikation der Trim-Proteine in neun Gruppen vorgenommen werden. Typische C-terminale Domänen sind B30.2, SPRY, PRY oder FN3 (Boudinot *et al.*, 2011). Zu zwei Dritteln besitzen die Trim-Proteine eine PRY-SPRY-Domäne, welches eine immunglobulinähnliche Faltung ermöglicht (Napolitano und Meroni, 2012). Eine Subklasse der Trim-Proteine, TIF1 (transcriptional intermediary factor), besitzt eine C-terminale Domäne namens (PHD)-Bromo. Diese besitzt die Fähigkeit Chromatin zu binden. Hierdurch kann eine Transkriptionskontrolle vermittelt werden (Napolitano und Meroni, 2012). Einer weiteren Subklasse, der Trim-NHL-Proteine, wird auf Grund der zusätzlichen NHL-Domäne eine Funktion in der mRNA-Kontrolle zugeschrieben (Tocchini und Ciosk, 2015).

Strukturbedingt werden den Mitgliedern der Trim-Familie diverse Aufgaben zugeordnet. Im Vordergrund steht dabei die Funktion dieser Proteine als E3-Ligasen beim Ubiquitinierungsprozess. Diese wird vordergründig durch die RING-Domäne bedingt. Die

## Einleitung

Ubiquitinierung stellt eine wichtige Form der posttranslationalen Modifikation dar und führt zum proteasomalen Abbau von Proteinen (Meroni und Diez-Roux, 2005). Hierbei wird Ubiquitin meist an Lysin48 gebunden (Napolitano und Meroni, 2012). In Zusammenhang mit der Ubiquitinierung stehen wahrscheinlich auch weitere Funktionen der Tripartite-motif-Proteine wie Apoptose, Regulation des Zellzyklus, Differenzierung von Zellen, Meiose, Vesikeltransport, Abwehr (Meroni und Diez-Roux, 2005), endosomale Sortierung, diverse Signalwege, Histon- und Transkriptionskontrolle (Napolitano und Meroni, 2012). Eine Bindung von Ubiquitin an Lysin63 wird in Zusammenhang mit dem NF- $\kappa$ B-Signalweg, DNA-Reparatur und Lysosommarkierung gesehen (Napolitano und Meroni, 2012).

Die Bedeutung der RBCC-Proteine im menschlichen Organismus ist für einige Mitglieder bereits bekannt. Um die Vielfalt hinsichtlich der Funktionen zu verdeutlichen, werden im Folgenden einige Beispiele beschrieben.

Trim-Proteine zeigen innerhalb des Immunsystems verschiedene Funktionen. Über diverse Mechanismen kann die Autophagozytose reguliert werden. Interaktionen zwischen Trim-Proteinen und Autophagiefaktoren, beispielsweise zwischen Trim5, Trim6, Trim17, Trim22 oder Trim49 und ULK1 bzw. Beclin, führen zur Komplexbildung zwischen ULK1 und Beclin und regulieren dadurch die Autophagozytose. Trim5 $\alpha$  kann durch seine C-terminale SPRY-Domäne direkt an virales Kapsid binden, was eine selektive Autophagie vermittelt (Mandell et al., 2014). Trim-Proteine werden zum Teil als spezialisierte Rezeptoren für Autophagozytose im Sinne einer neuen Rezeptoren-Klasse beschrieben. Die Proteine seien dabei Schlüsselkomponenten in der Erkennung des Inflammosoms und daher wichtig für die angeborene Immunabwehr (Kimura *et al.*, 2015). Einerseits können Trim-Proteine u.a. Zytokine als Baustein des Immunsystems induzieren (Rajsbaum *et al.*, 2013). Andererseits zeigten Studien, dass Trim-Proteine durch Interferon I oder II hochreguliert werden können (Koba et al., 2013).

Trim13, Trim19, Trim24 und Trim28 können beispielsweise die Stabilität und Transkription von p53, einem Tumorsuppressorgen regulieren (Hatakeyama, 2011).

Durch Mutation in den zugehörigen Genen werden zum einen genetisch bedingte Syndrome, zum anderen aber auch die Karzinogenese in bestimmten Geweben ausgelöst.

Eine Mutation im Gen von *TRIM18* steht in Zusammenhang mit dem x-chromosomal vererbten *Opitz*-Syndrom (Quaderi *et al.*, 1997). *TRIM18* spiele im intakten Zustand eine wichtige Rolle in der Mikrotubuli-Interaktion (Short *et al.*, 2002). Das *Perheentupa*-Syndrom, welches Muskeln, Leber, Gehirn und Augen betrifft, wird durch eine Mutation von *TRIM37* ausgelöst (Jaqiello *et al.*, 2003).

## 1.6 Trim29

*Trim29* gehört zur Familie der Tripartite-motif-Proteine. Jedoch unterscheidet sich das 497 Aminosäuren lange Protein in seinem Aufbau von der charakteristischen Grundstruktur der RBCC-Proteine. Wie in Abbildung 5 ersichtlich besitzt Trim29 keine RING-Domäne. Des Weiteren existieren ein bis zwei B-Box-Domänen. Danach schließt sich eine prospektive Coiled-coil-Domäne an (Nisole *et al.*, 2005).

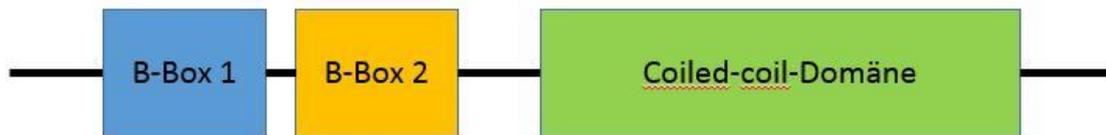


Abb. 5: schematischer Aufbau von Trim29

Über die Expression und Funktion von *trim29* im Modellorganismus *Xenopus laevis* liegen keine Ergebnisse vor.

Funktionell agiere Trim29 bei der DNA-Reparatur. Trim29 ist hier als histonbindendes Protein verantwortlich für die Einlagerung von DNA-Reparaturproteinen in das Chromatin. Das Protein ist Teil des DNA-Reparatur-Komplexes bestehend aus BASC, Cohesion, DNA-PKC und Tip60. Des Weiteren sei Trim29 auch an der Signalkaskade zur Signalisierung von DNA-Schäden beteiligt (Masuda *et al.*, 2015).

Beim Menschen befindet sich *TRIM29* auf Chromosom 11q23 und wird in Plazenta-, Lungen-, Thymus-, Prostata-, Hoden- und Colongewebe exprimiert (Zhou *et al.*, 2012).

*TRIM29* wird beim Menschen auch als „*Ataxia Telangiectasia Group D Complementing Gene*“ bezeichnet. Eine Mutation des Gens führt zur *Ataxia teleangiectasia*, welche auch als *Louis-Bar-Syndrom* bekannt ist. Diese Erkrankung ist gekennzeichnet durch eine verminderte Immunabwehr, neurologische Degenerationsvorgänge, Auffälligkeiten in der Entwicklung, wie eine im Kindesalter beginnende Ataxie, Athetose, Nystagmus sowie eine Dysarthrie (Sho *et al.*, 2011).

Von besonderer Bedeutung scheint *TRIM29* bei der Karzinogenese zu sein. Es wird sowohl von einer Hochregulierung als auch von einer verminderten Expression des Gens, je nach Ausgangsorgan des malignen Prozesses, berichtet. Eine Überexpression zeigte sich beispielsweise bei malignen Tumoren der Blase, des Colons, des Rektums, der Ovarien und des Endometriums sowie beim multiplen Myelom (Sho *et al.*, 2011). Da sowohl eine Überexpression als auch eine verminderte Expression Einfluss auf die Karzinogenese diverser Tumore besitzt, lässt daher eine Funktion des Gens, abhängig von der Einbindung in verschiedene zelluläre Signalwege, vermuten (Wang *et al.*, 2009). Trim 29 kann die Transkription verschiedener Gene beeinflussen und so als Tumorsuppressor oder Onkogen wirken (Xu *et al.*, 2016).

## Einleitung

Sho *et al.* zeigten 2011, als eine mögliche Erklärung für die Involvierung von *TRIM29* in die Karzinogenese, einen Signalweg auf, bei dem *TRIM29* über das Protein *TIP60* die durch *p53* induzierbare Apoptose hemmt. *Tip60* besitzt bei der Apoptoseinduktion die Aufgabe *p53* an Lysin *K120* zu acetylieren. Nachdem Sho *et al.* herausfanden, dass *Tip60* und *TRIM29* eine Kolokalisation aufweisen, konnten sie mittels UV-Licht-geschädigter Zelllinien nachweisen, dass *TRIM29* über Inhibition von *TIP60*, die Apoptoseinduktion vermindern kann. Ein vollständiges Verhindern der Apoptose durch Überexpression von *TRIM29* konnte jedoch nicht bestätigt werden. Dennoch kann *TRIM29* eine Funktion in der Regulation vom Tumorsuppressorprotein *p53* zugeschrieben werden (Sho *et al.*, 2011).

Yang zeigte 2015, dass *Trim29* als Trim-Protein ohne RING-Domäne über den Interaktionspartner *RNF8*, ebenfalls eine Ubiquitin-Ligase, die Möglichkeit besitzt eine Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung in Zellen zu erzeugen.

Weiterhin untersucht wurde unter anderem die Expression von *TRIM29* in Pankreaskarzinomen, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Magenkarzinomen, östrogenrezeptorpositiven Mamma-Karzinomen, Zervixkarzinomen und Blasenkarzinomen.

Wang *et al.* berichten 2009 über eine Überexpression von *TRIM29* in den meisten Pankreaskarzinomen sowie in Vorläuferläsionen. Es wird eine Funktion im Wachstum von Adenokarzinomzellen des Pankreas in Zusammenhang mit der Aktivierung des *Wnt/β-Catenin*-Signalweges vermutet (Wang *et al.*, 2009).

Untersucht wurden hingehend der Rolle von *TRIM29* auch nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome. Ebenfalls war das Gen hier überexprimiert. In Plattenepithelkarzinomen, einer Unterform des Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms, korrelierte die Expression von *TRIM29* positiv mit dem TNM-Stadium, dem histologischen Grading, einem positiven Lymphknotenbefall und einer abnormen *β-Catenin*-Expression (Zhou *et al.*, 2012). Der Zusammenhang in Adenokarzinomen zeigte sich genauso bis auf die abnorme *β-Catenin*-Expression. Daher stelle die Expression von *TRIM29* in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen einen negativen Prädiktor für die Prognose dar (Zhou *et al.*, 2012). Zhou *et al.* schließen außerdem auf ähnliche Signalwege bezüglich *TRIM29* und dessen Einbindung in die Karzinogenese von Plattenepithelkarzinomen der Lunge und Adenokarzinomen des Pankreas.

Des Weiteren wurden 2012 Untersuchungen von Zhao *et al.* zur Expression von *TRIM29* in Magenkarzinomgewebe aus einer präoperativen Gastroskopie durchgeführt. Hier kamen die Autoren zum Schluss, dass *TRIM29* vermehrt exprimiert wird, wenn auch Lymphknotenmetastasen vorhanden sind. Patienten mit einer hohen Expressionsrate von *TRIM29* zeigten eine schlechtere Prognose als Patienten mit einer niedrigen Expression des Gens (Zhao *et al.*, 2012). Kosaka *et al.* postulierten bereits 2007, dass die Expression von *TRIM29* in starken Zusammenhang mit der Tumorgröße, dem histologischen Grading und der

## Einleitung

Invasivität des Tumors ins umliegende Gewebe steht. Ebenfalls wird hier ein Zusammenhang mit dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg vermutet (Qui *et al.*, 2015).

Auf der anderen Seite wiesen Liu *et al.* die Funktion von TRIM29 als Tumorsuppressor in östrogenrezeptorpositiven sowie östrogenrezeptornegativen Brustzell-Linien nach. Ein Ausschalten von TRIM29 resultiert in Zellveränderungen wie Polaritätsverlust, erhöhte Proliferation und eine verstärkte Fähigkeit zur Migration und Invasion (Liu *et al.*, 2012). Das Einführen von TRIM29 in eine östrogenrezeptorpositive Zelllinie resultierte in einem weniger aggressiven Phänotyp. Die Autoren vermuten, dass ein Verlust von TRIM29 in normalen luminalen Brustzellen zu einer Umwandlung in maligne Tumorzellen beitragen könne. Dies liege in einer Interaktion von TRIM29 im Östrogensignalweg begründet. Darüber hinaus führe der Verlust von TRIM29 bei prämenopausalen Frauen, die an einem östrogenrezeptorpositiven Mamma-Karzinom erkrankt sind, zu einer weiteren Progression der Erkrankung (Liu *et al.*, 2012).

Hinsichtlich des Zerixkarzinoms scheint TRIM29 als Onkogen zu wirken. TRIM29 gilt hier als negativ prognostischer Faktor. Das Protein fördert Proliferation, Migration, Invasion und epitheliale-mesenchymale Transition. Die vermehrte epitheliale-mesenchymale Transition stünde in Zusammenhang mit einer Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges (Xu *et al.*, 2016). Die Migration und Invasion der Tumorzellen kann über die Regulation der Expression von Zelladhäsionsmolekülen (Integrine) durch TRIM29 beeinflusst werden (Masuda *et al.*; 2015)

In Bezug auf Blasenkarzinome führt eine Überexpression von TRIM29 zur vermehrten Expression von Cyclinen und Bcl. Dadurch kann die medikamenteninduzierte Apoptose gehemmt werden. Dies wird wahrscheinlich über die Proteinkinase C und den NF- $\kappa$ B-Signalweg realisiert (Tan *et al.*, 2016).

### 1.7 Trim36

Tripartite-motif-Protein36 besitzt wie die meisten Proteine dieser Familie einen charakteristischen Aufbau aus RING-Domäne, zwei B-Boxes und einer prospektiven Coiled-coil-Struktur. Im Anschluss an die typische Trim-Struktur finden sich im menschlichen Organismus bei Trim36 zwei weitere Domänen, Fibronektin III (FN3) sowie SPRY (Yoshigai *et al.*, 2009).

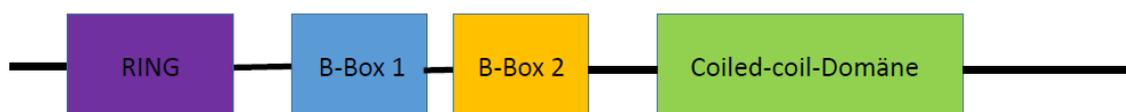


Abb. 6: schematischer Aufbau von Trim36

## Einleitung

Den SPRY-Domänen wird eine Funktion hinsichtlich der Bindung von RNA zugeschrieben (Rajsbaum *et al.*, 2013). Daher wäre eine Rolle in Bezug auf RNA-Regulation denkbar. Die Fibronectin III- Domäne könne DNA binden (Mandell *et al.*, 2014) was auf die Fähigkeit zur DNA-Regulation schließen lässt.

Hinsichtlich Expression und Funktion sind derzeit bereits einige Fakten über das 733-Aminosäuren-lange Protein bekannt. In den Organismen *Xenopus*, Maus und Mensch wurden verschiedene Expressionsorte beschrieben und Annahmen über die Funktion des Proteins in bestimmten Geweben getroffen.

Cuykendall und Houston zeigten 2009 im *Xenopus laevis* mittels PCR eine Expression des Gens in den NF-Stadien 5, 10, 11, 12, 15, 20 und 30. In der whole mount in situ Hybridisierung ließ sich eine Expression bereits in der unbefruchteten Oozyte erkennen. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit eine Anreicherung von Trim36 im vegetativen Pol während der Furchungsteilungen beschrieben. Unterbrochen wurde die Farbanreicherung in dotterfreien Arealen in den Teilungsfurchen. In Stadien der Neurulation bzw. im Larvenstadium zeigte sich eine Expression im Neuralrohr, Mes- und Rhombenzephalon (Cuykendall und Houston, 2009).

Die vegetative Expression von *trim36* wurde 2013 durch Mei erneut in Bezug auf ein weiteres Protein, Dead-end1 (Dnd1), erneut untersucht. Dnd1 stünde in Zusammenhang mit der regionalen Verteilung von Trim36, da Trim36 Zielprotein von Dnd1 ist und an dieses direkt bindet. Bei Dnd1-Funktionsverluststudien zeigten sich Defekte im Mikrotubulisystem. Trim36 diene hier als Regulator der Mikrotubuliformation und des mikrotubuliassoziierten Transportsystems (Mei *et al.*, 2013). Trim36 reguliere das Wachstum am Mikrotubuli-Plus-Ende und sei ein wichtiger Baustein in der mikrotubuliassoziierten Cortexrotation (Olson *et al.*, 2015)

Aufgrund der Expression in unbefruchteten Oozyten wurde der Versuch unternommen, maternal exprimiertes *trim36* zu depletieren. Die Embryonen entwickelten sich bis zur Gastrulation weitestgehend normal. Erst bei der Bildung der Neuralplatte verlief die Entwicklung auffällig. Anstatt dieser Struktur bildeten die Embryonen große Zysten und schienen in ihrer Körperstruktur ventralisiert zu sein (Cuykendall und Houston, 2009). Des Weiteren wurde bei Trim36-depletierten Embryonen der Marker Eomesodermin untersucht, welcher charakteristisch für die Chorda dorsalis ist. Dieser konnte in Trim36-depletierten Embryonen nicht mehr nachgewiesen werden. Das Protein Myod, welches einen Marker für Somiten darstellt, war in diesen Embryonen ebenfalls reduziert (Cuykendall und Houston, 2009). Funktionell schreiben die beiden Autoren Trim36 eine Rolle in Bezug auf die Regulation der vegetativen Microtubuli-Formation zu. Das Protein wäre hierbei unabdingbar in seiner Ubiquitin-Ligase-Aktivität für die Mikrotubulipolymerisation.

Miyajima *et al.* zeigten im Jahr 2009 mittels Immunfluoreszenzanalyse eine gemeinsame Lokalisierung von Trim36 und alpha-Tubulin, welches Bestandteil des Microtubuliapparates ist.

## Einleitung

Eine Überexpression des Proteins führe zu einer Verlangsamung des Zellzyklus sowie einem verminderten Zellwachstum (Miyajima *et al.*, 2009). Die Autoren vermuten aufgrund der Lokalisierung des Proteins einen Zusammenhang zur Chromosomensegregation.

Yoshigai *et al.* hingegen zeigten in ihrer Expressionsanalyse mittels whole mount in situ Hybridisierung Transkripte in den posterioren Somiten. Fokussiert auf diese Region stellten die Autoren in Trim36-Funktionsverluststudien eine Verringerung der Körperlänge sowie Deformitäten der Somitenstruktur fest. Dahingehend lässt sich eine Funktion von Trim36 in der Entwicklung und Anordnung der Somiten vermuten (Yoshigai *et al.*, 2009).

Ebenso wird *trim36* in adulten Keimzellen exprimiert und ist in die Akrosomenreaktion involviert (Kitamura *et al.*, 2003). Ein Nachweis von Trim36 in Spermatiden und Spermien des murinen Organismus gelang nach Abschluss der meiotischen Teilung. Erfolgte eine Akrosomenreaktion, zeigt sich danach keine Expression mehr. Nach Blockade der RING-Struktur des Proteins mittels spezifischer Antikörper besitzt das Spermium zwar weiter die Möglichkeit, eine Eizelle zu penetrieren, jedoch unterbleibt die Akrosomenreaktion. Aus diesem Zusammenhang lässt sich auf eine essentielle Funktion von Trim36 hinsichtlich der Fertilisation schließen (Kitamura *et al.*, 2003).

Homologe TRIM36-Proteine existieren auch im menschlichen Organismus. *TRIM36* wird hier in Gehirn, Hoden, Prostata, Niere, Herz und Lunge exprimiert (Balint *et al.*, 2004). Auffällig erscheint hier eine Überexpression von *TRIM36* bei Prostatakarzinomen. Ein Zusammenhang mit der Karzinogenese wird daher vermutet (Balint *et al.*, 2004).

Zusammenfassend zeigt sich Trim36 in Lokalisation und Funktion als sehr vielfältiges Protein. Im Modellorganismus ließ sich bereits eine maternale Expression, eine Expression in der vegetativen Hemisphäre während der Furchungsteilungen sowie eine Expression in neuralen Strukturen während der Neurulation und in den Larvenstadien zeigen. In seiner Rolle als Ubiquitin-Ligase beeinflusst Trim36 die Mikrotubuli-Polymerisation und damit auch die Chromosomensegregation und den Zellzyklus. Des Weiteren spielt das Protein im *Xenopus laevis* eine weittragende Rolle bei der Bildung der Neuralplatte und daraus resultierenden Strukturen des zentralen Nervensystems. Die Anordnung und Organisation der Somiten wird ebenfalls durch Trim36 beeinflusst. Bei Experimenten im Mausorganismus zeigte sich eine Expression von *trim36* in Spermien und eine Rolle im Rahmen der Akrosomenreaktion (Kitamura *et al.*, 2005).

## **2 Zielsetzung**

Trim-Proteinen kann zunehmend eine Bedeutung in verschiedenen zellulären Prozessen zugeschrieben werden.

Es zeigt sich eine vielseitige Datenlage hinsichtlich der Funktion von TRIM29 im menschlichen Organismus. Nachgewiesen werden konnten bisher Funktionen bezüglich viraler Abwehr und Kanzerogenese. Eine Analyse der Genexpression im embryonalen Gewebe ist beim Menschen aus ethischen Gründen nicht möglich. Eine derartige Analyse wäre jedoch wichtig, um Einblicke in das reguläre Expressionsverhalten im Embryo zu gewinnen und Anhaltspunkte für eventuelle Einbindung in Signalwege zu erlangen. *Xenopus laevis* dient hier als Modellorganismus. Hiermit kann die Rolle von *trim29* in der Embryonalentwicklung analysiert werden.

Für *trim36* wurden bereits Expressionsanalysen in verschiedenen Entwicklungsstadien des *Xenopus laevis* durchgeführt. Neben der vegetativen Expression wurde eine Expression im Neuralgewebe beschrieben. Eine genaue Analyse bezüglich des Nervengewebes existiert bisher nicht. Die Aufgabe besteht hier darin, die vorhandenen Ergebnisse nachzuvollziehen und die Analyse insbesondere auf die Expression des Gens während des Neurulationsprozesses und in den Larvenstadien zu focussieren.

Ziel der Arbeit ist es, mit der Expressionsanalyse von *trim29* und *trim36* die Aktivität der Gene in der Embryonalentwicklung des Modellorganismus' *Xenopus laevis* nachzuvollziehen. Dabei soll sowohl die zeitliche als auch die örtliche Expression der Gene während der Embryonalentwicklung betrachtet werden.

Die Untersuchung der Genaktivität zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten erfolgt mittels semiquantitativer Reverser-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion und in situ Hybridisierung ganzer Embryonen. Dafür werden Embryonen in definierten Entwicklungsstadien verwendet.

Die Analyse bietet die Möglichkeit, die Gene genauer in die große Familie der Tripartite-motif-Proteine einzuordnen. Des Weiteren soll ein Vergleich mit Studien zur Expression im menschlichen Organismus erfolgen.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Der Modellorganismus *Xenopus laevis***

Als Versuchstier diente der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis*. Für die Versuchsdurchführungen wurden sowohl pigmentierte Frösche als auch Albinofrösche verwendet.

##### **3.1.2 Chemikalien**

|  |               |
|--|---------------|
| Acetanhydrid   | Sigma         |
| Agarose  | Roth®         |
| Albumin, Bovine Serum (BSA)  | Sigma         |
| Beta-Mercaptoethanol   | Sigma         |
| 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP)                          | Fermentas     |
| Bromphenolblau   | Merck         |
| CHAPS  | Roth®         |
| Chloroform   | Merck         |
| L-Cysteinhydrochloride   | Roth®         |
| 10 mM dNTP mix   | Fermentas     |
| DIG RNA Labeling Mix   | Roche         |
| Diethylpyrocarbonat (DEPC)   | Sigma         |
| Dimethyl-Formamid (DMF)  | Roth®         |
| DNA Ladder, O'GeneRuler™ 1kb, 500bp                                  | Fermentas     |
| dNTP-Mix (10mM)  | Invitrogen™   |
| DTT (0,1M)   | Invitrogen™   |
| Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure (EDTA)                               | Sigma         |
| Ethylen-Glycol-Tetra-Essigsäure (EGTA)                               | Sigma         |
| Essigsäure   | Roth®         |
| Ethanol (99 %)   | Roth®         |
| Ethidiumbromid   | Q-Biogene     |
| Ficoll™  | GE Healthcare |
| First-Strand-Puffer (5x)   | Invitrogen™   |
| Formaldehyd  | Roth®         |
| Formamid   | Roth®         |
| Gelatin  | Roth®         |
| Glutardialdehyd-Lösung   | Sigma         |
| Fetales Kälberserum (FCS)  | Biochrom AG   |
| Glycerol   | Roth®         |
| Isopropanol  | Roth®         |
| Kaliumdihydrogenphosphat   | Roth®         |
| Kalium hexacyano-ferrate (III) (K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> ) | Sigma         |
| Kaliumchlorid  | Roth®         |
| Kaliumhydrogenphosphat   | Roth®         |
| Kalziumdichlorid   | Roth®         |
| Kalziumsulfat  | Roth®         |
| L-Cystein  | Applichem     |
| Magnesiumchlorid   | Roth®         |
| Magnesiumsulfat  | Sigma         |
| Maleinsäure  | Roth®         |
| Methanol   | Roth®         |

## Material und Methodik

|  |                      |
|--|----------------------|
| Mowiol   | Calbiochem           |
| MOPS   | Q-Biogene            |
| Natriumacetat  | Roth®                |
| Natriumchlorid                                       | Roth®                |
| Natriumhydroxid                                      | Roth®                |
| Natriumhydrogenphosphatdodecahydrat                  | Merck                |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O | Merck                |
| Natriumbicarbonat                                    | Sigma                |
| Natriumdihydrogenphosphat                            | Merck                |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)                           | Roth®                |
| Alkalische Phosphat Substrat Lösung (NBT)            | Fermentas            |
| Nilblau  | Fluka                |
| Paraformaldehyd                                      | Fermentas            |
| Pferdeserum, hitzeinaktiviert (HS)                   | Biochrom KG          |
| ProteinaseK  | Merck                |
| RNase OUT™ Ribonuclease Inhibitor                    | Invitrogen™          |
| RNase A  | Sigma                |
| RNase T1   | Sigma                |
| Rinderserumalbumin (BSA)                             | Biochrom AG          |
| ThermoPol-Puffer® (10x)                              | New England Biolabs® |
| Torula RNA   | Sigma                |
| Triethanolamin                                       | Roth®                |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)               | Roth®                |
| Trizol® Regent                                       | Invitrogen™          |
| Tween-20   | Roth®                |
| Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )  | Roth®                |

### 3.1.3 Enzyme

|  |                      |
|--|----------------------|
| 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        |
| RNase Out® (40u/µl)                      | Invitrogen™          |
| Proteinase K                             | Merck                |
| SP6 RNA-Polymerase                       | Stratagene           |
| Superscript-Reverse-Transkriptase        | Invitrogen™          |
| T7 RNA-Polymerase                        | Invitrogen™          |
| Taq DNA-Polymerase                       | Fermentas            |

### 3.1.4 Hormone

|       |         |
|-------|---------|
| β-hCG | Prospec |
|-------|---------|

### 3.1.5 Antikörper

|                |                        |
|----------------|------------------------|
| Digoxigenin/AP | Roche Diagnostics GmbH |
|----------------|------------------------|

### 3.1.6 Kits

|  |                     |
|--|---------------------|
| QIAGEN® PCR Purification Kit               | QIAGEN              |
| QIAGEN Plasmid Midi Kit                    | QIAGEN              |
| RNeasy Mini Kit                            | QIAGEN GmbH, Hilden |
| Super Script™ II Reverse-Transkriptase Kit | Invitrogen™         |

### 3.1.7 Lösungen, Puffer, Medien

|  |  |
|--|--|
| Agarosegele:                                       | 0,8% Agarose in 1xTBE-Puffer (Auftrennung von RNA)<br>1,5% Agarose in 1xTBE-Puffer (Auftrennung von DNA)   |
| Alkalische Phosphatase-Puffer (1x):                | 100mM Tris/Hcl<br>50mM MgCl <sub>2</sub><br>100mM NaCl<br>0,1% Tween-20<br>pH=9,5  |
| Alkalische Phosphatase/NBT/BCIP:                   | 1ml APB<br>2,5µl NBT<br>3,5µl BCIP   |
| Denhart's (100x):                                  | 2% BSA<br>2% PVP<br>2% Ficoll™ 400   |
| DEPC-dH <sub>2</sub> O:                            | 0,1% Diethylpyrocarbonat<br>dH <sub>2</sub> O  |
| Hybridisierungslösung: 50% Formamid (deionisiert): | 5x SSC(20x)<br>1mg/ml Torula RNA (50mg/ml)<br>100µg/ml Heparin (10mg/ml)<br>1x Denhart's (100x)<br>0,1% Tween-20 (20%)<br>0,1% CHAPS (10%)<br>10mM EDTA (0,5M)<br>gelöst in DEPC-dH <sub>2</sub> O |
| Ladepuffer für DNA/RNA(6x):                        | 15% Ficoll™<br>0,25% Bromphenolblau<br>0,25% Xylenxyanol   |
| MAB (2x):  | 200mM Maleinsäure<br>300mM NaCl<br>pH=7,5  |
| MAB/BMB:   | 2% BMB in 1xMAB  |
| MAB/BMB/Serum:                                     | 2% BMB<br>20% Pferdeserum<br>in 1xMAB  |
| MAB/BMB/Serum/Antikörper:                          | 1x MAB<br>2% BMB<br>20% Pferdeserum<br>Anti-Digoxigenin-Antikörper (1:5000)  |
| MBS:   | 88mM NaCl<br>1mM KCl<br>1mM MgSO <sub>4</sub><br>5mM Hepes<br>2,5mM NaHCO <sub>3</sub>   |

## Material und Methodik

|                       |   |
|-----------------------|---|
| MEM (10x):            | 0,7mM CaCl <sub>2</sub><br>pH=7,4<br>1M MOPS<br>400ml dH <sub>2</sub> O<br>20mM EGTA<br>10mM MgSO <sub>4</sub><br>500ml H <sub>2</sub> O<br>pH=7,4                          |
| MEMFA:                | 5ml MEM (10x)<br>5ml Formaldehyd (37%)<br>40 ml destilliertes Wasser  |
| Paraformaldehyd (8%): | 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 (mit PTw). |
| PBI-Puffer (Qiagen):  | 25-50% Guanidiniumchlorid<br>25-50% Isopropylalkohol  |
| PE-Puffer (Qiagen):   | firmeneigene vertrauliche Zusammensetzung   |
| PBS (10x):            | 0,1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O<br>20M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>1,4M NaCl<br>28mM KCl<br>DEPC-dH <sub>2</sub> O                        |
| Proteinase-K:         | 10µg/ml (H <sub>2</sub> O)  |
| PTw (1x):             | 1x PBS (10x)<br>0,1% Tween-20<br>DEPC-dH <sub>2</sub> O   |
| PTw-Ethanol-Lösung:   | EthanolPTw  |
| RLT-Puffer (Qiagen):  | firmeneigene vertrauliche Zusammensetzung   |
| RPE-Puffer (Qiagen):  | firmeneigene vertrauliche Zusammensetzung   |
| RW1-Puffer (Qiagen):  | firmeneigene vertrauliche Zusammensetzung   |
| SSC (20x):            | 0,3M NaCitrat x 2H <sub>2</sub> O<br>0,3M NaCl<br>DEPC-dH <sub>2</sub> O<br>pH=7,0  |
| SSC (2x) mit RNasen:  | 2xSSC<br>20µg/ml RNase A<br>10U/ml RNase T1   |
| TBE-Puffer:           | 89mM Tris<br>89mM Borsäure<br>2mM EDTA-Natrium<br>pH=8,0  |
| Triethanolamin:       | 0,1 M Triethanolaminehydrochlorid in DEPC-dH <sub>2</sub> O<br>pH=7,5   |

### 3.1.8 Primer

Random Primers

Invitrogen™

Ornithindecaboxylase I

forward: 5' GCCATTGTGAAGACTCTCTCCATTC 3'

reverse: 5' TTCGGGTGATTCCCTTGCCAC 3'

*trim29*

forward: 5' AATCCCTCCATTGCCTAC 3'

reverse: 5' AAAGTGCACCAAACCTTCCA 3'

*trim36*

forward: 5' TAAGGAAGTCATCCTGCACA 3'  
reverse: 5' ACATCCTACTTGGACACGTT 3'

### 3.1.9 Geräte und Verbrauchsmaterialien

#### Verbrauchsmaterialien

|                                |                                     |
|--------------------------------|-------------------------------------|
| Reaktionsgefäße                | Eppendorf                           |
| Petrischalen (10cm)            |                                     |
| Schraubendeckelgläser          | Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen |
| Borosilikatglasflaschen        | Fischerbrand, Schott                |
| Einmalspritze 1ml              | BD                                  |
| Gewinde-Präparatgläser 50x14mm | VWR                                 |
| Parafilm®                      | Pechiney Plastic Packaging          |
| PCR-Strips                     | Thermo Scientific                   |

#### Mikroliterpipetten

|                       |                |
|-----------------------|----------------|
| 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 |

#### PCR Thermocycler

|                        |                       |
|------------------------|-----------------------|
| Thermocycler           | Biometra, Deutschland |
| TGRADIENT Thermocycler | Biometra, Deutschland |

#### Histologie

|  |   |
|--|---|
| Vibratom Leica VT1000 S                    | Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH,<br>Bensheim |
| Deckgläser (24 x 60 mm)                    | Menzel-Gläser, Deutschland                    |
| Objekträger                                | Schütt  |
| Kunststoffform zum Einbetten (Peel-A-Way®) | Polysciences Inc.                             |

#### Elektrophorese

|                         |                           |
|-------------------------|---------------------------|
| Elektrophorese Netzteil | E844 Consort, Belgien     |
| Power Pack P25          | Biometra, Deutschland     |
| Bio-Rad Gel Doc 2000    | Bio-Rad Laboratorien, USA |
| Gelkammern              |                           |

#### Optik

|                    |                                |
|--------------------|--------------------------------|
| Leica DMR          | Leica Microsystem, Deutschland |
| Olympus SZX12      | Olympus Microscopy, Japan      |
| Zeiss Stemi 2000   | Carl Zeiss, Deutschland        |
| AxioCam MRc Kamera | Carl Zeiss, Deutschland        |

#### Zentrifuge

|              |                                     |
|--------------|-------------------------------------|
| Biofuge pico | Heraeus, Deutschland                |
| SIGMA 2K15   | Sigma Laborzentrifugen, Deutschland |

## Material und Methodik

Sorvall RC-5B

Thermo Scientific, USA

### **Spektrophotometer**

NanoDrop® Spectrophotometer ND-100

peQlab Biotechnology, Deutschland  
Bio photometer Eppendorf,  
Deutschland

### **Sterilbank/Inkubator/Thermoblock/Wasserbad**

Inkubator  
Inkubatorschüttler

Heraeus Instruments, Deutschland  
Innova TM 4300 New Brunswick  
Scientific, USA

Wasserbad DIN 40050-IP20  
Brutschrank (BM400)

Memert, Deutschland  
Memert, Deutschland

### **Computer (Software)**

Adobe Illustrator  
Adobe InDesign  
Adobe Photoshop  
Doe Joint Genome Institute Blast  
GIMP <http://www.gimp.org>  
NCBI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)  
Microsoft® Image Composite Editor  
Microsoft® Word  
Microsoft® PowerPoint  
Primer3 Whitehead Institute for Biomedical Research USA (Steve Rozen and Helen J. Skaletsky, 2000)  
Metazome (<http://www.metazome.net/>)  
ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Ovulationsstimulation in *Xenopus*-Weibchen**

*Xenopus*-Weibchen können zum Laichen durch die Injektion von humanen  $\beta$ -hCG stimuliert werden. Um einen möglichst hohen Ertrag an Eiern zu erhalten, wurden die Weibchen eine Woche vor dem gewünschten Datum der Eiablage „geprimt“. Das bedeutet, dass im Voraus 100 Einheiten  $\beta$ -hCG in den dorsalen Lymphsack injiziert wurden. Die Injektionsstelle befindet sich dorsalseitig, circa zwei bis drei Zentimeter proximal der Kloake und lateral der Wirbelsäule. Am Vorabend der eigentlichen Eiablage wurden den *Xenopus*-Weibchen nochmals, je nach Körpergröße, 600 bis 800 Einheiten  $\beta$ -hCG injiziert. Am nächsten Tag wird das Wasser, in dem sich die Frösche befinden, durch handwarmes Wasser ersetzt, was die Eiablage anregt. Daraufhin nimmt man sich einen Frosch aus dem Wasser, stimuliert mit dem Daumen die Haut oberhalb der Kloake und versucht dadurch die Weibchen zur Eiablage zu animieren. Die Eier werden in einer Petrischale gesammelt und dort befruchtet.

### 3.2.2 In vitro Fertilisation

Für die Befruchtung der *Xenopus*-Eier, muss zunächst Hodenmaterial gewonnen werden. Hierzu wird ein männlicher *Xenopus laevis* ausgewählt und getötet. Ist dies erfolgt, wird über eine Laparotomie das Abdomen eröffnet. Mit Pinzetten sucht man die Hoden auf, die sich zwischen den Darmschlingen befinden. Die Testes werden präpariert und möglichst ohne umliegendes Fettgewebe ektomiert. Darauf werden die Hoden in 1xMBS gelagert. Um Spermia für die Befruchtung zu gewinnen, wird ein Viertel eines Hodens in einem Milliliter 1xMBS zerkleinert. Davon werden 100µl zusammen mit 900µl destilliertem Wasser gemischt und zur Fertilisation über die bereits abgelaichten Eier verteilt. Wenn drei Minuten vergangen sind, wird die Petrischale mit 0,1xMBS als Puffermedium aufgefüllt. Nach einer Wartezeit von 45 Minuten, gießt man das 0,1xMBS ab und schwenkt die Embryonen in 2%-Cystein-Lösung, um die aneinanderheftenden Eier zu separieren. Um eine Schädigung der Eier durch Cystein zu vermeiden, müssen diese dann fünfmal in 0,1xMBS gewaschen werden. Danach kann bei Albino-Fröschen eine Färbung mit Nile-Blue angeschlossen werden, sodass die einzelnen Entwicklungsstadien leichter zu unterscheiden sind.

### 3.2.3 RNA-Präparation

Um RNA aus den Embryonen der NF-Stadien 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 und 36 zu isolieren, wurde das RNeasy-Kit (Qiagen) genutzt. Dem Prinzip dieses Kits liegen Säulen mit einer Silikatgel-basierten Membran zugrunde, welche eine selektive RNA-Bindungskapazität aufweisen. Spezielle Puffersysteme mit hohem Salzgehalt ermöglichen die Bindung von mindestens 200bp-langen RNA-Strängen an die Silikatgel-Membran.

Zunächst versetzt man 30mg Embryonengewebe, welches zuvor mit flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde, mit einer Lösung, bestehend aus 600µl RLT-Puffer und 6µl Mercaptoethanol. Der RLT-Puffer beinhaltet Guanidin-Isothiocyanat, welches denaturierend wirkt und somit auch RNasen inaktiviert. β-Mercaptoethanol trägt durch die Reduktion von Disulfidbrücken zu freien Thiolen zur Denaturierung bei. Unter Zuhilfenahme einer Spritze und Kanülen verschiedenen Durchmessers erfolgt die Zerkleinerung und Homogenisierung des embryonalen Materials. Das entstandene Lysat wird bei 14000rpm für drei Minuten zentrifugiert und der Überstand ohne Pellet weiterverwendet. 600µl Ethanol (70%) fügt man dem Überstand hinzu. Die Zugabe von Alkohol verbessert die Bindungseigenschaften der RNA an die Säulenmembran. Nach gründlichem Mischen wird die Lösung über die Säule bei 10000rpm für 30s zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Die in der Säule befindliche RNA reinigt man mittels zweier Waschpuffer. Dabei werden jeweils 700µl RW1-Puffer und 500µl RPE-Puffer bei 10000rpm für 30s über die Säule zentrifugiert. In einem neuen Tube wird abschließend die RNA in 20µl RNase-freiem, 70°C-warmen Wasser eluiert.

### 3.2.4 Konzentrationsmessung der RNA

Für die Herstellung der cDNA und spätere semiquantitative PCR ist es notwendig, RNA gleicher Ausgangskonzentration zu verwenden. Daher wurde vor Beginn der cDNA-Synthese die RNA-Konzentration mittels Nanodrop gemessen. Das Prinzip beruht auf einer Extinktionsmessung und daraus berechneter Konzentration. Vorteil des Nanodrops ist das geringe Probenvolumen von 1µl, das zur Messung eingesetzt werden muss. Im Gerät wird aus diesem Volumen eine Flüssigkeitssäule gebildet. Durch Senden eines Lichtstrahls durch die Flüssigkeitssäule und anschließender Absorptionsmessung kann daraus die Konzentration an RNA im Probenvolumen berechnet werden.

### 3.2.5 Synthese der komplementären DNA (cDNA)

Für die Herstellung komplementärer DNA aus RNA ist die Enzymgruppe der reversen Transkriptasen essentiell. Diese Enzyme katalysieren drei verschiedene Schritte. Zunächst wird auf der Basis des RNA-Stranges ein RNA-DNA-Hybrid synthetisiert. Der Abbau der RNA wird durch den RNase-H-Teil des Enzyms realisiert. Letztlich wird über eine DNA-Polymerase eine doppelsträngige DNA erzeugt. Methodisch wurde das Super Script™ II Reverse-Transkriptase Kit verwendet. Für einen 20µl-Reaktion wurde folgender Ansatz genutzt:

|     |                                      |
|-----|--------------------------------------|
| 5µl | RNA (Konzentration=100ng/µl)         |
| 1µl | Random Primers (0,2µg/µl)            |
| 1µl | dNTP-Mix (10mM)                      |
| 4µl | First Strand- Puffer (5x)            |
| 2µl | DTT (0,1M)                           |
| 1µl | RNase Out (40 u/µl)                  |
| 1µl | SuperScript-II-Reverse-Transkriptase |
| 5µl | dH <sub>2</sub> O                    |

Dieser Ansatz wird für 50 min bei 42°C inkubiert. Die Random Primers dienen als Startpunkt für die komplementäre DNA-Synthese, bei welcher die Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTP) an den RNA-Strang angelagert werden. Dithiothreitol (DTT) reduziert Disulfidbrücken und unterstützt durch Denaturierung die Wirkung des RNase-Out-Enzyms. Nach 50 min wird die Reaktion auf Eis inaktiviert. Um etwa gleiche Konzentrationen an cDNA zu erhalten, wurde die RNA im Voraus auf die gleiche Konzentration eingestellt (100ng/µl). Des Weiteren erfolgte eine PCR aller Stadien mit der Positivkontrolle Ornithindecaboxylase 1 (ODC1) und anhand der Bandenstärke in der Gelelektrophorese wurde nochmals die Vergleichbarkeit der cDNA-Konzentration kontrolliert, sodass in weiteren Experimenten eine semiquantitative PCR durchgeführt werden konnten.

### 3.2.6 Primerdesign

Bereits bei der RNA-Präparation wird die RNA durch das System des RNeasy-Kits weitestgehend von genomischen DNA-Resten befreit. Um sicher zu gewährleisten, dass bei der

RT-PCR keine genomische DNA amplifiziert wird, bietet es sich an, ein Primerpaar zu wählen, dass ein großes Intron überspannt, welches im Elongationsschritt innerhalb von 30s nicht amplifiziert werden kann. Die Wahl solcher exonsprungbasierter Primer stellt sich vor allem bei Stadien mit negativer Genexpression als wichtig heraus, da hier die Amplifikation genomischer DNA zu falsch positiven Ergebnissen führen kann.

Zur Ermittlung des Exon-Intron-Musters des betreffenden Gens stellt das „Doe Joint Genome Institute“ online ein Programm zur Verfügung, welches allerdings auf *Xenopus tropicalis* zugeschnitten ist. Da sich das Genom von *Xenopus tropicalis* und *Xenopus laevis* nur in wenigen Basenpaaren unterscheidet, lohnt es sich vorher die Sequenz des betreffenden Gens in beiden Genomen mittels NCBI-BLAST zu vergleichen. Für *trim29* und *trim36* lag die Übereinstimmung jeweils bei 96%. Daher konnte auch mit der Sequenz von *Xenopus tropicalis* das Exon-Intron-Muster bestimmt werden. Nachdem eine Stelle mit großem Exonsprung identifiziert wurde, erfolgt die eigentliche Primersuche mit dem Programm „Primer3“, welches ebenfalls online zur Verfügung steht. Hierfür werden die Exonsequenzen vor und nach dem Intron verwendet. Weiterhin sollte darauf geachtet werden, dass die Primer in etwa die gleiche Länge von 20bp besitzen. Der Guanin-Cytosin-Gehalt sollte in beiden Primern ähnlich sein und etwa bei 50% liegen, um für die spätere PCR gleiche Annealing-Temperaturen zu erhalten. Die optimale Produktgröße liegt zwischen 150 und 300bp.

Die durch Primer3 ermittelten Primerpaare müssen nochmals über einen „NCBI-BLAST“ gegen das Genom von *Xenopus laevis* kontrolliert werden, da zur Primersuche eine *Xenopus tropicalis*-Sequenz verwendet wurde, die nur zu 96% mit *Xenopus laevis* übereinstimmt. Danach können eventuelle Basenunterschiede korrigiert werden.

### 3.2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion dient der Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte. Die Expression eines Gens kann über die transkribierte mRNA, die in cDNA umgeschrieben wurde (siehe cDNA-Synthese), nachgewiesen werden. Diese Methode wird als semiquantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (sqRT-PCR) bezeichnet. Für die Reaktion wird folgender Ansatz genutzt:

|        |                      |
|--------|----------------------|
| 2µl    | cDNA                 |
| 1µl    | dNTP                 |
| 1,25µl | forward-Primer       |
| 1,25µl | reward-Primer        |
| 1µl    | Taq-Polymerase       |
| 2µl    | Thermopuffer (10x)   |
| 11,5µl | destilliertes Wasser |

Prinzipiell besteht die Reaktion aus drei Schritten, die abhängig vom Plateau-effekt, bis zu einer gewissen Zyklenzahl wiederholt werden.

Im Denaturierungsschritt werden die komplementären DNA-Stränge bei 95°C für 45s getrennt. Anschließend folgt der Annealingschritt, in welchem sich die Primer an die DNA-Stränge anlagern. Für *trim29* und *trim36* wurden exonsprungbasierte Primer gesucht, um die Vervielfältigung genomischer DNA auszuschließen. Die Annealingtemperatur variiert je nach Primer und dessen Guanin-Cytosin-Gehalt. Als optimale Temperaturen für die Primeranlagerung wurden 59°C für *trim29* und 54°C für *trim36* ermittelt. Dieser Schritt läuft über 30s. Nach Anlagerung der Primer schließt sich der Elongationsschritt an. Dabei werden über die Taq-Polymerase bei 72°C für 30s komplementäre DNA-Stränge synthetisiert. Die geeignete Zyklenzahl liegt für beide Gene bei 28 Zyklen. Zur Visualisierung des Produkts wurde die Gelelektrophorese genutzt.

### 3.2.8 Agarosegel-Elektrophorese

Die Gelelektrophorese bietet die Möglichkeit Nukleinsäuren nach ihrer Größe aufzutrennen. Dabei dient das Polysaccharid Agarose als Auftrennungsmatrix. Je höher man die Agarosekonzentration wählt, desto kleiner sind die Poren zur Auftrennung der Nukleinsäuren. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes, wandern die negativ geladenen Fragmente zum positiven Pol und werden dabei nach ihrer Größe aufgetrennt, denn kleinere DNA- bzw. RNA-Fragmente wandern im Agarosegel schneller und damit in gleicher Zeit dementsprechend weiter als größere Fragmente.

Agarose wird hierfür zusammen mit TBE-Puffer aufgekocht und nach der Zugabe von Ethidiumbromid in eine Elektrophoresekammer gegeben. Je nach Länge der aufzutrennenden Fragmente werden verschiedene Konzentrationen von Agarose verwendet. Nach Aushärten des Gels überschichtet man dieses mit TBE-Puffer. In die Gelkammern wurden jeweils 10µl PCR-Reaktionsprodukt zusammen mit 1µl 10x-Ladepuffer pipettiert. Durch das Anlegen einer Spannung von 70V für 50min wandern die Nukleinsäuren zum entgegengesetzt geladenen Pol. Die Fragmentlänge kann über DNA- bzw. RNA-Leitern, die mit auf das Gel aufgetragen werden, kontrolliert werden. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid zum Agarosegel werden die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar, da das Ethidiumbromid mit Basen der DNA interkaliert. Die Gele können mit der AxioCam MRc (Zeiss)-Kamera fotografiert werden.

### 3.2.9 Whole mount in situ Hybridisierung

Ziel dieser Methode ist der spezifische Nachweis von definierter mRNA und damit der Genexpression im embryonalen Gewebe. Hierbei kann durch die Betrachtung verschiedener Entwicklungsstadien nicht nur gewebebezogene, sondern auch die zeitliche Komponente in der Expression eines Gens veranschaulicht werden. Zur Umsetzung wurden daher Embryonen der Stadien 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 und 36 für die in situ Hybridisierung eingesetzt.

## Material und Methodik

Die Dauer der WMISH umfasst je nach Färbezeit drei Tage bis eine Woche. Vorgegangen wurde nach dem Protokoll von Hollemann, Panitz und Pieler.

### In vitro Synthese von RNA-Sonden

Für die Detektion einer spezifischen mRNA im Embryo müssen vor Beginn der in situ Hybridisierung Sonden, in Form von anti-sense RNA, hergestellt werden. Dieser Vorgang umfasst fünf Schritte.

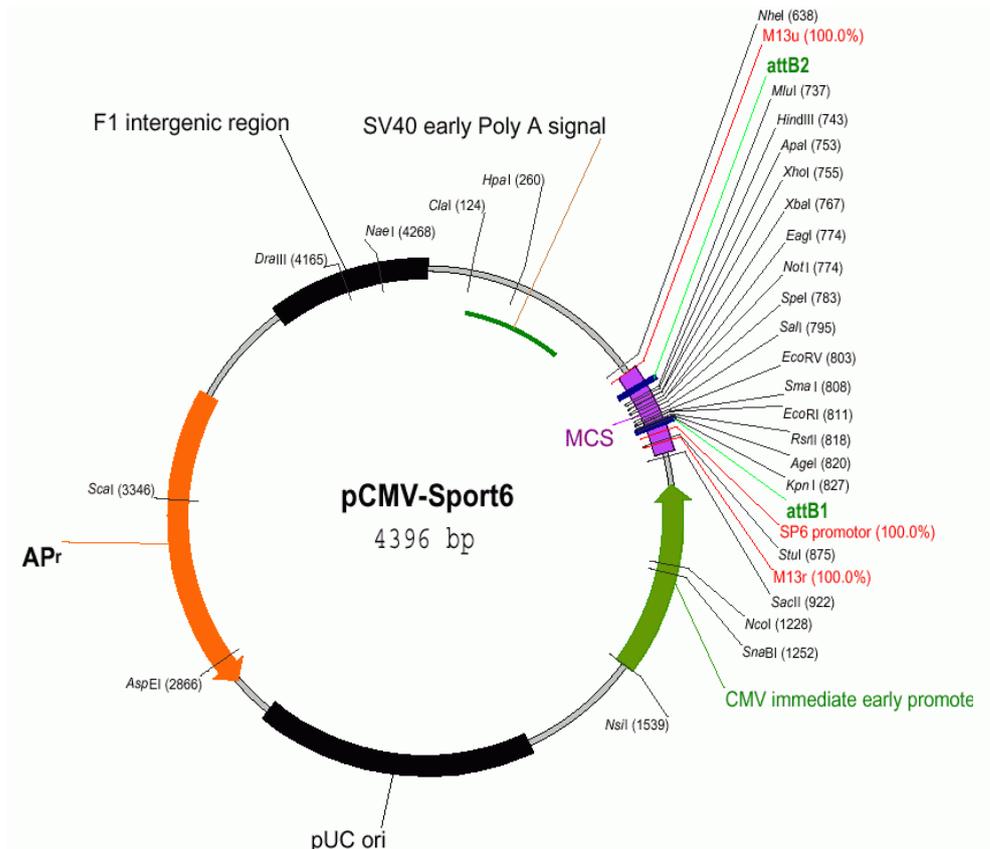


Abb. 7: Schema des Plasmids.

Als Vektor wurde pCMV-Sport 6 genutzt. Schnittstellen sind Sal I und Not I.

Hierfür nutzt man folgenden Reaktionsansatz:

5µg Plasmid  
2,5µl Enzyme SacII  
5µl Puffer

Der Ansatz wird mit RNase-freiem Wasser auf 50µl aufgefüllt.

Dieser Ansatz wird für drei Stunden bei 37°C inkubiert.

Anschließend wird das linearisierte Plasmid mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt.

det,

## Material und Methodik

Über eine Säule wird jeweils unter Zugabe von PB(I)-Puffer und PE-Puffer zentrifugiert und das Eluat verworfen. Das aufgereinigte Plasmid wird daraufhin in 25µl RNase-freiem Wasser eluiert.

Im Anschluss erfolgt die den dritten Schritt umfassende anti-sense-Transkription. Essentiell für die Herstellung der hier angewendeten anti-sense-RNA ist die RNA-Polymerase T7. Um später das Hybrid aus anti-sense-RNA und mRNA im embryonalen Gewebe erkennen zu können, muss die Sonde mit einem Digoxigenin-Label versehen werden. Dies dient als spätere Bindestelle für einen Antikörper, welcher wiederum ein Substrat umsetzt und dadurch eine Farbreaktion bildet.

Zur Durchführung des Transkriptionsschrittes wird folgender Ansatz genutzt:

|     |                              |
|-----|------------------------------|
| 1µg | linearisiertes Plasmid       |
| 2µl | Digoxigenin-RNA-labeling-Mix |
| 1µl | RNase Inhibitor              |
| 2µl | RNA-Polymerase T7            |

Der Ansatz wird mit RNase-freiem Wasser auf 20µl aufgefüllt.

Für die Transkription muss der Ansatz für zwei Stunden bei 37°C inkubiert werden. Danach wird zur Kontrolle der Transkription 1µl des Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen.

Der vierte Schritt dient dem DNase-Verdau. Hierfür werden dem restlichen Ansatz 2µl DNaseI hinzugefügt und im Anschluss 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Im Anschluss wird das Transkript mittels Rneasy Mini Kit (Quiagen) aufgereinigt. Dafür wird der Ansatz über die Säule unter Zugabe des RPE-Reinigungspuffers zentrifugiert und später in RNase-freiem Wasser eluiert. Die fertige Sonde wird nun in 10ml Hybridisierungspuffer überführt und bei -20°C gelagert.

### **Ablauf der whole mount in situ Hybridisierung**

In der Vorbereitungsphase werden unpigmentierte Embryonen in den jeweiligen Entwicklungsstadien gesammelt und für ein bis zwei Stunden in 1xMEMFA fixiert. Um die Embryonen aufzubewahren, werden sie in einer aufsteigenden Ethanolreihe (25%, 50%, 75%, 100%) dehydriert und anschließend bei -20°C gelagert.

Zu Beginn der WMISH werden die Embryonen über eine absteigende Ethanolreihe bei gleichzeitig aufsteigender PTw-Konzentration rehydriert (100% Ethanol, 75% Ethanol/25% PTw, 50% Ethanol/50% PTw, 25% Ethanol/75% PTw), bis sie sich in 100% PTw befinden. Die schrittweise Absenkung der Ethanolkonzentration ist notwendig um Blasenbildung in den Embryonen zu vermeiden. Das PTw verhindert einerseits ein Aneinanderheften der Embryonen und andererseits neutralisiert es negative Ladungen, sodass die Sonde später spezifisch an der mRNA im Gewebe binden kann.

## Material und Methodik

Der nächste Schritt umfasst die Behandlung der Embryonen mit Proteinase-K. Ziel dabei ist es, das Gewebe zu permeabilisieren und so das Eindringen der Sonde in tiefere Schichten des Embryos zu erleichtern. Bei der Proteinase-K, gewonnen aus dem Pilz *Tritirachium album*, handelt es sich um eine Serinprotease, die den Abbau von äußeren Proteinstrukturen der Embryonen katalysiert. Hierbei sollte eine Konzentration von 1µg Proteinase-K auf 1ml PTw erzielt werden. Die *Xenopus*-Embryonen werden dabei mittels Mikroskop kontrolliert. Bereits bei kleinsten sichtbaren Veränderungen erfolgt ein Abbruch der Proteinase-K-Behandlung durch Waschen der Embryonen in PTw.

Um später eine spezifische Bindung der Sonde an die mRNA im Gewebe zu gewährleisten, müssen positive Ladungen, die durch freie Amine entstehen, neutralisiert werden. Umgesetzt wird die Neutralisierung positiver Ladungen durch einen Acetylierungsschritt. Zunächst werden die Embryonen in eine 0,1M Triethanolamin-Lösung (pH 7,5) überführt. Hierbei handelt es sich um einen Puffer, der bereits keine freien Amine enthält. Die eigentliche Acetylierung wird durch die zweimalige Zugabe von 12,5µl Acetanhydrid umgesetzt. Freie Amine werden acetyliert und somit die positiven Ladungen neutralisiert. Anschließend werden die Embryonen zweimal für 5min mit reinem PTw gewaschen.

Aufgrund des instabilen Zustandes der Embryonen durch die Proteinase-K-Behandlung, ist es notwendig, sie im nächsten Schritt zu refixieren. Bei diesem Vorgang wird eine vierprozentige Paraformaldehyd-Lösung in PTw hergestellt, in welcher sich die Embryonen für 20min. befinden müssen. Danach wird mit reiner PTw-Lösung fünfmal für je 5min gewaschen.

Nach der Refixierung, mit anschließendem Waschen, findet die Hybridisierung statt. PTw wird durch die Hybridisierungslösung ersetzt und in der sogenannten Prähybridisierungsphase werden die Embryonen für sechs Stunden bei 60°C inkubiert. Der Hybridisierungspuffer dient dazu die RNA im denaturierten Zustand zu halten, denn ist die mRNA linearisiert, kann die Sonde später besser binden. Über Nacht werden die Embryonen bei 60°C in 1ml Hybridisierungspuffer inkubiert. In dieser Zeit bindet nun die anti-sense-RNA spezifisch an die mRNA im Gewebe.

Am nächsten Tag folgen zunächst mehrere Waschschritte. Als erstes erfolgt die Überführung der Embryonen in reinen Hybridisierungspuffer für 10min bei 60°C. Darauffolgend wird dreimal mit 2xSSC für 20min bei 60°C gewaschen. Weiterhin werden dem 2xSSC RNasen hinzugefügt und die Embryonen bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Als Ribonukleasen werden RNase A und T1 genutzt. Sie besitzen die Aufgabe, verbleibende einzelsträngige RNA abzubauen. Die RNasen werden mit 2xSSC für 10min bei Raumtemperatur, 0,2xSSC für zweimal 30min bei 60°C und MAB für zweimal 15min bei Raumtemperatur ausgewaschen.

Der nächste Schritt umfasst die Antikörper-Inkubation. In der Vorbereitung wird 1xMAB durch zwei Prozentiges BMB in 1xMAB überführt. BMB verhindert eine unspezifische Antikörperbindung. Im Anschluss wird diese Lösung durch zwei Prozentiges BMB, 20% Serum

in 1xMAB für 60min ersetzt. Weiterhin werden dieser Lösung im Verhältnis 1/3000 die Antikörper hinzugefügt und die Embryonen für vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Über Nacht werden die Embryonen in 1xMAB bei 4°C gewaschen.

Der dritte Tag beinhaltet die Farbentwicklung. Nach fünfmaligem Waschen mit 1xMAB für eine Stunde bei Raumtemperatur wird der Maleinsäurepuffer durch den Alkalische-Phosphatase-Puffer ersetzt. Dieser hemmt endogene Phosphatasen. Nachfolgend wird eine Lösung aus APB mit NBT (2µl/ml APB) und BCIP (3,5µl/ml APB) hergestellt und auf die Embryonen gegeben. Die Embryonen werden auf Eis gelagert und je nach Farbentwicklung wird die Färbelösung immer wieder ersetzt bzw. der Färbvorgang abgestoppt. Dabei werden die Embryonen kurz mit RNase-freiem Wasser gespült. In einer absteigenden Ethanolreihe wird die überschüssige Farbe ausgewaschen und zum Schluss werden die Embryonen in MEMFA bei 4°C gelagert.

### **3.2.10 Herstellung von Vibratom-Schnitten**

Um die Farbentwicklung der in situ Hybridisierung im Inneren der Embryonen betrachten zu können, müssen Schnitte angefertigt werden. Hierzu werden zuvor fotografierte Embryonen für 20min in einer Gelatin-Albumin-Lösung equilibriert. Währenddessen gießt man die erste Schicht des Einbettmediums indem man 1,5ml Gelatin-Albumin mit 105µl Glutaraldehyd mischt und möglichst luftblasenfrei in eine kleine Plastikschaale einfüllt. Nach 20min Aushärtung positioniert man die Embryonen in der Schale. Auf die gleiche Weise wird nun eine zweite Gelatin-Albumin-Glutaraldehyd-Schicht hergestellt und die Embryonen darin eingebettet. Glutaraldehyd dient der Quervernetzung zwischen den Proteinen und sorgt daher für die Aushärtung des Mediums.

Bevor ein eingebetteter Embryo in das Vibratom eingespannt wird, muss er manuell mit einer Rasierklinge auf die richtige Schnittebene und Größe zugeschnitten werden. Daraufhin wird das Objekt mit Cyanacrylat-Klebstoff auf der Schnittunterlage befestigt und in das Vibratom eingespannt. Das Vibratom bietet die Möglichkeit 30µm dicke Schnitte vom Embryo anzufertigen, welche dann auf einem Objektträger gesammelt und unter Beschichtung mit Mowiol und einem Deckgläschen fixiert werden.

### **3.2.11 Fotografie der Embryonen und derer Schnitte**

Um die Embryonen zum Fotografieren auszurichten, wird als Unterlage eine Petrischale mit Agar hergestellt und mit 1xMEM als Flüssigmedium für die Embryonen gefüllt. Unter dem OlympusSZX12-Binocular werden die Embryonen in den Hauptaufnahmerichtungen (Ansicht von ventral, dorsal und lateral) ausgerichtet und mit Hilfe der Intas-Kamera fotografiert.

Die auf einem Objektträger befindlichen Vibratomschnitte werden hingegen unter einem Axio Imer.M1 (Zeiss)-Mikroskop mit einer AxioCam MRc (Zeiss)-Kamera fotografiert.

#### 4 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Abbildungen der untersuchten *Xenopus*-Embryonen nach der Whole mount in situ Hybridisierung gezeigt. Es wird nach nach jeweiligem Gen und Stadien unterschieden.

##### **4.1 Expression von *trim29* in der whole mount in situ Hybridisierung**

###### **4.1.1 Expression in den Stadien NF-Stadien 0, 3, 6 und 9**

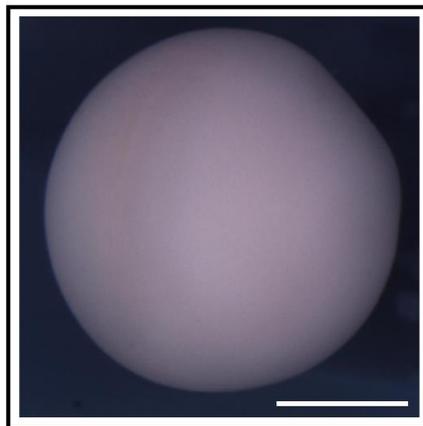


Abb. 8: WMISH von *trim29* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 0. In diesem Stadium ist es bei Albinoembryonen noch nicht möglich einen animalen oder vegetativen Pol zu unterscheiden. Der Embryo wird daher nur in einer Ansicht dargestellt. Es zeigt sich noch keine Expression von *trim29*. Maßstabsbalken entspricht 500 $\mu$ m.

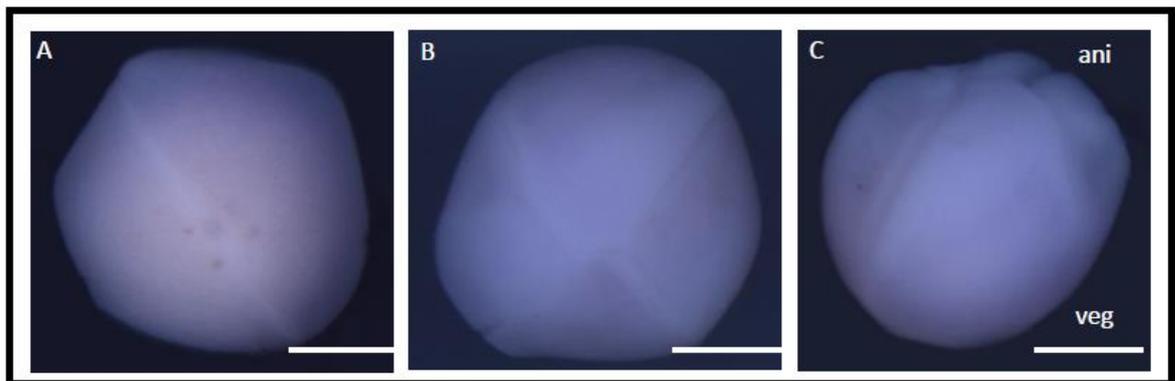


Abb. 9: WMISH von *trim29* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 3. (A) Ansicht des animalen Poles, (B) Ansicht des vegetativen Poles, (C) laterale Ansicht. „ani“ und „veg“ bezeichnen jeweils die animale und vegetative Seite des Embryos. Es zeigt sich noch keine Expression von *trim29*. Maßstabsbalken entspricht 500 $\mu$ m.

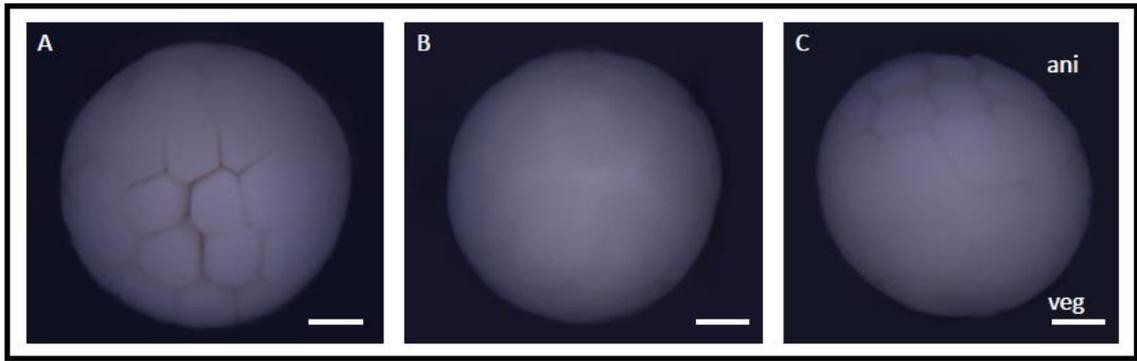


Abb. 10: WMISH von *trim29* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 6. (A) Ansicht des animalen Poles, (B) Ansicht des vegetativen Poles, (C) laterale Ansicht. „ani“ und „veg“ bezeichnen jeweils die animale und vegetative Seite des Embryos. Es zeigt sich noch keine Expression von *trim29*. Maßstabsbalken entspricht 250µm.

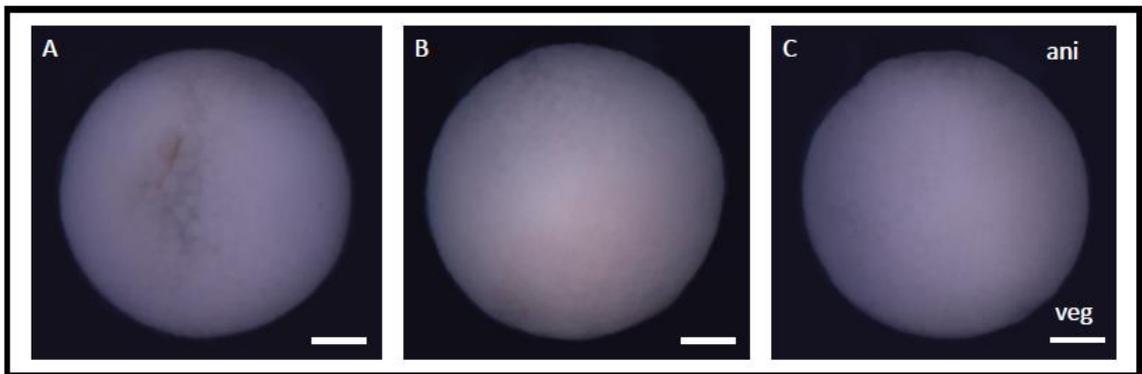


Abb. 11: WMISH von *trim29* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 9. (A) Ansicht des animalen Poles, (B) Ansicht des vegetativen Poles, (C) laterale Ansicht. „ani“ und „veg“ bezeichnen jeweils die animale und vegetative Seite des Embryos. Es zeigt sich noch keine Expression von *trim29*. Maßstabsbalken entspricht 250µm.

Die befruchtete Eizelle, der Embryo im Vier- und 32-Zell-Stadium sowie die Blastula im NF-Stadium 9 zeigen keine Expression in der WHMISH von *trim29* (Abb. 8, 9, 10, 11).

#### 4.1.2 Expression im NF-Stadium 12

*Xenopus*-Embryonen gastrulieren in den Stadien 10 bis 12 (Abb. 12). Die Proliferation sowie morphogenetische Bewegungen, Interkalation und Extinktion von Zellen- bzw. Zellverbänden führen zur Invagination entodermalen und mesodermalen Gewebes und zur Ausbildung der Blastopore (Abb. 12), welche sich in der weiteren Embryogenese zum Anus des *Xenopus* entwickelt. Weiterhin bildet sich unter der dorsalen Urmundlippe das Archenteron, ein primärer Darm, aus. Es zeigt sich eine ausgeprägte Expression von *trim29* im Ektoderm, aus welchem sich später das Integument sowie das Neuralgewebe entwickeln. In den Vergrößerungen wird ersichtlich, dass *trim29* in der apikalen Schicht des Ektoderms nachgewiesen werden kann. Die basale Schicht zeigt keine Färbung. In entodermalen und mesodermalen Geweben lässt sich keine Expression des Gens nachweisen (Abb. 12).

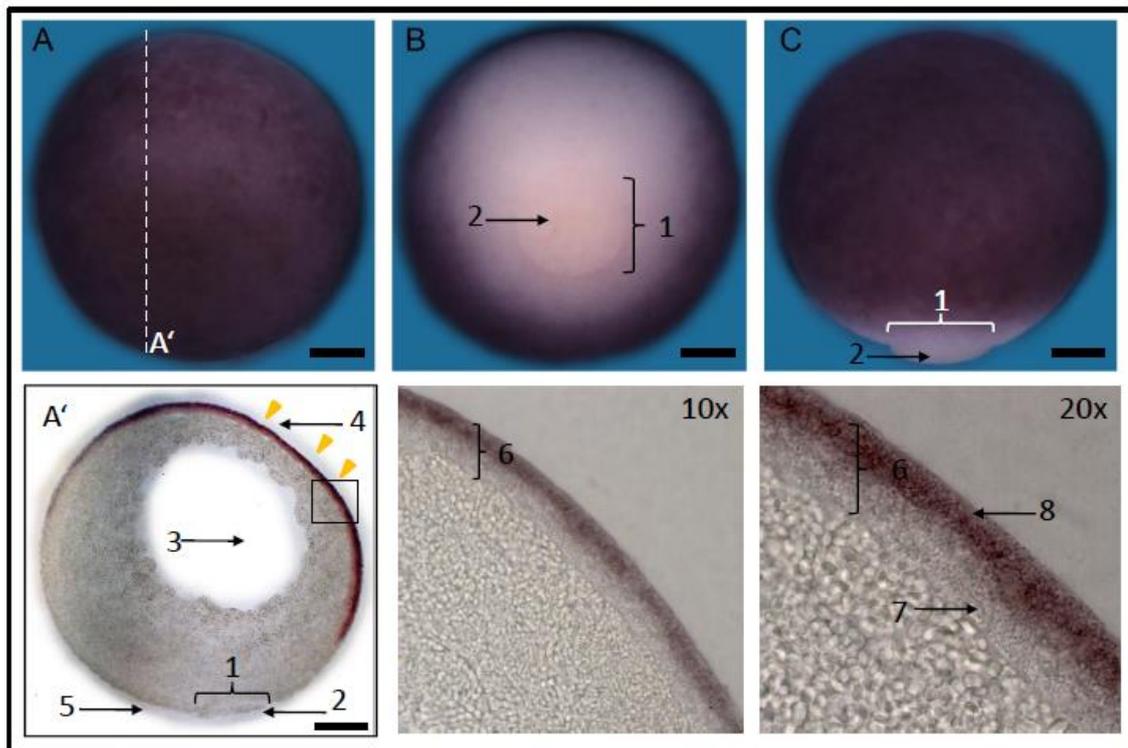


Abb. 12: WMISH von *trim29* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 12 (Gastrulation). (A) Ansicht des animalen Poles mit der eingezeichneten Schnittebene (A'). Ausschnitt in A' wird 10-fach und 20-fach vergrößert dargestellt. (B) Ansicht des vegetativen Poles, (C) laterale Ansicht.

- |                                       |                                      |
|---------------------------------------|--------------------------------------|
| (1) Blastopore (=Urmund)              | (2) vitelliner Pfropfen (=Yolk Plug) |
| (3) Blastocoel (=primäre Leibeshöhle) | (4) animaler Pol                     |
| (5) vegetativer Pol                   | (6) Oberflächenektoderm              |
| (7) basale ektodermale Schicht        | (8) apikale ektodermale Schicht      |

Eine Expression zeigt sich im Bereich des Ektoderms (violette Färbung). Dies wurde in den Schnittbildern zusätzlich gelben Pfeilen markiert.

Maßstabsbalken ents Maßstabsbalken entspricht 150µm.

#### 4.1.3 Expression im NF-Stadium 15

In diesem Stadium erfolgt der Neurulationsvorgang. Aus einer Neuralplatte haben sich hier bereits die Neuralfalten und die dazwischenliegende Neuralrinne gebildet. Neurales Gewebe ist ektodermalen bzw. neuroektodermalen Ursprungs. In Stadium 15 wird *trim29*, wie im Stadium 12, im gesamten Oberflächenektoderm exprimiert (Abb. 13). Eine leichte Färbung zeigt sich im Bereich der Neuralfalten, welche Derivate des Neuroektoderms darstellen. Allerdings zeigt sich in der Neuralrinne keine Färbung.

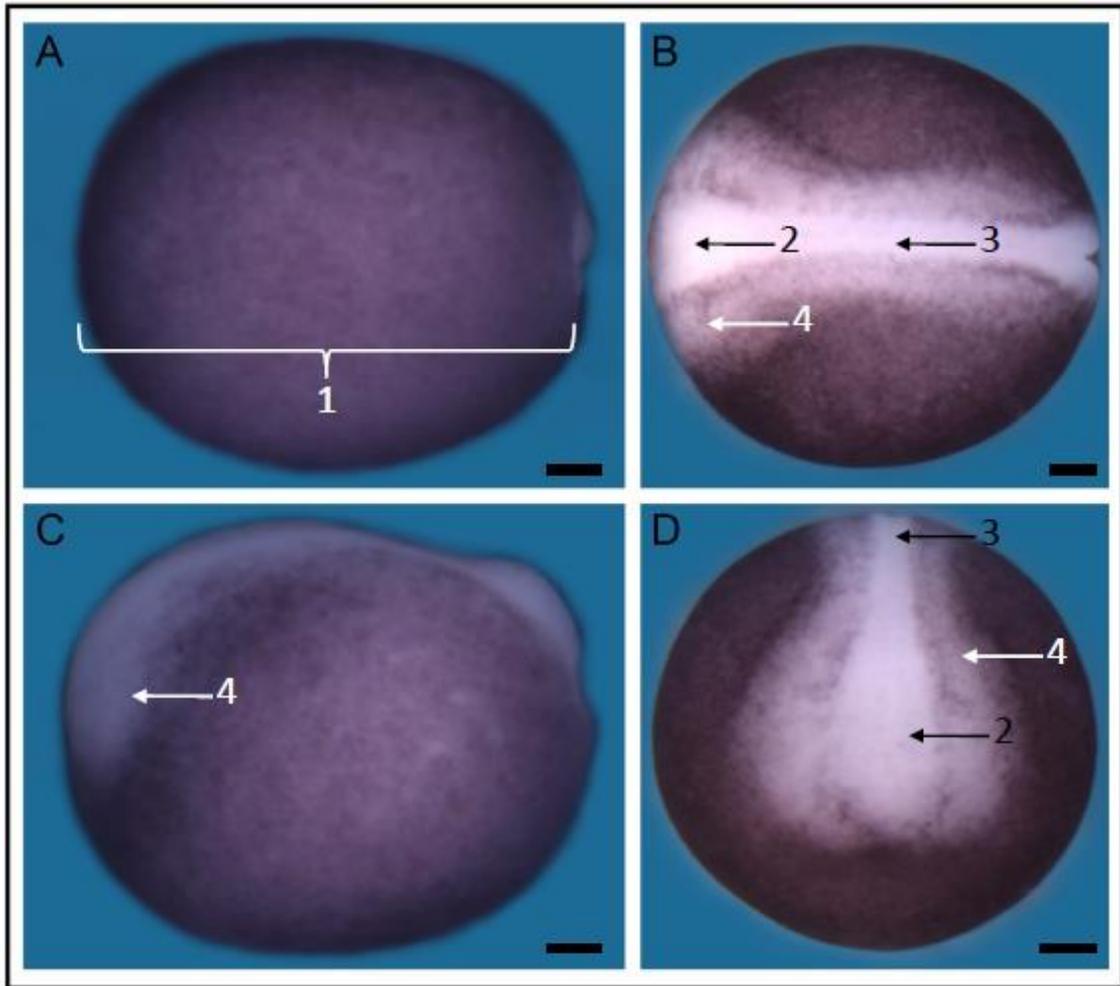


Abb. 13: WMISH von *trim29* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 15 (Neurulation). (A) ventrale Ansicht (B) dorsale Ansicht, (C) laterale Ansicht, (D) anteriore Ansicht

- (1) Ektoderm
- (2) prospektiver cerebraler Anteil der Neuralrinne (Neuralplatte)
- (3) prospektiver spinaler Anteil der Neuralrinne
- (4) Neuralfalte

Eine Expression zeigt sich im Bereich des Ektoderms und leicht im Bereich der Neuralfalten (violette Färbung). Maßstabsbalken entspricht 150µm.

#### 4.1.4 Expression im NF-Stadium 18

Der Embryo in Stadium 18 befindet sich ebenfalls im Prozess der Neurulation. Erkennbar sind, wie bei Stadium 15, Neuralrinne und Neuralfalten, die sich aber weiter aneinander angenähert haben. In den Schnitten zeigen sich zusätzlich mesodermale Anteile, wie die Chorda dorsalis, und entodermale Anteile, wie das Archenteron. Hauptexpressionsort ist weiterhin das Oberflächenektoderm. In geringerer Weise wird *trim29* im Bereich der Neuralfalten exprimiert (Abb. 14). Hierbei handelt es sich bereits um neuroektodermale Anteile. Die Neuralrinne weist weiterhin kein Signal auf. Der Übergang wird in den Schnittbildvergrößerungen gezeigt.

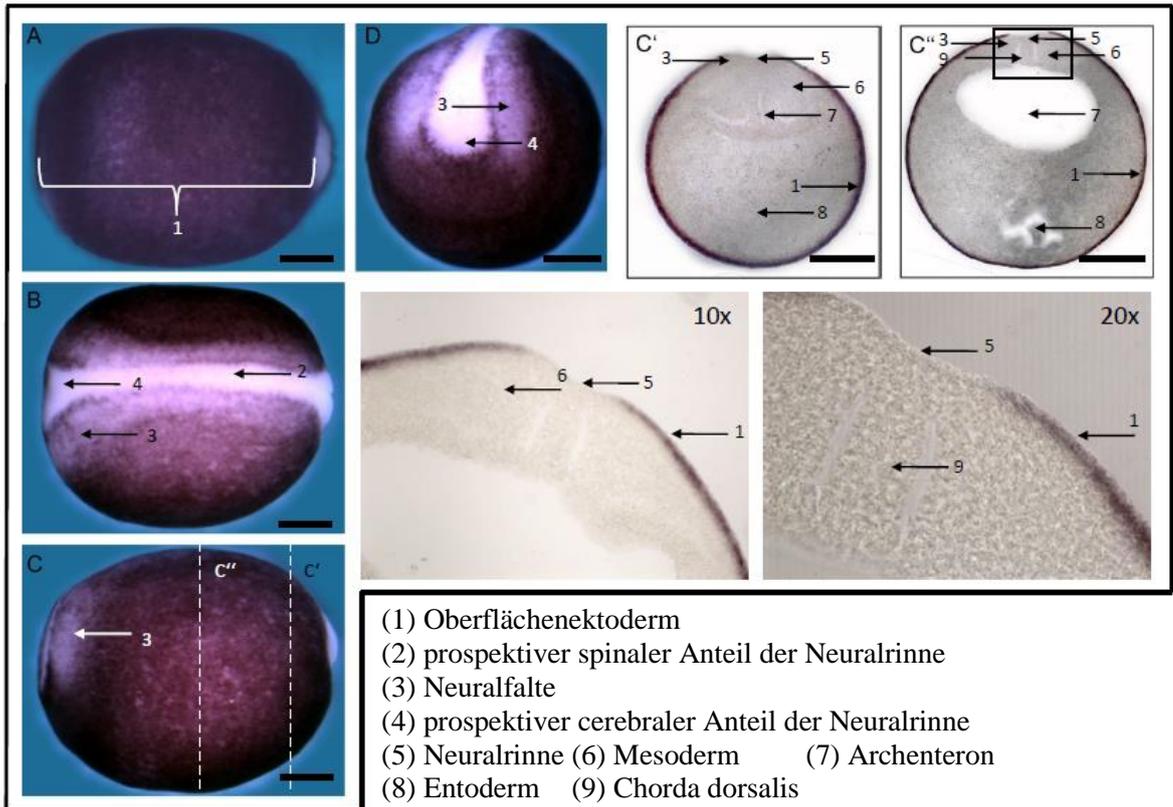


Abb. 14: WMISH von *trim29* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 18. (A) ventrale Ansicht (B) dorsale Ansicht, (C) laterale Ansicht sowie die eingezeichneten Schnittebenen (C') und (C''), (D) anteriore Ansicht. Der eingezeichnete Ausschnitt aus C'' wurde 10-fach und 20-fach vergrößert. Eine Expression zeigt sich im Bereich des oberflächlichen Ektoderms (violette Färbung). Maßstabsbalken entspricht 300µm.

#### 4.1.5 Expression im NF-Stadium 21

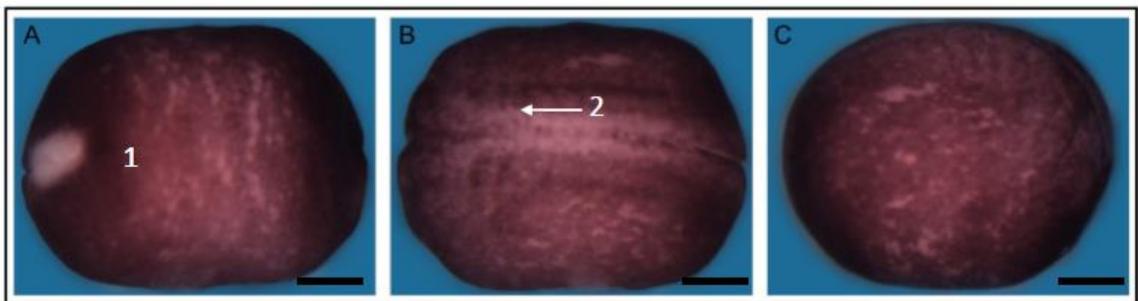


Abb. 15: WMISH von *trim29* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 21. (A) ventrale Ansicht (B) dorsale Ansicht, (C) laterale Ansicht. (1) Rest der Blastopore (posterior) (2) Neuralfalte. Eine Expression zeigt sich im Bereich des oberflächlichen Ektoderms (violette Färbung). Maßstabsbalken entspricht 300µm.

## Ergebnisse

Der Neurulationsprozess ist im Stadium 21 weitestgehend abgeschlossen. Die Neuralfalten sind verschmolzen und haben das Neuralrohr gebildet. Dieses ist in Abbildung 15 nicht sichtbar. Jene Struktur wurde von ektodermalem Gewebe überzogen. Weiterhin besteht eine starke Expression des Gens im Integument des Embryos (Abb. 15). Eine Aussparung der Färbung zeigt sich im Rest der Blastopore.

### 4.1.6 Expression im NF-Stadium 24

Mit Beginn der Organogenese im Stadium 24 zeigen sich äußerlich die Augenanlage und eine Zementdrüse der *Xenopus*-Larve. Weiterhin lässt sich der vollständige Schluss der Neuralfalten zum Neuralrohr betrachten. *Trim29* wird ektodermal in der gesamten Haut, in der Zementdrüse, in der Schlupfdrüse und Augenanlage des *Xenopus* exprimiert (Abb. 16), wobei sich weniger Färbung in Zementdrüse, Schlupfdrüse und Augenanlage im Vergleich zum Oberflächenektoderm zeigt.

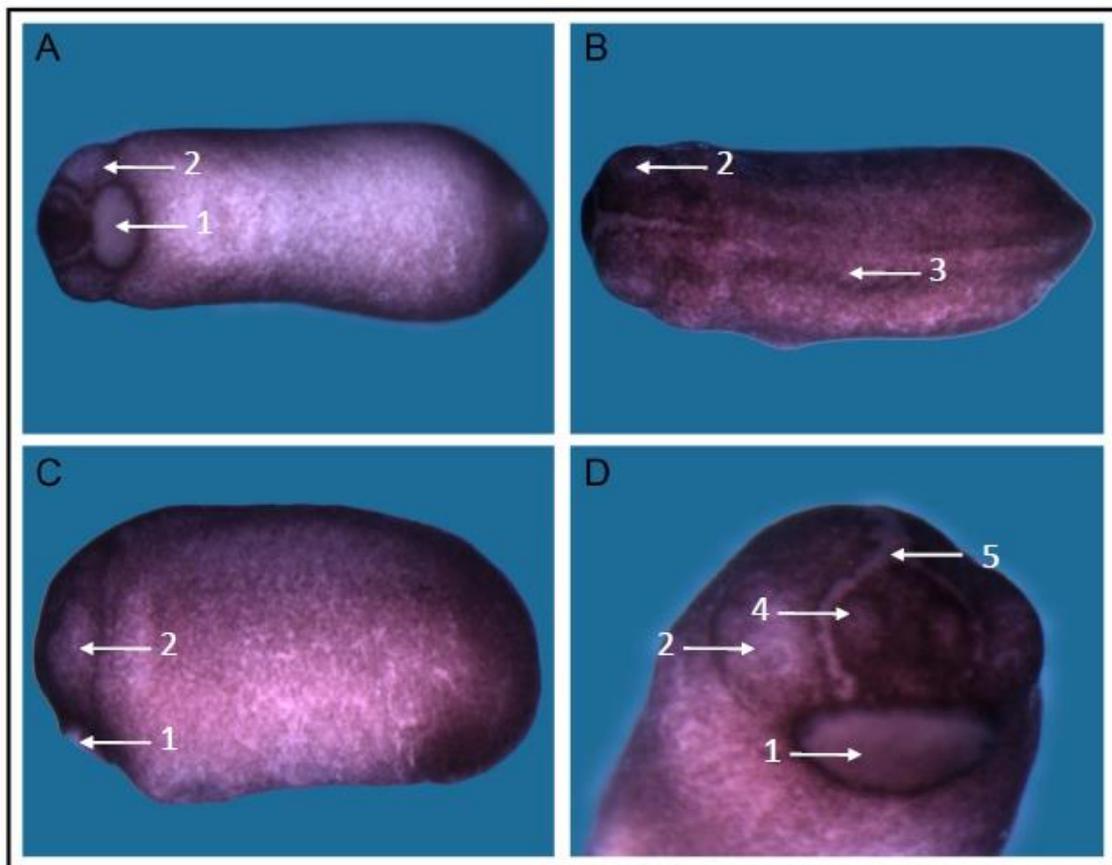


Abb. 16: WMISH von *trim29* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 24. (A) ventrale Ansicht (B) dorsale Ansicht, (C) laterale Ansicht, (D) anteriore Ansicht. (1) Zementdrüse (2) Augenanlage (3) spätere dorsale Finne (4) olfaktorische Plakoden (5) Schlupfdrüse Eine Expression zeigt im gesamten oberflächlichen Ektoderm (violette Färbung). Maßstabsbalken entspricht 300µm.

#### 4.1.7 Expression im NF-Stadium 27

Wie bereits in Stadium 24 beschrieben, zeigt sich auch im Entwicklungsstadium 27 eine Expression vom *trim29* im gesamten Integument. Allerdings wird im Verhältnis weniger Transkript exprimiert (Abb. 17). Erneut zeigt sich eine verminderte Expression in Augenanlage und Zementdrüse im Vergleich zum Oberflächektoderm.

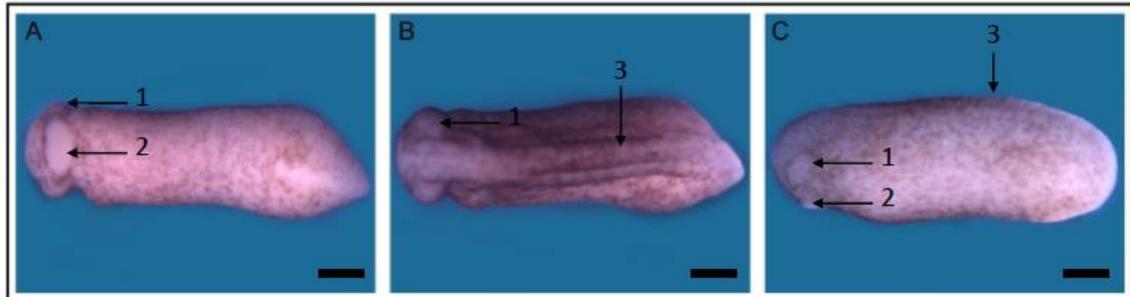


Abb. 17: WMISH von *trim29* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 27.

(A) ventrale Ansicht (B) dorsale Ansicht, (C) laterale Ansicht.

(1) Augenanlage

(2) Zementdrüse

(3) dorsale Finne

Eine Expression zeigt im gesamten oberflächlichen Ektoderm, insbesondere im Bereich der Augenanlage und der Zementdrüse (violette Färbung). Maßstabsbalken entspricht 300µm.

#### 4.1.8 Expression im NF-Stadium 30

Ebenfalls ist *trim29* in NF-Stadium 30 in der gesamten Haut des Embryos exprimiert (Abb. 18). Eine Färbung ist sowohl in der Augenanlage (Abb. 18C) als auch in der Zementdrüse (Abb. 18A) zu sehen. Bezüglich der Zementdrüse ist die Färbung diesmal nicht auf die äußerste Schicht des Embryos beschränkt. In den zugehörigen Schnittbildern wird klar abgegrenzt, dass sich sowohl im gesamten Integument des Embryos als auch in der Zementdrüse Transkripte des Gens *trim29* befinden (Abb. 18C', C'', C'''). Neuroektodermale Strukturen, wie Mes- und Rhombenzephalon, retinales Pigmentepithel, neurosensorische Retina oder Rückenmark sind nicht gefärbt (Abb. 18C', C'', C'''). Weiterhin zeigt die Linse, welche ebenfalls ein ektodermales Derivat darstellt, keine Expression des Gens (Abb. 18C'). Als weitere Strukturen in den Schnitten lassen sich Vorder- und Mitteldarm, Leberrudiment, Chorda dorsalis und die Ohrenanlage identifizieren (Abb. 18C', C'', C'''). In den letztgenannten Arealen lässt sich kein Transkriptionsprodukt nachweisen.

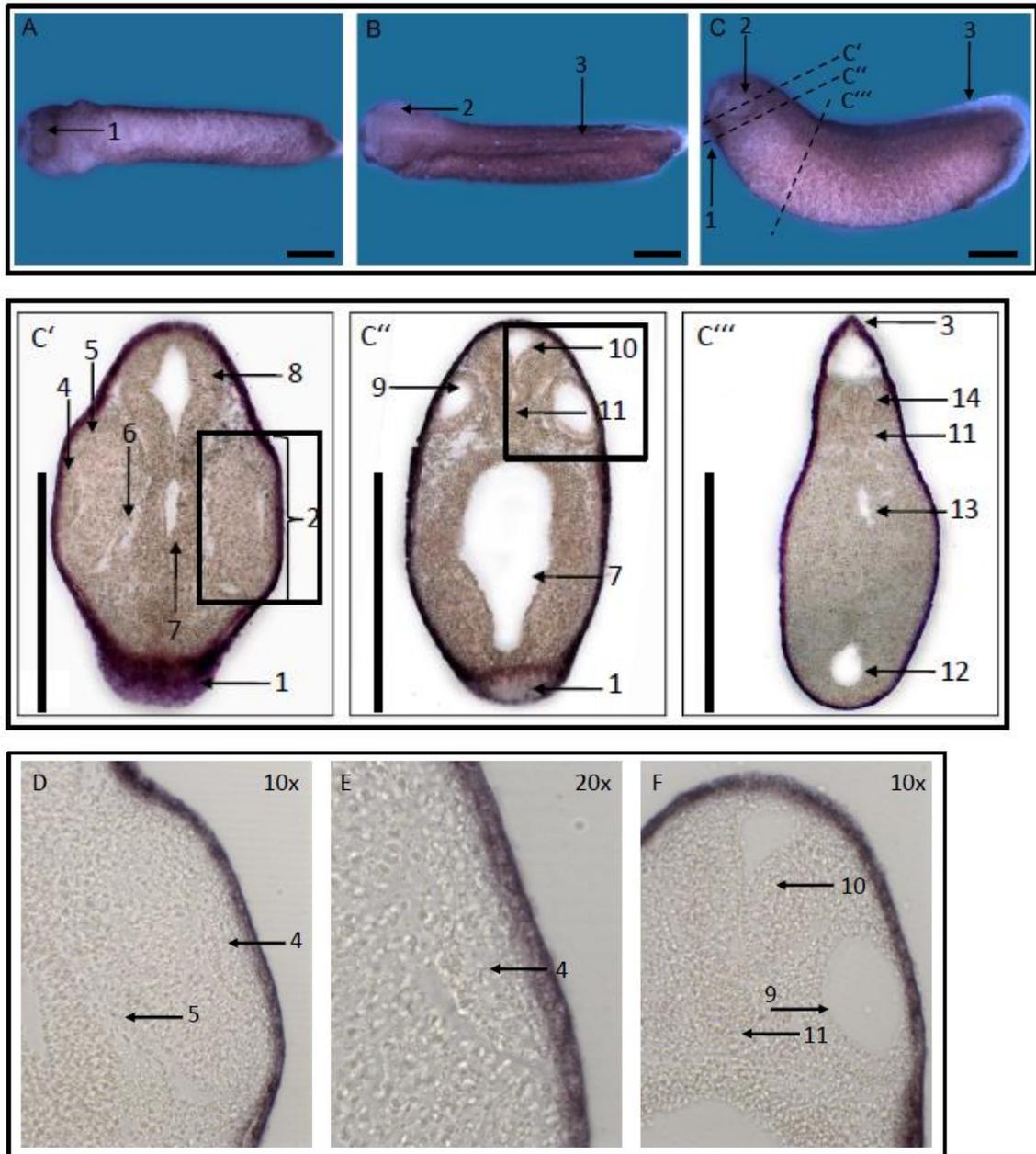


Abb. 18: WMISH von *trim29* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 30. (A) ventrale Ansicht (B) dorsale Ansicht, (C) laterale Ansicht mit eingezeichneten Schnittebenen (C'), (C'') und (C'''). D und E zeigen 10- und 20-fache Vergrößerung aus C'. Hier wird die Augenanlage dargestellt. F zeigt 10-fache Vergrößerung aus C''. Hier wird die Ohrenanlage dargestellt. Eine Expression zeigt im gesamten oberflächlichen Ektoderm (violette Färbung). Maßstabsbalken entspricht 500µm.

- |                              |                             |                      |
|------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| (1) Zementdrüse              | (2) Augenanlage             | (3) dorsale Finne    |
| (4) Linse                    | (5) neurosensorische Retina |                      |
| (6) retinales Pigmentepithel | (7) Vorderdarm              | (8) Mesenzephalon    |
| (9) Ohrenanlage              | (10) Rhombenzephalon        | (11) Chorda dorsalis |
| (12) Leberrudiment           | (13) Mitteldarm             | (14) Rückenmark      |

4.1.9 Expression im NF-Stadium 33

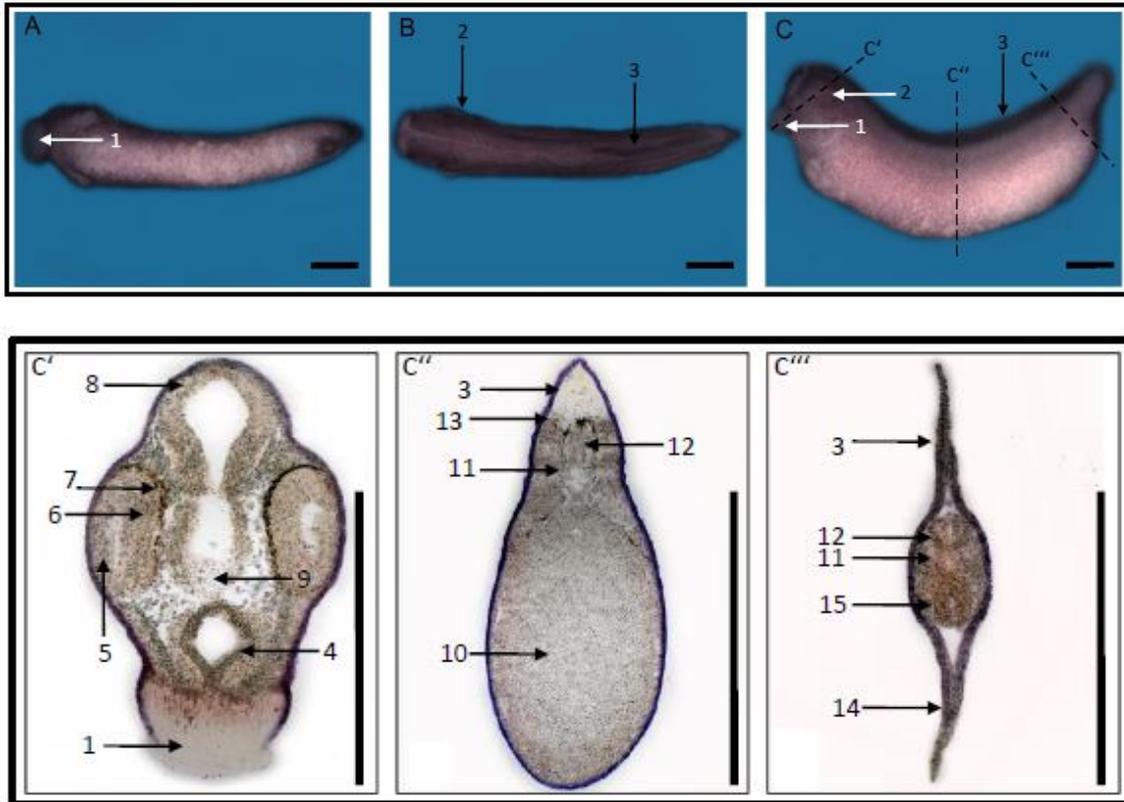


Abb. 19: WMISH von *trim29* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 33.

(A) ventrale Ansicht (B) dorsale Ansicht, (C) laterale Ansicht mit eingezeichneten Schnittebenen (C'), (C'') und (C''').

Eine Expression zeigt im gesamten oberflächlichen Ektoderm, insbesondere im Bereich der Augenanlage und der Zementdrüse (violette Färbung). Maßstabsbalken entspricht 500µm.

- |                             |                              |                         |
|-----------------------------|------------------------------|-------------------------|
| (1) Zementdrüse             | (2) Auge                     | (3) dorsale Finne       |
| (4) Vorderdarm              | (5) Linse                    |                         |
| (6) neurosensorische Retina | (7) retinales Pigmentepithel |                         |
| (8) Mesencephalon           | (9) Infundibulum             | (10) entodermale Zellen |
| (11) Chorda dorsalis        | (12) Neuralrohr              | (13) Somite             |
| (14) ventrale Finne         | (15) Hinterdarm              |                         |

Entwicklungsstadium 33 zeigt ein dem Stadium 30 ähnliches Bild. Eine Expression von *trim29* ist in der gesamten Haut zu erkennen (Abb. 19). Andere ekto- bzw. neuroektodermale Derivate bleiben ohne Färbung. Ersichtlich wird dies in verschiedenen Strukturen, wie Linse, neurosensorischer Retina, retinalem Pigmentepithel, Mesencephalon, Infundibulum und Rückenmark. In den Schnitten sind des Weiteren auch mesodermale und entodermale Derivate zu sehen, welche ebenfalls keine Expression des Gens aufweisen. Demzufolge bleiben die angeschnittenen Somiten und Anteile des Verdauungstraktes ohne Farbanreicherung. Ab NF-Stadium 33 ist nun auch Eigenpigment des Embryos zu erkennen. Die Pigmentierung, beispielsweise im Bereich des retinalen Pigmentepithels hat jedoch keinen Zusammenhang mit der violetten Färbung durch die WMISH und weist demnach auch keine Expression nach.

#### 4.1.10 Expression im NF-Stadium 36

Ebenfalls in NF-Stadium 36 zeigt sich das Bild einer dermalen Expression von *trim29*. Auffällig stellt sich eine fehlende Farbanreicherung in der Linse dar (Abb. 20D).

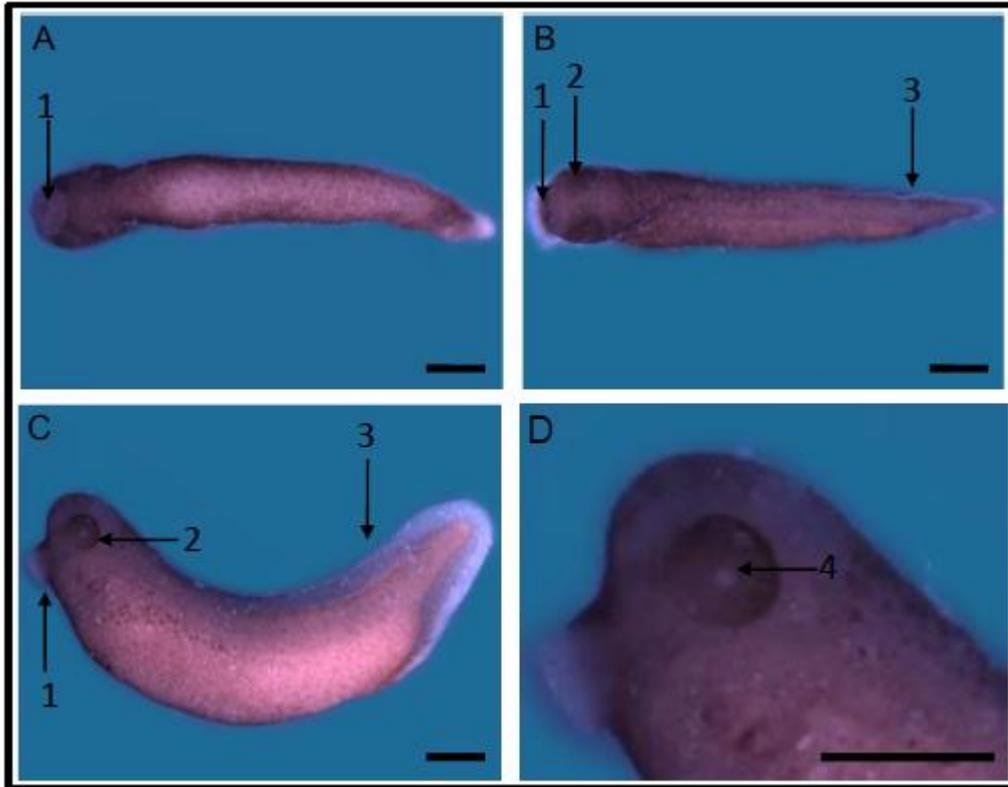


Abb. 20: WMISH von *trim29* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 36. (A) ventrale Ansicht (B) dorsale Ansicht, (C) laterale Ansicht, (D) Kopf von lateral. Eine Expression zeigt im gesamten oberflächlichen Ektoderm, insbesondere im Bereich der Augenanlage und der Zementdrüse (violette Färbung). Maßstabsbalken entspricht 500µm.

- (1) Zementdrüse
- (2) Auge
- (3) dorsale Finne
- (4) Linse

#### 4.2 Expression von *trim36* in der Whole mount in situ Hybridisierung

##### 4.2.1 Expression in den NF-Stadien 0, 3, 6 und 9

Bereits im Stadium der befruchteten Eizelle ist eine Anreicherung von mRNA in einer Hemisphäre des Embryos zu erkennen (Abb. 21). Es zeigt sich eine deutliche vegetative Färbung in der WMISH im Vierzell- als auch im 32-Zell-Stadium (Abb. 22 und 23). In Stadium 9 zeigt sich weiterhin ein ähnliches Bild, wobei das anreichernde Areal an Größe verliert (Abb. 24).

## Ergebnisse

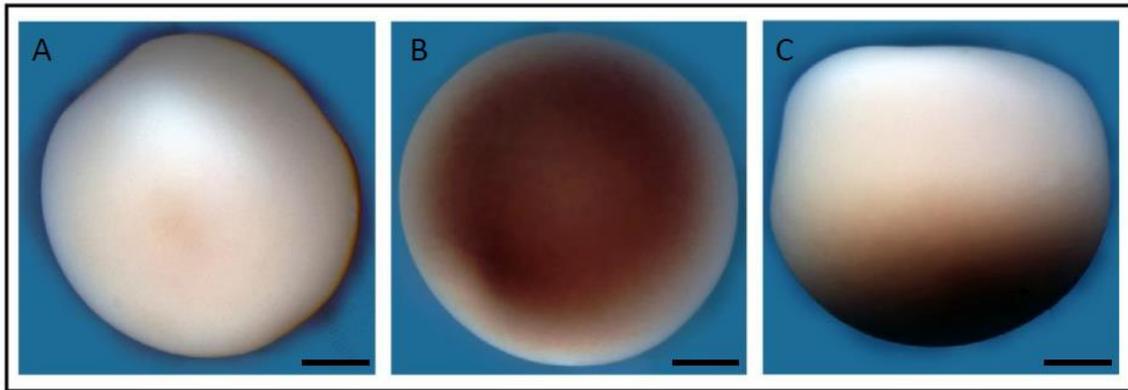


Abb. 21: WMISH von *trim36* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 0. Drei verschiedene Ansichten auf die befruchtete Eizelle (A), (B) und (C). In diesem Stadium ist eine genaue Zuordnung von vegetativem und animalen Pol noch nicht möglich. Es zeigt eine Expression von *trim36* in einer Hemisphäre des Embryos. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um die vegetative Seite des Embryos. Maßstabsbalken entspricht 250 $\mu$ m.

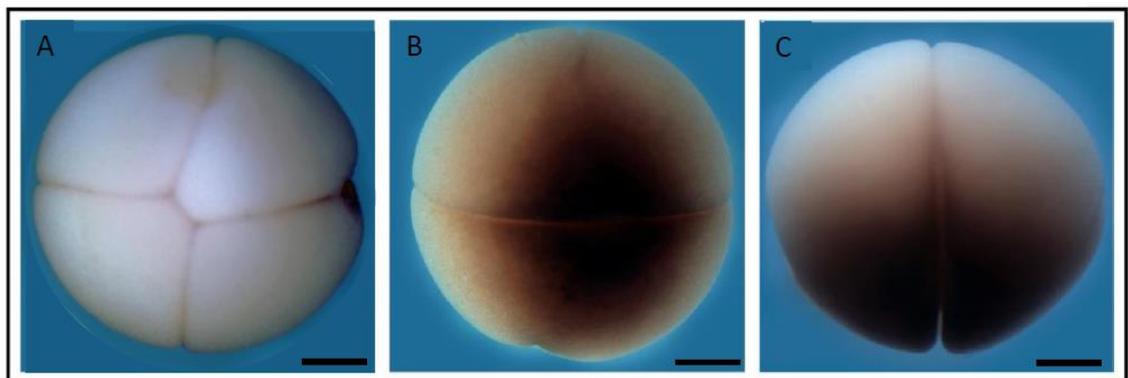


Abb. 22: WMISH von *trim36* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 3. (A) Ansicht des animalen Poles (B) Ansicht des vegetativen Poles, (C) laterale Ansicht. Es zeigt eine Expression von *trim36* im vegetativen Pol des Embryos. Maßstabsbalken entspricht 250 $\mu$ m.

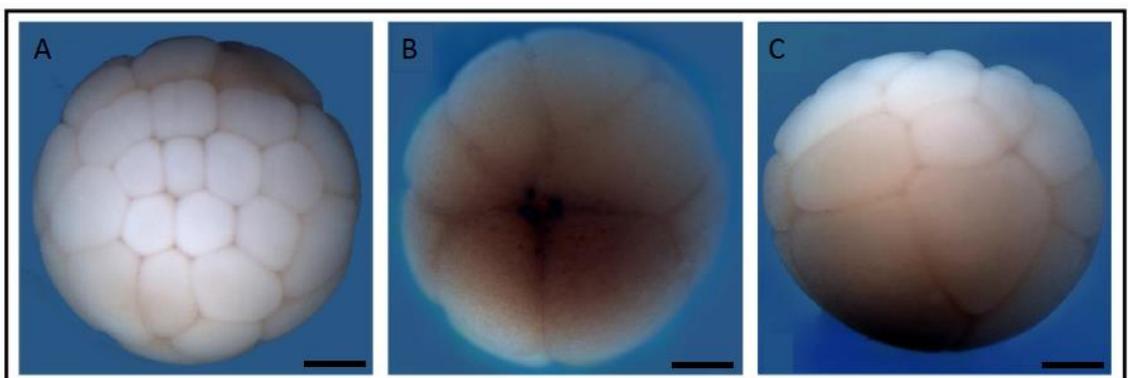


Abb. 23: WMISH von *trim36* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 6. (A) Ansicht des animalen Poles (B) Ansicht des vegetativen Poles, (C) laterale Ansicht. Es zeigt eine Expression von *trim36* im vegetativen Pol des Embryos. Maßstabsbalken entspricht 250 $\mu$ m.

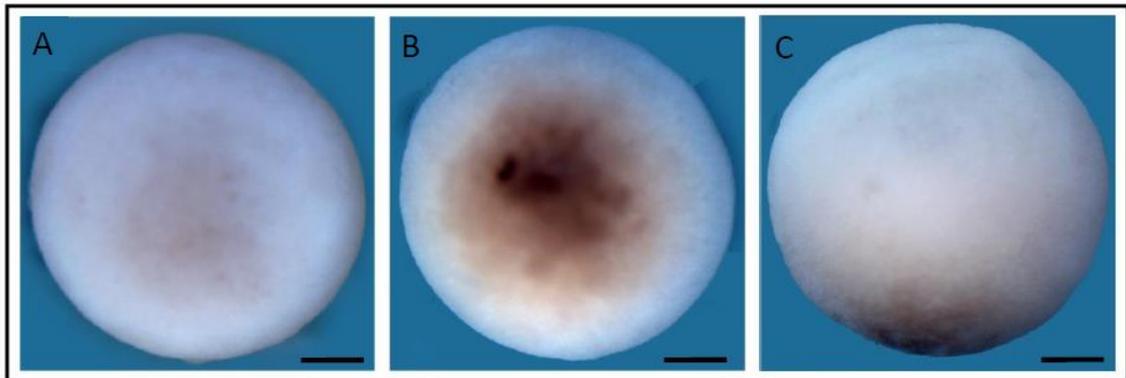


Abb. 24: WMISH von *trim36* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 9. (A) Ansicht des animalen Poles (B) Ansicht des vegetativen Poles, (C) laterale Ansicht. Es zeigt eine Expression von *trim36* im vegetativen Pol des Embryos. Maßstabsbalken entspricht 250µm.

#### 4.2.2 Expression im NF-Stadium 12

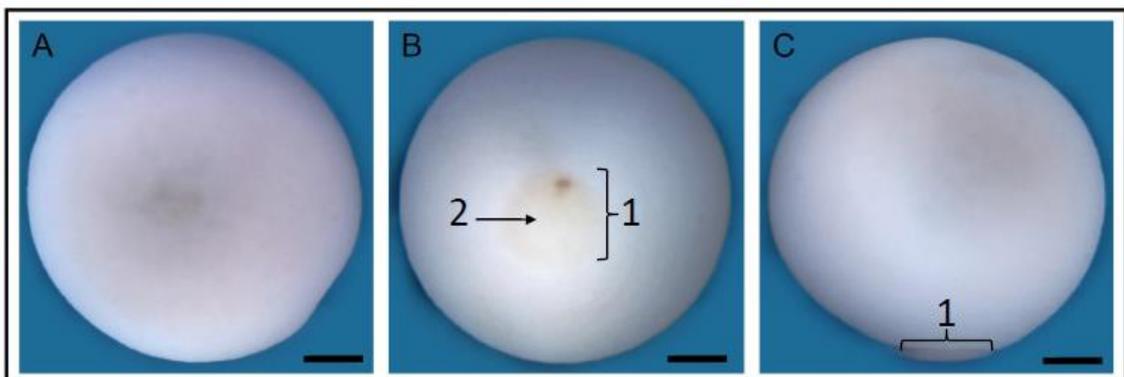


Abb. 25: WMISH von *trim36* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 12. (A) Ansicht des animalen (B) Ansicht des vegetativen Poles, (C) laterale Ansicht. (1) Blastopore (=Urmund) (2) vitelliner Pfropfen (=Yolk Plug) Eine Expression von *trim36* im vegetativen Pol des Embryos ist eine sehr schwache Expression zu erkennen. Maßstabsbalken entspricht 250µm.

Während der Gastrulation umhüllen die Zellen des animalen Poles in komplexen Proliferations- und Migrationsprozessen den vegetativen Pol des Embryos. In der Blastopore zeigt sich noch eine schwache Expression von *trim36* (Abb. 25B).

#### 4.2.3 Expression im NF-Stadium 15

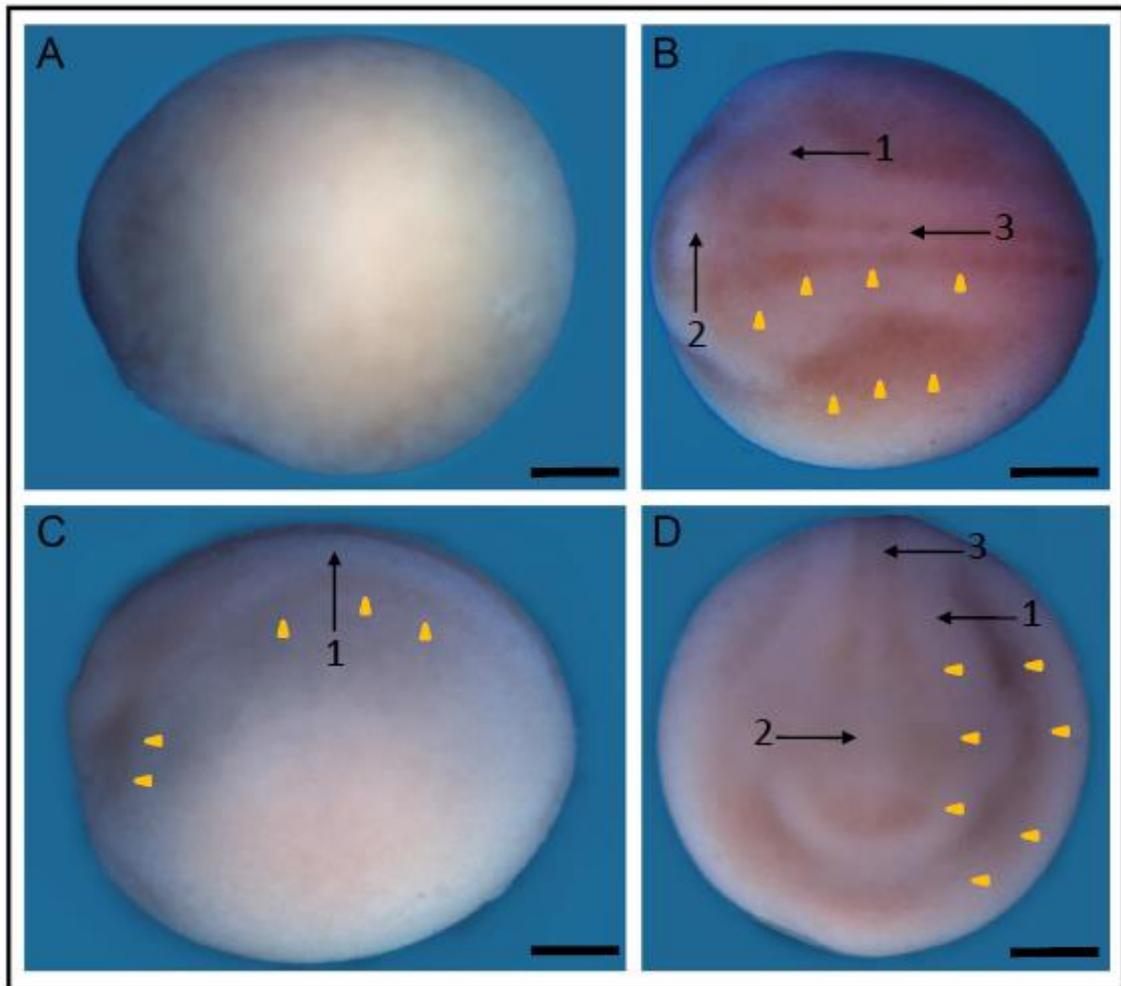


Abb. 26: WMISH von *trim36* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 15.  
(A) ventrale Ansicht (B) dorsale Ansicht, (C) laterale Ansicht, (D) anteriore Ansicht.  
(1) Neuralfalte  
(2) prospektiver cerebraler Anteil der Neuralrinne (Neuralplatte)  
(3) prospektiver spinaler Anteil der Neuralrinne  
Die gelben Pfeile weisen auf die Expressionsorte lateral und medial der Neuralfalten.  
Maßstabsbalken entspricht 250µm.

In Entwicklungsstadium 15 wird der Neurulationsprozess äußerlich sichtbar. Die Neuralfalten bilden sich aus und nähern sich aneinander an um später die Neuralrinne zum Neuralrohr zu verschließen. Dabei zeigt sich eine leichte Expression in verschiedenen Bereichen des Embryos. Die Neuralfalten an sich zeigen keine Farbanreicherung in der WMISH. Lateral und medial dieser Strukturen lässt sich jedoch eine Expression von *trim36* erkennen. Deutlich wird dies vor allem am prospektiven kranialen Abschnitt des Embryos. Hier zeigt vor allem lateral der Neuralfalten eine Färbung (Abb. 26B). Im restlichen ektodermalen Gewebe ist *trim36* jedoch nicht exprimiert. Des Weiteren lässt sich eine Expression in den lateralen Bereichen der Neuralrinne, angrenzend an die Neuralfalten, erkennen (Abb. 26B, D). Der mediane Anteil der Neuralrinne bleibt ohne Farbanreicherung (Abb. 26B, D).

#### 4.2.4 Expression im NF-Stadium 18

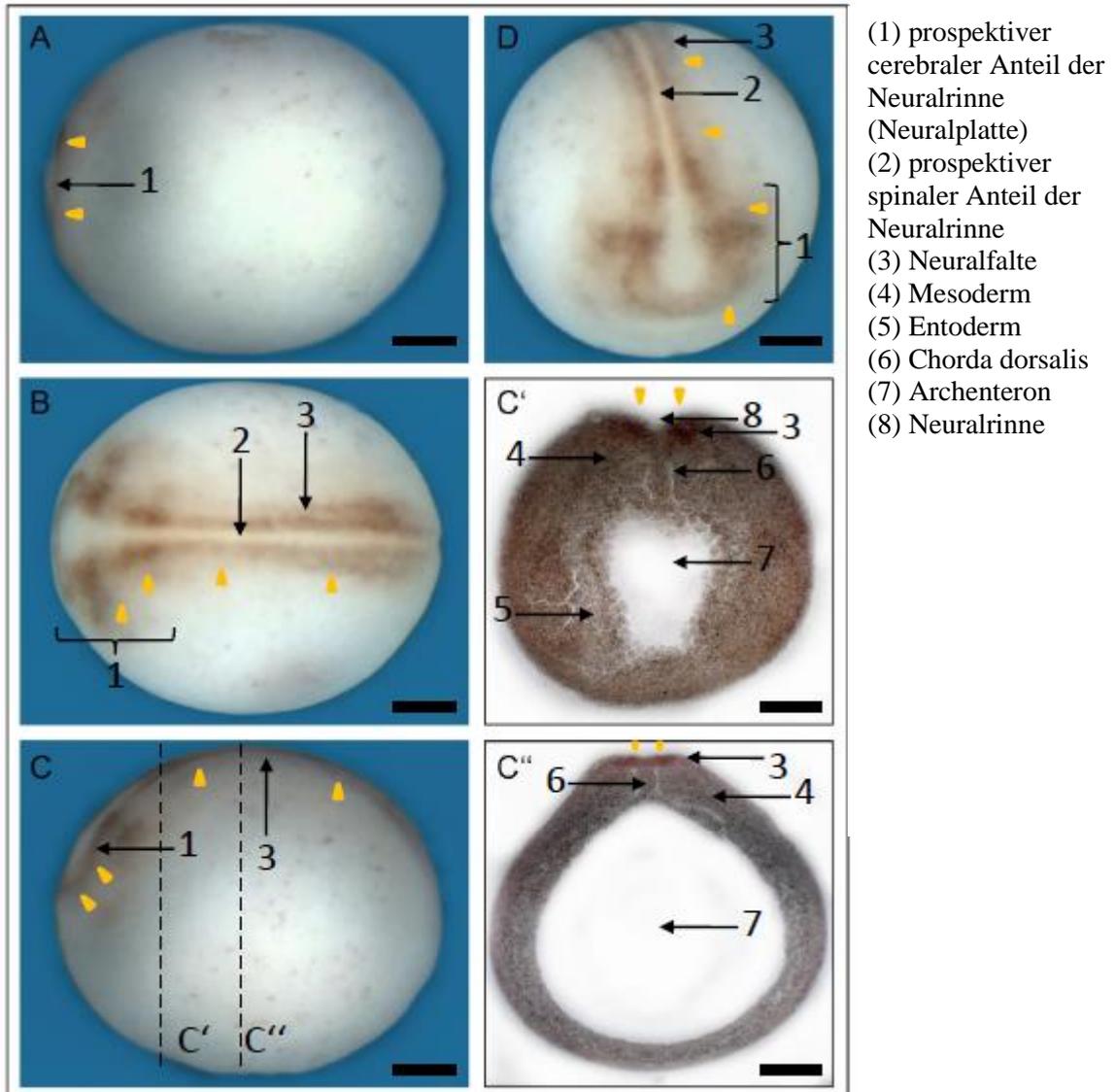


Abb. 27: WMISH von *trim36* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 18. (A) ventrale Ansicht (B) dorsale Ansicht, (C) laterale Ansicht mit eingezeichneten Schnittebenen (C') (C''), (D) anteriore Ansicht. Die gelben Pfeile weisen auf die Expression im Bereich der Neuralfalten. Maßstabsbalken entspricht 250µm.

Entwicklungsstadium 18 wird weiterhin vom Neurulationsprozess geprägt. Ersichtlich ist die weitere Annäherung der Neuralfalten im Gegensatz zu Stadium 15. Ebenfalls zeigt sich ein leicht verändertes Expressionsmuster. Die Neuralrinne bleibt weiterhin ohne Farbanreicherung. Eine Expression zeigt sich hingegen ausgeprägt im Bereich der Neuralfalten (Abb. 27B). Besonders im Bereich der Neuralplatte des Embryos wird *trim36* exprimiert, wobei sich auch hier die Neuralrinne keine Expression zeigt (Abb. 27D). Lateral der Neuralrinne zeigen zwei Areale eine verstärkte Expression. Hierbei könnte es sich um einen Teil des prospektiven Auges handeln. In den Schnittbildern kann man eine deutliche Farbanreicherung in den Neuralfalten

## Ergebnisse

sehen (Abb. 27C', C''). Weiterhin sind in den Schnitten zur zeitlichen Entwicklungseinordnung wichtige Strukturen wie mesodermale und entodermale Bereiche, das Archenteron, die Chorda dorsalis sowie die Neuralrinne zu erkennen (Abb. 27C', C''). Diese Bereiche weisen jedoch keine Expression auf.

### 4.2.5 Expression im NF-Stadium 20

Die Neurulation ist im Stadium 20 fast abgeschlossen. In der Abbildung zeigt sich ein fast vollständiger Schluss der Neuralfalten. Das Expressionsverhalten gleicht der Expression im Stadium 18. Ebenfalls zeigen hier die Neuralfalten und die Augenanlagen eine Farbanreicherung in der WMISH (Abb. 28). Die Neuralrinne bzw. das spätere Neuralrohr bleiben ungefärbt.

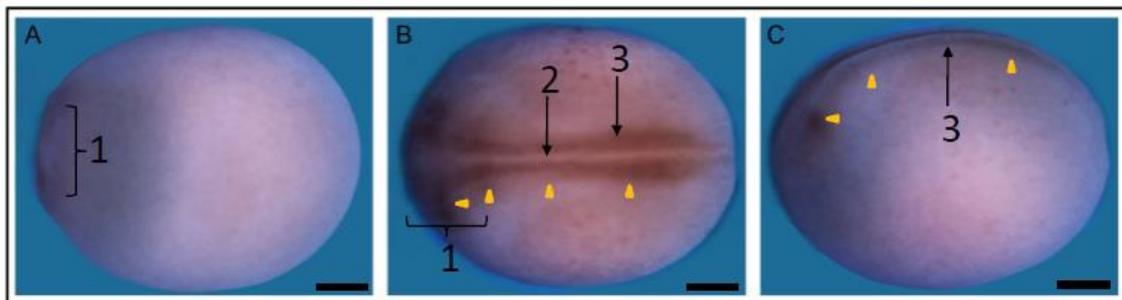


Abb. 28: WMISH von *trim36* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 20.

(A) ventrale Ansicht (B) dorsale Ansicht, (C) laterale Ansicht.

(1) prospektiver cerebraler Anteil der Neuralrinne (Neuralplatte)

(2) prospektiver spinaler Anteil der Neuralrinne

(3) Neuralfalte

Die gelben Pfeile weisen auf die Expression im Bereich der Neuralfalten.

Maßstabsbalken entspricht 250µm.

### 4.2.6 Expression im NF-Stadium 24

Zu diesem Entwicklungszeitpunkt zeichnet sich der Embryo äußerlich bereits durch eine Augenanlage und eine Zementdrüse aus. Exprimiert wird das Gen *trim36* in verschiedenen Bereichen des Organismus. Auffällig erscheint zunächst die Expression in der gesamten Augenanlage (Abb. 29). Weiterhin wurden auch cerebrale Anteile, wie Mes- und Rhombencephalon, in der WMISH angefärbt. Dies wird besonders deutlich in den Schnittbildern (Abb. 29C', C''). Ebenfalls zeigt das gesamte Rückenmark eine Signalanreicherung. Allerdings wird im posterioren und anterioren Anteil eine verstärkte Expression deutlich. In der kaudalen Körperhälfte des Embryos wird eine Expression von *trim36* in mehreren Somiten sichtbar. Anschnitte durch ein Somitenpaar, sowie durch Rückenmark und Chorda dorsalis zeigen ebenfalls die Schnittbilder (Abb. 29C'''). Im Schnitt C'''' ist eine Zweiteilung des Neuralrohrs sichtbar.

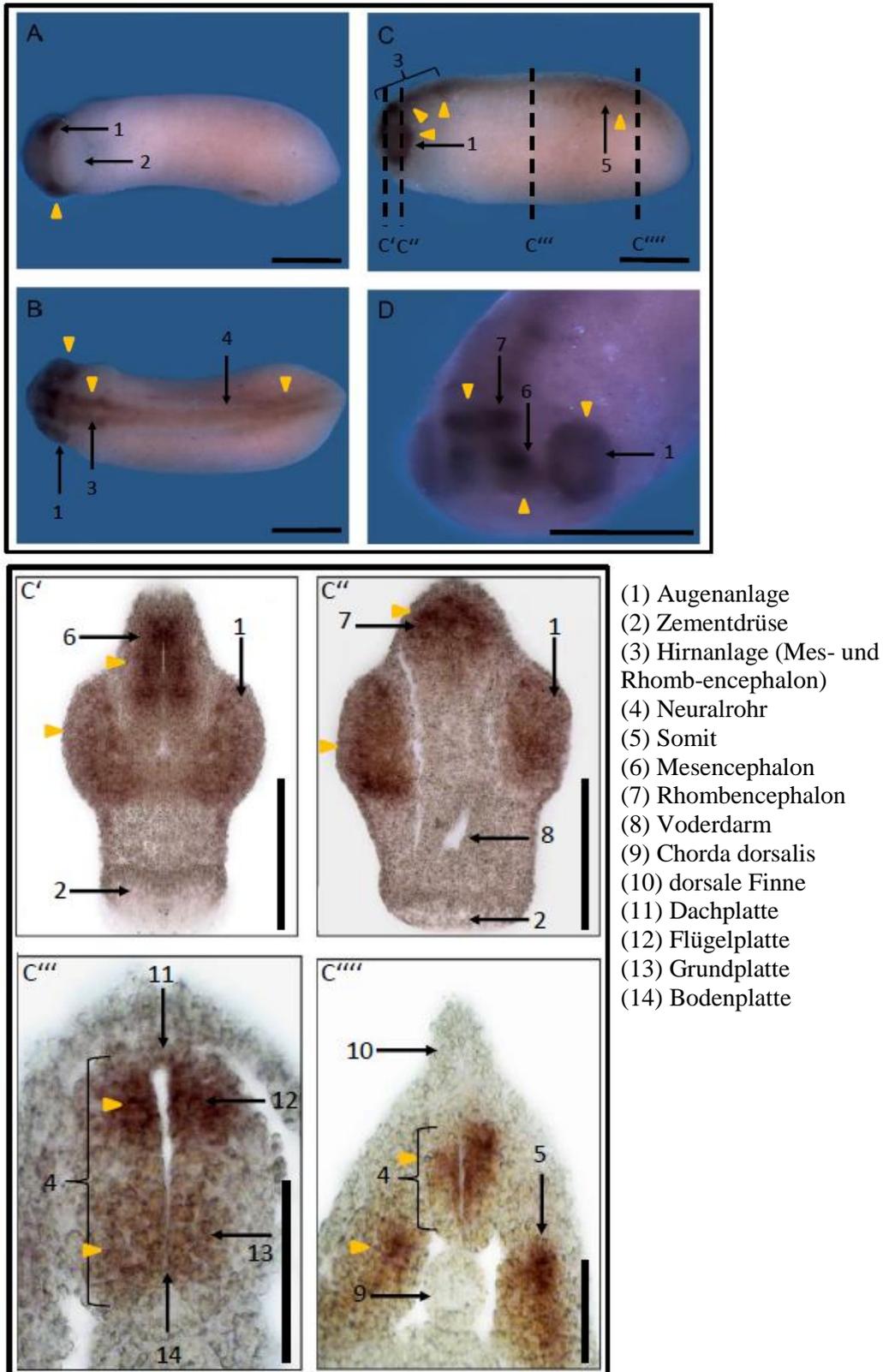


Abb. 29: WISH von *trim36* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 24. (A) ventrale Ansicht, (B) dorsale Ansicht, (C) laterale Ansicht mit eingezeichneten Schnittebenen (C'), (C''), (C''') und (C''''), (D) anteriore Ansicht. Die gelben Pfeile weisen auf die Expression im Bereich der Augenanlage, des Gehirns, der Somiten und des Neuralrohres. Maßstabsbalken entspricht bei (A), (B), (C), (C'), (C'') und (D) 500µm, bei (C''') und (C''') 50µm.

## Ergebnisse

Die ausgeprägteste Färbung zeigt sich im Bereich der Flügelplatten. Ebenfalls ist eine Expression im Bereich der Grundplatte zu erkennen. Diese ist aber weniger stark als in den Flügelplatten. Boden- und Deckplatte lassen sich in den Schnitten schwer abgrenzen. Hier ist allenfalls eine leichte Färbung zu erkennen. Im Schnitt C''''', welcher sich im kaudal dorsalen Bereich des Embryos befindet, ist, neben der Signalanreicherung im Neuralrohr, die Anfärbung eines Somitenpaares zu erkennen.

### 4.2.7 Expression im NF-Stadium 27

Der Embryo im Entwicklungsstadium 27 zeigt verschiedene Areale mit einer Expression von *trim36*. Deutlich wird die Färbung vor allem in cerebralen Strukturen. Hierbei zeigt sich eine Anreicherung im embryonalen Mes- und Rhombenzephalon. Wie auch in früheren Stadien lässt sich eine Farbanreicherung der WMISH im Auge erkennen. Ein schwächeres Signal zeigt sich beidseits paramedian der Wirbelsäule. Paarig angelegt, eventuell mit Bezug auf die Somiten, lässt sich diese, jeweils punktförmige Färbung, entlang der Wirbelsäule von kranial nach kaudal verfolgen. Vorallem im kaudalen Bereich ist eine starke Färbung im Bereich der Somitananlagen sichtbar. Weitere zu diesem Entwicklungszeitpunkt identifizierbare Strukturen sind die Haftdrüse, sowie dorsale und ventrale Finne, welche allerdings keine Expression zeigen (Abb. 30).

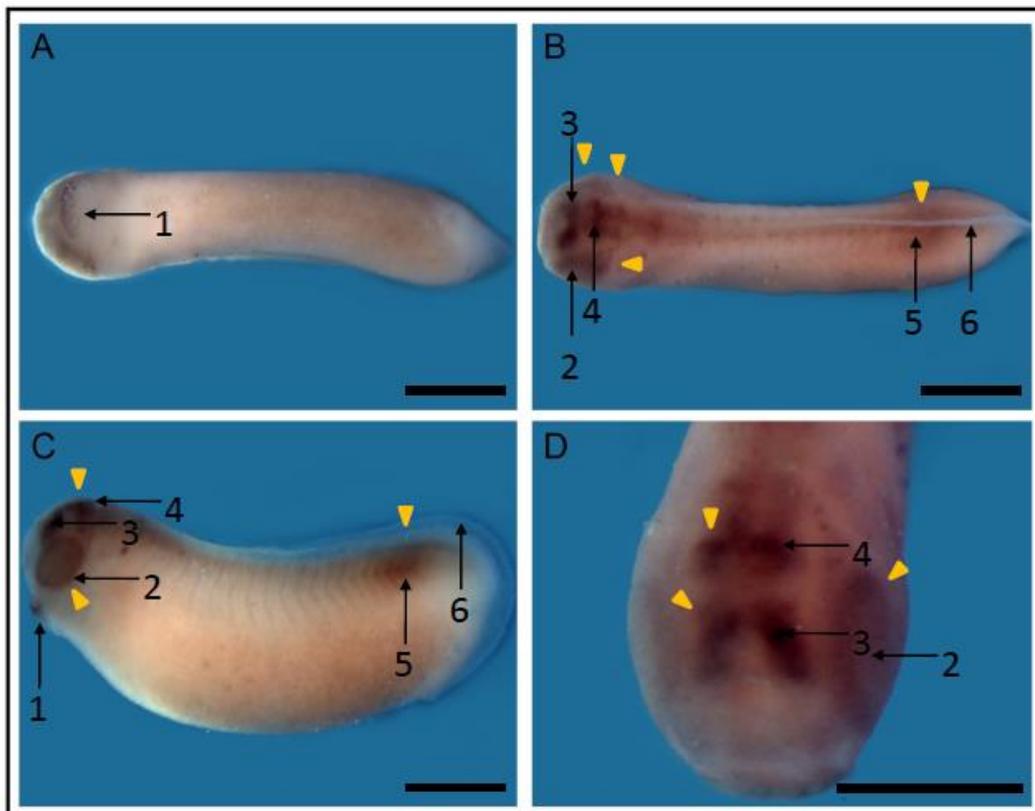


Abb. 30: WMISH von *trim36* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 27.

(A) ventrale Ansicht (B) dorsale Ansicht, (C) laterale Ansicht, (D) anteriore Ansicht.

(1) Haftdrüse

(2) Auge

(3) Mesenzephalon

(4) Rhombenzephalon

(5) Somiten

(6) dorsale Finne.

Die gelben Pfeile weisen auf die Expression im Bereich der Augenanlage, des Gehirns, der Somiten und des Neuralrohres. Maßstabsbalken entspricht 500 $\mu$ m.

#### 4.2.8 Expression im NF-Stadium 30

Das Expressionsverhalten von *trim36* im Stadium 30 gleicht dem Bild von Stadium 27. Zwar hat sich der Embryo in Form und Größe verändert, was sich beispielsweise an der weiter entwickelten Finnenstrukturen zeigt, jedoch sind die farbanreichernden Strukturen weiterhin erhalten. Eine Expression zeigt sich demzufolge in Mes- und Rhombenzephalon, der Augenanlage und paramedian der Wirbelsäule. Bei letzteren wird dies insbesondere im kaudalen Rückenbereich des Embryos deutlich. Hier sind die Somiten im Vergleich zum restlichen embryonalen Dorsum besonders gefärbt (Abb.31).

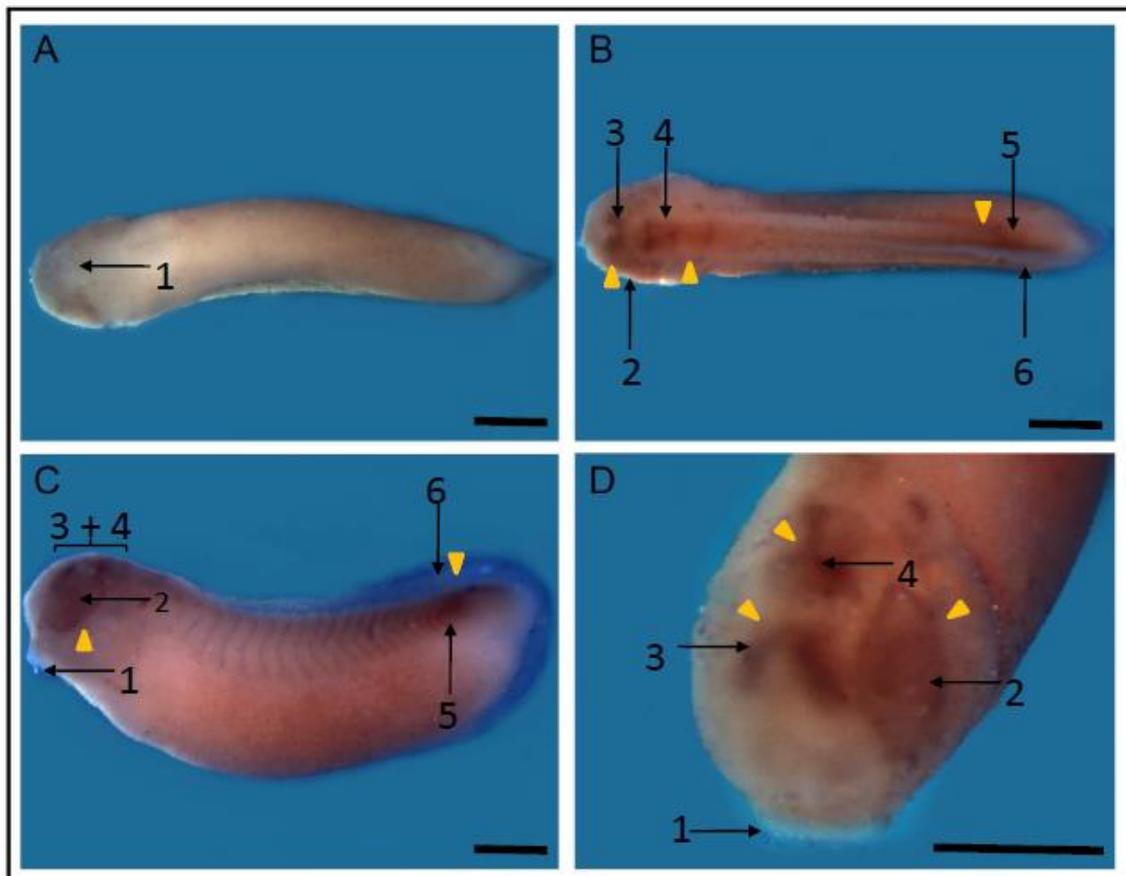


Abb. 31: WMISH von *trim36* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 30. (A) ventrale Ansicht (B) dorsale Ansicht, (C) laterale Ansicht, (D) anteriore Ansicht.

- |                   |                     |
|-------------------|---------------------|
| (1) Haftdrüse     | (2) Auge            |
| (3) Mesenzephalon | (4) Rhombenzephalon |
| (5) Somiten       | (6) dorsale Finne.  |

Die gelben Pfeile weisen auf die Expression im Bereich der Augenanlage, des Gehirns und der Somitenanlagen. Maßstabsbalken entspricht 500µm.

#### 4.2.9 Expression im NF-Stadium 33

Da sich auch zu diesem Entwicklungszeitpunkt ein ähnliches Expressionsmuster wie in den Stadien 27 und 30 zeigt, wurden nun zusätzlich Schnittbilder des Embryos angefertigt um die intern gelegenen Strukturen genauer differenzieren zu können. Bereits in den Fotografien ist wieder die Färbung in Mes- und Rhombenzephalon (Abb. 32B, D), im Auge und im Bereich der kaudalen Somiten zu erkennen. Die Schnitte erlauben detailliertere Einblicke in das Expressionsmuster im Inneren des Embryos. Ebenfalls wird hier die Expression in Mes- und Rhombenzephalon (Abb. 32E, G, H) deutlich. Die Farbanreicherung im Auge lässt sich nun genauer beschreiben. Ein Signal zeigt sich insbesondere in neurosensorischen Anteilen der Retina (Abb. 32F). Im retinalen Pigmentepithel sowie in der Linse ist keine Expression zu erkennen. Rostral der Augenanlage wird *trim36* im Ganglion trigeminale (Abb. 32H) exprimiert. Weiterhin wird eine strangförmige Expression kaudal der Augenanlage deutlich (Abb. 32I, J; Nr. 13 und 15). Hierbei könnte es sich einerseits um zum Auge zugehöriges Gewebe, aber auch um einen Hirnnerven handeln. Aufgrund der räumlichen Nähe zum Ganglion trigeminale wäre es möglich, dass es sich bei der strangförmigen Struktur um den Nervus trigeminus handelt. In den Schnitten zeigt sich außerdem eine Farbanreicherung in der Ohrenanlage (Abb. 32M). Neben den Signalen im Kopfbereich existieren weitere im Mittelteil bzw. im Schwanz des Embryos (Abb. 32C). Diese stehen in örtlichen Bezug zur Wirbelsäule. *Trim36* wird im Neuralrohr (Rückenmark) des Embryos exprimiert (Abb. 32P, P'). Dies zeigt sich bereits in der Medulla oblongata (Abb. 32O), welche zwar zum Rhombenzephalon zugehörig ist, jedoch den Übergang von cerebralen zu spinalen neuronalen Strukturen darstellt. Die Chorda dorsalis bleibt ohne Signal (Abb. 32 I-P). Im Schwanzanteil des Embryos wird die starke Färbung der Somiten deutlich (Abb. 32P, P').

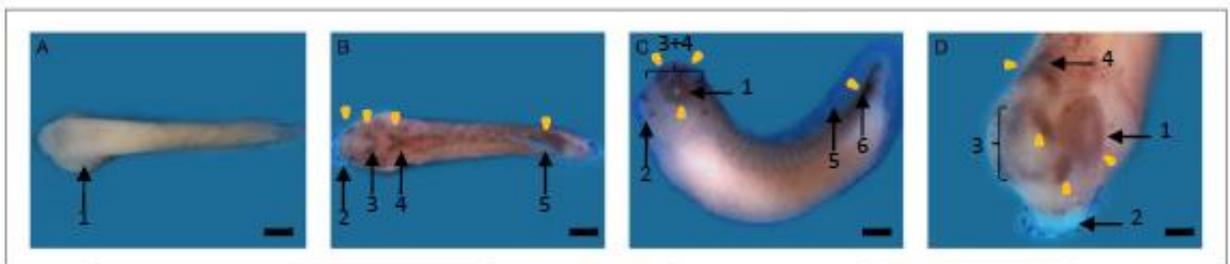
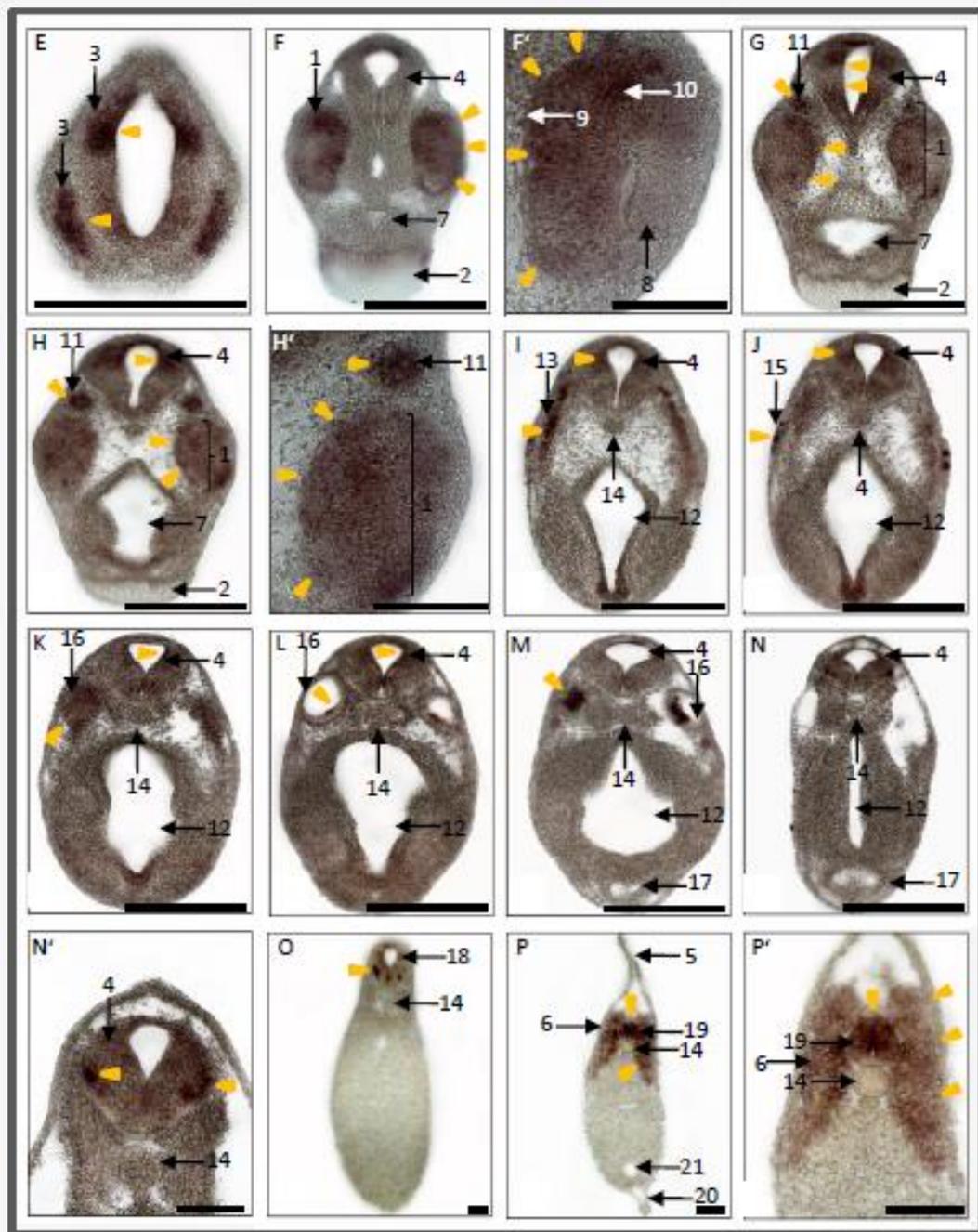


Abb. 32: WMISH von *trim36* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 33. (A) ventrale Ansicht (B) dorsale Ansicht, (C) laterale Ansicht, (D) anteriore Ansicht. Die Abbildung musste auf zwei Seiten verteilt werden. Die weitere Legende befindet sich auf der nächsten Seite.



zu Abb.: 32 (E), (F), (G), (H), (I), (J), (K), (L), (M), (N) zugehörige Schnittebenen im Kopfbereich, sowie (H') Vergrößerung des Auges und (N') Vergrößerung des Rhombenzephalons. (O) Schnitt im Bereich der Körpermitte mit Anschnitt der Medulla oblongata. (P) Schnitt durch den Schwanzbereich mit (P') Vergrößerung. Die gelben Pfeile weisen auf die Expression im Bereich der Augenanlage, der Ohrenanlage, des Gehirns, des Neuralrohres und der Somitenanlagen. Maßstabsbalken entspricht für (A), (B), (C), (D), (E), (F), (G), (H), (I), (J), (K), (L), (M), (N) 500µm und für (F'), (H'), (N'), (O), (P) und (P') 150µm.

- |                          |                                |                              |
|--------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| (1) Auge                 | (2) Haftsdrüse                 | (3) Mesenzephalon            |
| (4) Rhombenzephalon      | (5) dorsale Finne              | (6) Somiten                  |
| (7) Vorderdarm           | (8) Linse                      | (9) retinales Pigmentepithel |
| (10) neurosensor. Retina | (11) Ganglion trigeminale      |                              |
| (12) Mitteldarm          | (13) Hirnnerv (Bezug zum Auge) |                              |
| (14) Chorda dorsalis     | (15) Hirnnerv (Bezug zum Ohr)  |                              |
| (16) Ohranlage           | (17) Herzanlage                |                              |
| (18) Medulla oblongata   | (19) Neuralrohr                | (20) ventrale Finne          |
| (21) Hinterdarm          |                                |                              |

#### 4.2.10 Expression im NF-Stadium 36

Im Stadium 36 lässt sich eine Expression kaum mehr nachweisen (Abb. 33). Grund hierfür könnte einerseits die beginnende Pigmentierung des Embryos. Wahrscheinlich ist jedoch im Hinblick auf die Analyse der RT-PCR, dass *trim36* im Stadium 36 weniger exprimiert ist.

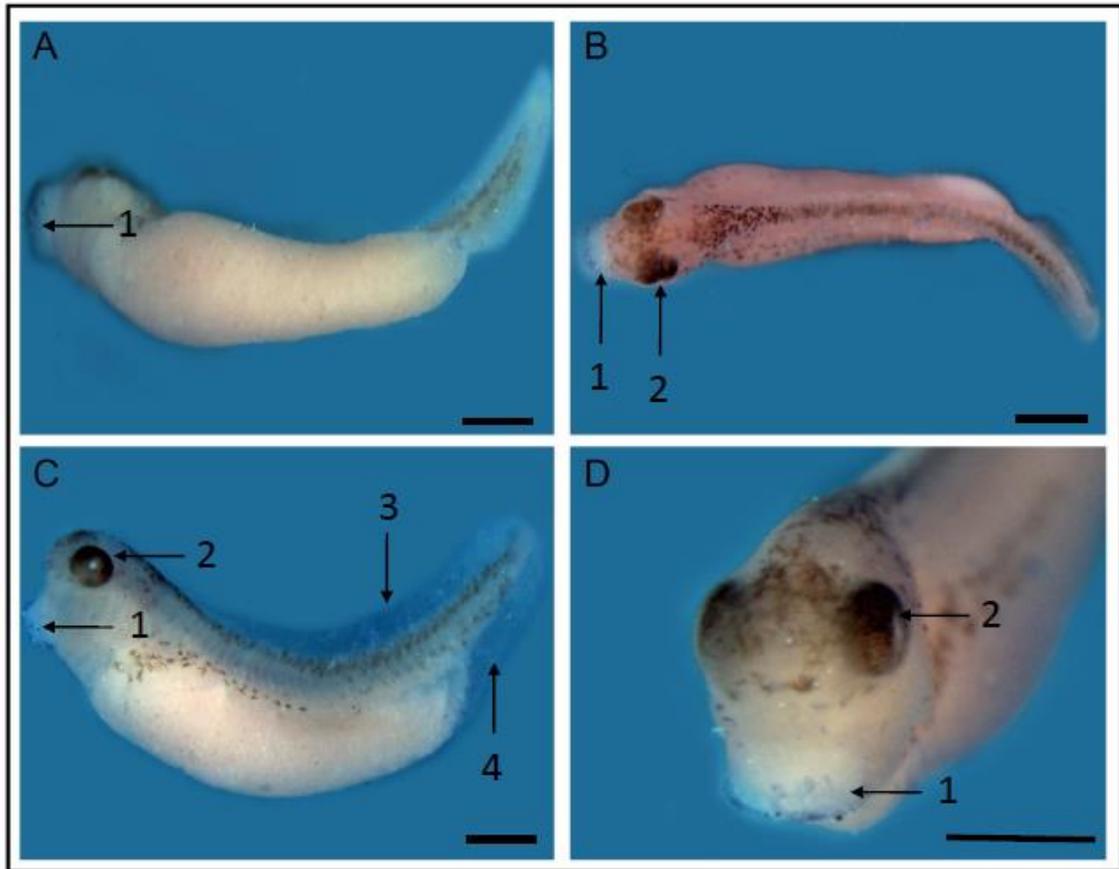


Abb. 33: WMISH von *trim36* auf *Xenopus laevis* Embryonen im NF-Stadium 36. (A) ventrale Ansicht (B) dorsale Ansicht, (C) laterale Ansicht, (D) anteriore Ansicht. (1) Haftdrüse (2) Auge (3) dorsale Finne (4) ventrale Finne  
Eine Expression ist bei beginnender Pigmentierung nicht zu erkennen. Der Maßstabsbalken entspricht 500µm.

#### 4.3 Expressionsanalyse mittels RT-PCR

Mit der RT-PCR wurde analog der Stadienauswahl der WMISH die Expression von *trim29* und *trim36* überprüft.

Das Haushaltsgen *ODC* wurde als Kontrolle der RT-PCR genutzt. Es sollte über alle untersuchten Stadien die gleiche Signalstärke aufweisen und dient somit als Ladekontrolle zu *trim29* und *trim36*.

### 4.3.1 RT-PCR von *trim29*

In der semiquantitativen Reverse-Transkriptase-PCR zeigt sich in den frühen Stadien 0, 3, 6 und 9 keine Expression von *trim29*. Es wird nicht maternal exprimiert. Eine indirekte Amplifikation des Transkriptes lässt sich erst im Stadium 12, nach Beginn der zygotischen Expression, erkennen. Quantitativ scheinen die Transkriptmengen in den Stadien 12, 15, 18 und 21 vergleichbar zu sein. In den Stadien 24, 27, 30, 33, 36, 39 und 42 wird *trim29* in Relation weniger exprimiert (Abb. 34). Diese Ergebnisse können die Ergebnisse der WMISH-Untersuchung bestätigen.

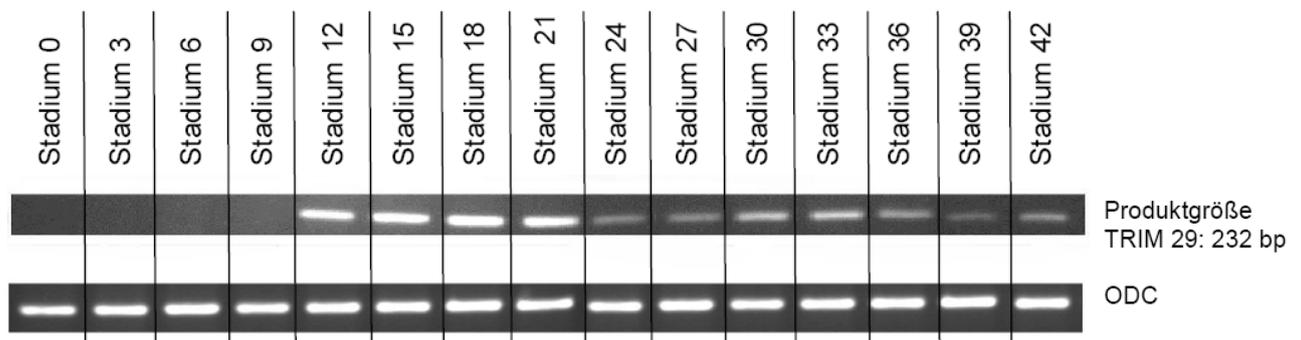


Abb. 34: semiquantitative RT-PCR für *trim29*  
Expression in den Stadien 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39 und 42;  
Kontrolle der semiquantitativen durch gleichzeitige PCR mit ODC I (ubiquitär in allen Stadien vorkommend. Zyklenzahl: 28. Annealingtemperatur: 59°C.

### 4.3.2 RT-PCR von *trim36*

In der Expressionsanalyse von *trim36* mittels der RT-PCR zeigt sich eine indirekte Amplifikation des Transkriptes in allen aufgeführten Stadien (Abb. 35), jedoch in unterschiedlich starker Ausprägung. Es wird maternal exprimiert und man kann es in relativ großen Amplifikationsmengen in den Stadien 0 bis 9 finden. Eine etwas abgeschwächte Expression lässt sich während der Gastrulation (NF-St. 12) und der frühen Neurogenese (ab NF-St. 15) erkennen. Ab NF-St. 18 beginnt die Transkriptmenge anzusteigen bis es in NF-St. 24 erneut absinkt. Zwischen NF-St. 24 und 36 bleibt die Expression auf einem relativ gleichmäßigen Niveau.

## Ergebnisse

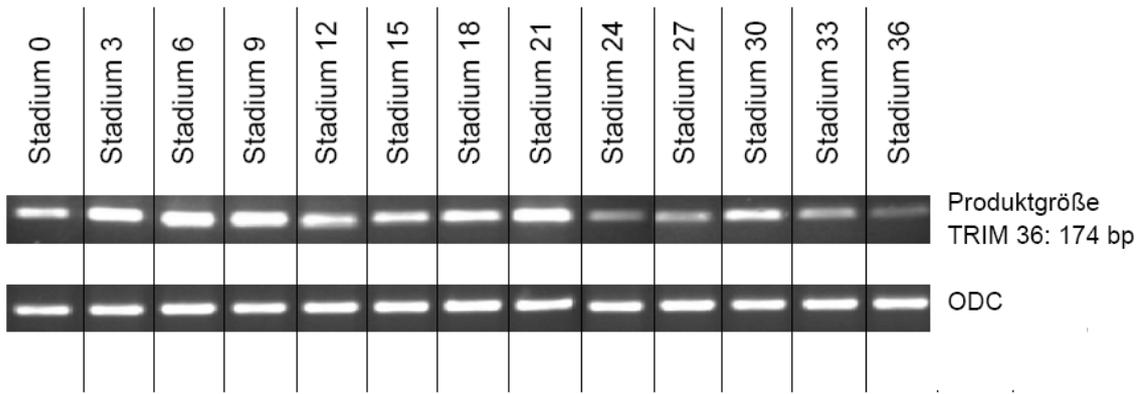


Abb. 35: semiquantitative RT-PCR für *trim36*  
 Expression in den Stadien 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 und 36;  
 Kontrolle der semiquantitativen durch gleichzeitige PCR mit ODC I (ubiquitär in allen  
 Stadien vorkommend. Zyklenzahl: 28. Annealingtemperatur: 54°C.

## 4.4 Homologie und Struktur der Proteine in verschiedenen Organismen

### 4.4.1 Homologie und Struktur bezüglich Trim29

Hinsichtlich der Struktur von Trim29 zeigt sich eine Besonderheit. Die eingangs geschilderte Grundstruktur der Tripartite-motif-Familie ist hier nicht in jedem Organismus ersichtlich. In Abbildung 36, welche mit Hilfe der Internetseiten ClustalW und NCBI erstellt wurde, wird gezeigt, dass keine RING-Domänen vorhanden sind. Des Weiteren finden sich konservierte B-Boxes nur in den Organismen Mensch, Maus, Ratte, Hund, Huhn, Krallenfrosch, Kugelfisch. Die Proteinsequenzen stimmen hier weitestgehend überein. Beim Fadenwurm und bei der Eulennapfschnecke konnten keine typischen Domänen erkannt werden.

Vergleicht man, unter Nutzung des „Protein-Blast-Programmes“ von „NCBI“, die Proteinstruktur von Trim29 zwischen menschlichem Organismus und der Amphibie *Xenopus laevis* zeigt sich eine Übereinstimmung von 48 Prozent. Eine detaillierte Sequenzanalyse findet sich in Abbildung 36.

```

Hsa_  MEAADASRSNGS SPEARDARSPSPGSGSLENGTKADGKDAKT TNGHGGEA 50
Rno_  MEGADASRSNGASPEARDARSPPGPNSLENGTKADSKDTKT TNGHSGEV 50
Mmu_  MEGADACRSNGASPEARDTRSPPGPNSLENGTKADSKDTKT TNGHSGEV 50
Cfa_  MEAADASRSNGASPEARDARSPPGPNPLENGAKAEGQDAKTSNGHGGEA 50
Gga_  METGSAARTNGTAGKPEDVKSPSAP-----KKDEEVKKT TNPGGGEK 42
Tru_  -----MAQAGVVLDRDHFSCSI 17
Xtr_  MEEQDTKKSNGSFS-----EDANDTSITD----EK 26
Lgi_  -----
Cel_  -----

Hsa_  AEGK-SLGSALKPGEGRSALFAGNEWRRPIIQFVESGDDKNSNYFSMDSM 99
Rno_  TEGK-TLGSALKSGEGKSGLFSSNEWRRPIIQFVESVDDKGSSYFSMDSA 99
Mmu_  TEGK-TLGSALKSGEGKSGLFSSNEWRRPIIQFVESVDDKGSSYFSMDSA 99
Cfa_  AEGK-SPGGAPKPEGKSSLFSGNEWRRPIIQFVESVDDKASSYFSMDSG 99
Gga_  EPIKGTGTSLETGQIKSSLFSGSDWKRPIIQFVESSDEKRSTYFSMDSA 92
Tru_  CLDLVKNPVTIPCGHSYCSDCIENYWDQ-----DQYLAVFSCPQC 57
Xtr_  DIQN---GPGFDQGCTKILKTN-----ISSGGV 52
Lgi_  -----MATNVSINQC 10
Cel_  -----
  
```



## Ergebnisse

```

Hsa_ NHMENG--GDHRYVNNYTNSFGGEW SAPDTMKRYSMYLT PKG-GVRTSYQ 486
Rno_ NHMENG--GDHRYMNNYTSSYGNEW STPDTMKRYSMYLT PKG-GGRTSYQ 486
Mmu_ NHMENG--GDHRYMNSYTSSYGNEW STPDTMKRYSMYLT PKG-GGRTSYQ 486
Cfa_ I----- 432
Gga_ NHMENAPPGDHRYMMN-----YEWNPQDNLKRFSMFLSPK GKAAQQLSS 483
Tru_ -----
Xtr_ N-----VENRYMMKDLT---TDWAPSADYGRFGALFNIKG-NFLFLKI 390
Lgi_ E-----KNHFSVDNHDLEKLSLTLRAAKDLHIGL 323
Cel_ -----

Hsa_ PSSPGRFTKETTKQNFNNLYGTKGNYTSRVWEYSSSIQNSDNDLPVVQGS 536
Rno_ PSSPNRLSKETNLKNFNNLYGTKGNYTSRVWEYSSSTVQNA D-DMPTVQGN 535
Mmu_ PSSPSRLSKETNQKNFNNLYGTKGNYTSRVWEY STVQNSE-DMPTVQGN 535
Cfa_ -----
Gga_ KHSTESRHGISSFQATEETLGTVGNGTKLPFQFSSVGQNPPGDFSKQS-D 532
Tru_ -----
Xtr_ YHCRHYGATICISSKYKIYFCVAGSPQVSAYQFSSSTVTSTDSNTAPDS-- 438
Lgi_ YLN----- 326
Cel_ -----

Hsa_ SSFSLKGYPSLMRSQSPKAQPQTWKS GKQTM LSHYRPFYVNKGN GIGSNE 586
Rno_ SSFSLKGYPSLLRSQVPKAQPQTWKS GKQTL LSHYRPFYVNKGS GIGSNE 585
Mmu_ SSFSLKGFPSLLRSQVPKAQPQTWKS GKQTL LSHYRPFYVNKGS GIGSNE 585
Cfa_ -----
Gga_ GGFCCPAYPSIVRHQSANLRP-TWKS SKQSV LSHYRPFYVNKGN GATSNE 581
Tru_ -----
Xtr_ NPYNNMNVYPMMTRHQTNKSLPQTWKS AKPTLLTQORPFYVNKGNAASTDT 488
Lgi_ -----
Cel_ -----

Hsa_ AP 588
Rno_ AP 587
Mmu_ AP 587
Cfa_ --
Gga_ AP 583
Tru_ --
Xtr_ P- 489
Lgi_ --
Cel_ --

```

Abb. 36: Sequenzvergleich der Proteinsequenz von Trim29 zwischen den Organismen *Homo sapiens* (Hsa), *Rattus norvegicus* (Rno), *Mus musculus* (Mmu), *Canis familiaris* (Cfa), *Gallus gallus* (Gga), *Takifugu rubripes* (Tru), *Xenopus tropicalis* (Xtr), *Lottia giagantea* (Lgi) und *Caenorhabditis elegans* (Cel); grün hinterlegt: Proteinsequenz von *Xenopus tropicalis*; gelb hinterlegt: Übereinstimmungen mit der Proteinsequenz von *Xenopus tropicalis*. Rote Schriftfarbe: B-Box-Domäne. Quelle: mit Hilfe von ClustalW2, 26.12.2014

### 4.4.2 Homologie und Struktur bezüglich Trim36

Der menschliche Organismus weist verschiedene Isoformen des Proteins Trim36 auf. Exemplarisch wurde die Proteinsequenz der Isoform1 im *Homo sapiens* mittels „NCBI Protein-Blast-Programm“ mit der Sequenz des Proteins Trim36 im *Xenopus laevis* verglichen. Isoform1 wurde aufgrund der höchsten Übereinstimmung gewählt. Hier zeigte sich eine Übereinstimmung von 64 Prozent. In Abbildung 37 ist ein Sequenzvergleich des Gens in verschiedenen Organismen dargestellt. Zudem wurden die Trim-typischen Domänen, RING-Domäne und B-Box, markiert. Des Weiteren konnten zwei weitere, für Trim36 charakteristische

## Ergebnisse

Domänen, dargestellt werden. FibronectinIII und SPRY wurden ebenfalls farbig markiert. Innerhalb der Domänen zeigt sich eine hohe Übereinstimmung der Proteinsequenzen.

```

Hsa_ -----
Rno_ -----
Mmu_ -----
Cfa_ MVWPMIQVTELRHHLFSFPSRGGCFGIWGKEAASTPAGGAPEQAFIRRA 50
Gga_ -----
Ola_ -----
Tru_ -----
Xtr_ -----

Hsa_ -----
Rno_ -----
Mmu_ -----
Cfa_ VRSLLRGRPSSPHLSCKQTVPFSTTSFKSSGWRRGCTAADRATTGGAVELF 100
Gga_ -----
Ola_ -----
Tru_ -----
Xtr_ -----

Hsa_ -----
Rno_ -----
Mmu_ -----
Cfa_ TATDVSQIESTSRKLSKASAGFLCCSRGPFTQLSRAPVSPVLYARVDSAS 150
Gga_ -----
Ola_ -----
Tru_ -----
Xtr_ -----

Hsa_ -----
Rno_ -----
Mmu_ -----
Cfa_ REGSGGTSNAAFQAPQVSRFPFRAGRGDGGAAPGSPGRWRSRWSPGGTAGR 200
Gga_ -----
Ola_ -----
Tru_ -----
Xtr_ -----

Hsa_ -----MSESGE----- 6
Rno_ -----
Mmu_ -----MSESEE----- 6
Hsa_ -----MSESGE----- 6
Cfa_ RPPPRATWREPVRQRRAPGCASSSGVRAAGDRRETPSSPDEPGRKRAK 250
Gga_ -----KSKRAD----- 6
Ola_ -----SGSP----- 4
Tru_ -----MSDSED----- 6
Xtr_ -----

Hsa_ -MSEFGYIMELIAKGKVTIKNIERELICPACKELFTHPLILPCQHSICHK 55
Rno_ -----
Mmu_ -ISFEGYIMELLAKGKVTIKNIEKELICPACKELFTHPLILPCQHSVCHK 55
Cfa_ NRAEVDREPLGEAPARVTIKNIERELICPACKELFTHPLILPCQHSICHK 300
Gga_ -LNAWLAIGFLLLSKVATKSIERELICPACNELFTHPLILPCQHNLCHK 55
Ola_ -----GSLIVPIKNIERELICPICKELFTHPLILPCQHSVCHK 42
Tru_ -MTEFASIVERIERERGEVPIKNIERELICPSCKELFTHPLILPCQHSICHK 55
Xtr_ -MEGTGRRESVGGQGVIKNIERELVCPACKELFTHPLILPCQHSICHK 48

Hsa_ CVKELLTLLDSDFNVDVGSDNSNQSSPRLRLSPSPMDKIDRINRP----- 99
Rno_ -----NYT----- 3
Mmu_ CVKELLTLLDSDFNVDVGSDNSNQSSPRLRLTSPSPMDKIDKINRP----- 99
Cfa_ CVKELLTLLDSDFIDVGSDNSNQSSPRLRLSPSPMDKIDRLSRP----- 344
Gga_ CVKDILFTVEDSFADAGSESSNQSSPFRISSASMDKIDRISRSDLKSGF 105
Ola_ CVRELLMLNHDDSFADAGSECSLPGSPRSRVPSPSMERLDRLVRSGSISS- 91
Tru_ CVRELLMITHEDSFADAGSECSLPGSPRSRVPSPSMERLDRLVRSGSISS- 104
Xtr_ CVRELLYLTLLEDSTDVSSSEASTPGSPRIRMTSPSVERIDRLVRSASQRSS 98

```

## Ergebnisse

|      |                      |                 |                |             |                    |          |
|------|----------------------|-----------------|----------------|-------------|--------------------|----------|
| Hsa_ | ----GWKRNSLTPRTIVFP  | CPGCEHDV        | DLGERGINGLFRNF | TLET        | IVERY              | 145      |
| Rno_ | ----GWKRNSLTPRPTMFPC | PGCEHDV         | DLGERGV        | SGLFRNF     | TLET               | IVERY    |
| Mmu_ | ----GWKRNSLTPRPTTFPC | PGCEHDV         | DLGERGV        | SGLFRNF     | TLET               | IVERY    |
| Cfa_ | ----GWKRGSLTPRTTTFPC | PGCEHDV         | DLGERGINGLFRNF | TLET        | IVERY              | 390      |
| Gga_ | AVYAGRKRNSLTPRTTMFPC | PGCLHDI         | DLGERGV        | NGLFRNF     | TLET               | IVERH    |
| Ola_ | ---PGWRRGSVTPRVTTIP  | CPGQHD          | IDLGERGI       | SMLFRNF     | TLEN               | IVERY    |
| Tru_ | ---PGWRRGSVTPRVTTIP  | CPGQHD          | IDLGERGI       | SMLFRNF     | TLES               | IVERY    |
| Xtr_ | LGRRGSKRNSLTPKITTIS  | CPGCLHDV        | DLGERGINGLFRNF | TLEA        | IVERY              | 148      |
| Hsa_ | RQAARAATAIMCDLCKPP-  | PQESTKSCMDC     | SASYCNECFKI    | HHPWGT      | IKA                | 194      |
| Rno_ | RQAARAATAIMCDLCKPP-  | PQESTKSCMDC     | SASYCNECFKI    | YHPWGT      | VKA                | 98       |
| Mmu_ | RQAARAATAIMCDLCKPP-  | PQESTKSCMDC     | SASYCNECFKI    | YHPWGT      | VKA                | 194      |
| Cfa_ | RQAARAATAIMCDLCKPP-  | PQESTKSCMDC     | SASYCNECFKI    | YHPWGT      | VKA                | 439      |
| Gga_ | RQAARAAIAIMCDFCKPP-  | PQESTKSCMDC     | SASYCNECFK     | VHHPWGT     | VKA                | 204      |
| Ola_ | RQAARAAVAIMCNICKPPN  | QEQATKSCMD      | CKASYCNECFK    | LHHPWGT     | PKA                | 188      |
| Tru_ | RQAARAAVAIMCNVCKPP-  | QEQATKSCMD      | CRASYCNECFK    | LHHPWGT     | PKA                | 200      |
| Xtr_ | RQAARAATAIMCDYCKPP-  | AQESTKSCMDC     | NASFCNECFK     | INHHPWGT    | VKA                | 197      |
| Hsa_ | QHEYVGPTTNFRPKI      | LMCPHE          | TERINMYCEL     | CRRPVCHL    | CKLGGNHANH         | 244      |
| Rno_ | QHEYVGPTTNFRPKI      | LMCPHE          | TERINMYCEL     | CRRPVCHL    | CKLGGNHSNH         | 148      |
| Mmu_ | QHEYVGPTTNFRPKVL     | LMCPHE          | TERINMYCEL     | CRRPVCHL    | CKLGGNHSNH         | 244      |
| Cfa_ | QHEYVGPTTNFRPKI      | LMCPHE          | TERINMYCEL     | CRRPVCHL    | CKLGGNHSNH         | 489      |
| Gga_ | QHEYVGPTTNIRLKV      | LMCPHE          | HEMERVNMYCE    | ICRRPVCHL   | CKLGGSHANH         | 254      |
| Ola_ | QHEYVGPTTNFRPKVL     | LMCPHE          | MEKVNMYCEV     | CKRPVCHL    | CKLGGSHANH         | 238      |
| Tru_ | QHEYVGPTTNFRPKVL     | LMCPHE          | MEKVNMYCEV     | CRRPVCHL    | CKLGGSHANH         | 250      |
| Xtr_ | QHEYVGPTNQFRPKVL     | LMCPHE          | MEKVNMYCEI     | CRRPVCHL    | CKLGGAHANH         | 247      |
| Hsa_ | RVTTMS               | SAYKTLKEKLSKDI  | DYLI           | GKESQVKSQI  | SELNLLMKETE        | CNGER    |
| Rno_ | RVTTMS               | SAYKTLKEKLSKDI  | DFLI           | GKESQVKSQI  | SELNLLMKETE        | CNGER    |
| Mmu_ | RVTTMS               | SAYKTLKEKLSKDI  | DFLI           | GKESQVKSQI  | SELNLLMKETE        | CNGER    |
| Cfa_ | RVTTMS               | SAYKTLKEKLSKDI  | DYLI           | GKESQVKSQI  | SELNLLMKETE        | CNGER    |
| Gga_ | RVTTMS               | STAYKTLKEKLSKDI | EYLI           | SKESQVKAHIS | QLGLLLKETE         | SNGER    |
| Ola_ | KVTSM                | SAYKILKEKLAKSI  | IHYLISKEDQV    | RTQIT       | TELELLISQTE        | ENGQL    |
| Tru_ | KVTSM                | SAYKILKEKLAKSI  | IHYLISKEDQV    | RTQIT       | GLEQLISRTE         | ENGLL    |
| Xtr_ | RVTTMS               | STAYKTLKEKLT    | KGISYLI        | SKESQVKDQL  | SELEILIKQTES       | NGEK     |
| Mmu_ | AKEEALAHFEKLF        | EILEDRKSSVLKAI  | DASKKLRLDK     | FHTQ        | MEEYQGLLE          | 344      |
| Rno_ | AKEEALAHFEKLF        | EILEDRKSSVLKAI  | DASKKLRLDK     | FHTQ        | MEEYQGLLE          | 248      |
| Hsa_ | AKEEAITHFEKLF        | FEVLEERKSSVLKAI | DSSKKLRLDK     | FQTQ        | MEEYQGLLE          | 344      |
| Cfa_ | AKEEAITHFEKLF        | EILEERKSSVLKAI  | DASKKLRLDK     | FQTQ        | VEEYQGLLE          | 589      |
| Gga_ | AKEEASQSFEKLI        | NILEEKSAALRAI   | EVSKNLRLDK     | LRTQ        | AEEYQGLLE          | 354      |
| Xtr_ | AKEDATYNFEKLYN       | ILEERKSFVMRS    | IEENSKSLR      | LEKLNQ      | VEEYQGLLE          | 347      |
| Ola_ | AERQANEHFERL         | FETLQERRSEMLRS  | IEQSRNR        | RMEQLKSQ    | VEEYQGMLE          | 338      |
| Tru_ | AERRATEHFERL         | FEALQERKSDMLRS  | IEQSRNR        | RMGQLKAQ    | VEEYQGMLE          | 350      |
| Hsa_ | NGLVGYAQEVLKETD      | QSCFVQ          | TAKQLHLRIQKAT  | ESLKSFRPAAQ | TSFE               | 394      |
| Rno_ | NGLVGYAQEVLKETD      | QSCFVQ          | TAKQLHLRIQKAT  | ESLKSFRPAAQ | ASFE               | 298      |
| Mmu_ | NGLVGYAQEVLKETD      | QSCFVQ          | TAKQLHLRIQKAT  | ESLKSFRPAAQ | ASFE               | 394      |
| Cfa_ | NGLVGYAQEVLKETD      | QSCFVQ          | TAKQLHLRIQKAT  | ESLKSFRPAAQ | TSFE               | 639      |
| Gga_ | NSGLVGYAQEVLKETD     | QSCFVQ          | TAKQLHVRIQKAT  | ESLKSFRPAAE | SSFE               | 404      |
| Ola_ | NSGLVGYAQEVLKETD     | QSCFVQ          | TAKQLHVRIQKAT  | DSLRTFHPA   | ADTCFD             | 388      |
| Tru_ | NSGLVGYAQEVLKETD     | QSCFVQ          | TAKQLHVRIQKAT  | SLRTFHPSA   | ADCFD              | 400      |
| Xtr_ | NGLVGYAQEVLKETD      | HSCFVQ          | IAKQLHRIQKASD  | SLKSFRPAAQ  | PGFE               | 397      |
| Hsa_ | DYVVNTSKQTE          | LLGELSFFSSGIDV  | PEINEEQSKVY    | NNALIN      | WHHPEK-D           | 443      |
| Rno_ | DYVVNISKQTE          | VLGELSFFSSGIDI  | PEINEEQSKVY    | NNALID      | WHHPEK-D           | 347      |
| Mmu_ | DYVVNISKQTE          | VLGELSFFSSGIDI  | PEINEEQSKVY    | NNALID      | WHHPEK-D           | 443      |
| Cfa_ | DYVVNTSKQTE          | LLGELSFFSSGIDV  | PEINEEQSKVY    | NNALIN      | WYHPEK-D           | 688      |
| Gga_ | DFVVD                | TAKQEVILDDLS    | FFSYNGLEI      | PEINEEQ     | CRMYNKAVISWESSGKTD | 454      |
| Ola_ | EFVLD                | TREETLLKEMCFG-  | GVPDP          | PLIDLSQ     | SKVYNEASICWRLADDHL | 437      |
| Tru_ | EFVLE                | TREETLLKEICFG-  | GVPDP          | PLIDLSN     | SKVYNEAAICWRLPEDHQ | 449      |
| Xtr_ | EYFLD                | VAQEEDLLGEIAFS- | KALAMPEIN      | MEQSKIY     | NEARI              | QVQPSDLS |

## Ergebnisse

|      |   |     |
|------|---|-----|
| Hsa_ | KADSYVLEYR-----KINRDEMS                             | 462 |
| Rno_ | KADSYVLEYR-----KINRDEMI                             | 366 |
| Mmu_ | KADSYVLEYR-----KINRDEMI                             | 462 |
| Cfa_ | KADSYVLEYR-----KINRDEMI                             | 707 |
| Gga_ | SADMYVLQYR-----KRNREESV                             | 473 |
| Ola_ | PTDQHVLEYR-----RLVGPSQSPSKEDGEDGGL                  | 466 |
| Tru_ | PTDQQILEYRWVLTQRPWILSNNSMGISVSRGGANLSPSQEDGEDSLS    | 499 |
| Xtr_ | KADSYVLEYR-----RLDK-NEDL                            | 464 |
|      |   |     |
| Hsa_ | -WNEIEVCGTSKIIQDLENSSTYAFRVRAYKGSICSPCSRELI LHTPPAP | 511 |
| Rno_ | SWNEIEVHGTSKVVSNLESNSPYAFRVRAYRGSICSPCSRELVLHTPPAP  | 416 |
| Mmu_ | SWNEIEVHGTSKVVSNLESNSPYAFRVRAYRGSICSPCSRELI LHTPPAP | 512 |
| Cfa_ | SWNEIEVCGTSKVISDLESNCNYAFRVRAYKGSICSPCSRELI LHTPPAP | 757 |
| Gga_ | MWQEAEVYSKSKVISDLDDSSYAFRVRGYKGSICSSWSKEVILRTPPAP   | 523 |
| Ola_ | WRATDRVYGSNTI VNDLEPDSL YSFRVRSRNSMFSPYSPEVAFHTPPAP | 516 |
| Tru_ | WRATERVHGSSTVVCDLDPDNL YAFRVRSRNSMFSPYSPEVTFHTPPAP  | 549 |
| Xtr_ | WNEIEVCGTSKIIQDLENSSTYAFRVRAYKGSICSPCSRELI LHTPPAP  | 514 |
|      |   |     |
| Hsa_ | -VFSFLFDEKCGYNNEHLLNLKRDVSRAGFNLLAAERI QVGYTSL      | 560 |
| Rno_ | -VFSFLFDEKCGYNTEHLLNLKRDVSRAGFNLLAAERI QVGHYTSI     | 465 |
| Mmu_ | -VFSFLFDEKCGYNTEHLLNLKRDVSRAGFNLLAAERI QVGHYTSI     | 561 |
| Cfa_ | -VFSFLFDEKCGYNNEHLLNLKRDVSRAGFNLLAAERI QVGYTSL      | 806 |
| Gga_ | -VFSFLFDDKCGYNSERLLLNPRTTVESRAGFPLLLRAERMQFGCYTSL   | 572 |
| Ola_ | AVFGFLLSDKCGFSAERLVLNKRRDTVESVAGAAFLAAERVQTSYISL    | 566 |
| Tru_ | -VFGFLFSDKCGFSTERLLLKRRDTVENVAGMAFLAADRVQTSYISL     | 598 |
| Xtr_ | -VFSFLFDDKCGYNSERLLLNAQKDTVESMAEISLLGAAEVQVGYTSL    | 563 |
|      |   |     |
| Hsa_ | DYIIGDTGITKGRHFWAFRVEPYSYLVKVGVAASDKLQEWLRS PRDAVSP | 610 |
| Rno_ | DYIIGDVGITKGRHFWACRVEPYSYLVKVGVAASDKLQEWLRS PRDAASP | 515 |
| Mmu_ | DYIIGDVGITKGRHFWACRVEPYSYLVKVGVAASDKLQEWLRS PRDAASP | 611 |
| Cfa_ | DYIIGDVGITKGRHFWAFRVEPYSYLVKAGVAASDKLQEWLRS PRDAVSP | 856 |
| Gga_ | NYIIGDTGIAKGRHFWAFRVEAYSYLVKGVVVSSTKI QKFFHNTHDVTSP | 622 |
| Ola_ | DYIIGDTGISQGRHYWAFKVEPHSYMVKVGVAASDKILEWFHNPRDTSSP  | 616 |
| Tru_ | DYIIGDMGISQGRHYWAFKVEPHSYMVKVGVAASDKILLEWLNPRDTSSP  | 648 |
| Xtr_ | DYIIGDTGITKGRHFWAFRVEPYSYLVKVGVAASDKLQEWLNPRDTSSP   | 613 |
|      |   |     |
| Hsa_ | RYEQDSGHDSGSEDACFDSSQPFTLVITGMKFFIPKSP TSS-----     | 652 |
| Rno_ | RYEQDSGHDSGSEDAYFDSSQPFTLVITGMKFFIPKSP TSS-----     | 557 |
| Mmu_ | RYEQDSGHDSGSEDACFDSSQPFTLVITGMKFFIPKSP TSS-----     | 653 |
| Cfa_ | RYEQDSGHDSGSEDACFDSSQPFTLVITGMKFFIPKSP ATSA-----    | 898 |
| Gga_ | RSEQDSGHDSGSEDACLSSQPFTLVITGMKFFIPKAAADTRA----AA    | 668 |
| Ola_ | RYVQ-----   | 620 |
| Tru_ | RYDHDSDGHDSGSEDACYELCQPFTLLTVGMGKLFIPKASSSSSISSATAP | 698 |
| Xtr_ | RYDSDSDGHDSGSEDTSYDSSQPFTLVITGMKFFIPKSSSEVT-----    | 655 |
|      |   |     |
| Hsa_ | --NEPENRVLPMPTSIGIFLDCDKGKVD FYDMDQMKLYERQVDCSHTLY  | 700 |
| Rno_ | --NEPENRVLPMPTSIGIFLDCDKGKVS FYDMDHMKLYERQVDCSHTMY  | 605 |
| Mmu_ | --NEPENRVLPMPTSIGIFLDCDKGKVS FYDMDHMKLYERQVDCSHTMY  | 701 |
| Cfa_ | --NEPENRVLPMPTSIGIFLDYDKGRVAFYDMDHMKLYERQVDCSHTMY   | 946 |
| Gga_ | DPKDPASRILPLPSCMGICLDCNKGKVFYDASHMKCLYECEVECSGIMY   | 718 |
| Ola_ | -----   |     |
| Tru_ | TSSDPGNRVLPMFORLGVCLDYDACRVFYDADTMRCLYERQVDCSGTMY   | 748 |
| Xtr_ | --CTAAERYLPLPRLGICLDYDGRKVFYDANLHKLYERQVDCSGIMY     | 703 |
|      |   |     |
| Hsa_ | PAFALMGSGGIQLEEPITAKYLEYQEDM                        | 728 |
| Rno_ | PAFALMGSGGIQLEETITAKYLEYEEDV                        | 633 |
| Mmu_ | PAFALMGSGGIQLEEAITAKYLEYEEDV                        | 729 |
| Cfa_ | PAFALMGSGGIQLEEPITAKYLEYQEHM                        | 974 |
| Gga_ | PTFALMGGAAIHLMEAI PAK-----                          | 738 |
| Ola_ | -----   |     |
| Tru_ | PAFGLMGGGKIQLEEFVITAKRLLPF----                      | 772 |
| Xtr_ | PAFALMGGAAIHLMEAI PAK-----                          | 731 |

Abb. 37: Sequenzvergleich der Proteinsequenz von Trim36 zwischen den Organismen *Homo sapiens* (Hsa), *Mus musculus* (Mmu), *Rattus norvegicus* (Rno), *Canis familiaris* (Cfa), *Gallus gallus* (Gga), *Oryzias latipes* (Ola), *Takifugu rubripes* (Tru); *Xenopus tropicalis* (Xtr), grün hinterlegt: Proteinsequenz von *Xenopus tropicalis*; gelb hinterlegt: Übereinstimmungen mit der Proteinsequenz von *Xenopus tropicalis*. Blaue Schriftfarbe: RING-Domäne, Rote Schriftfarbe: B-Box-Domäne, Lila Schriftfarbe: FN III-Domäne, Pinke Schriftfarbe: SPRY-Domäne. Quelle: mit Hilfe von Clustal W, 26.01.2015

## 4.5 Syntenie- benachbarte Gene und deren Abfolge in verschiedenen Organismen

### 4.5.1 Syntenie bezüglich *trim29*

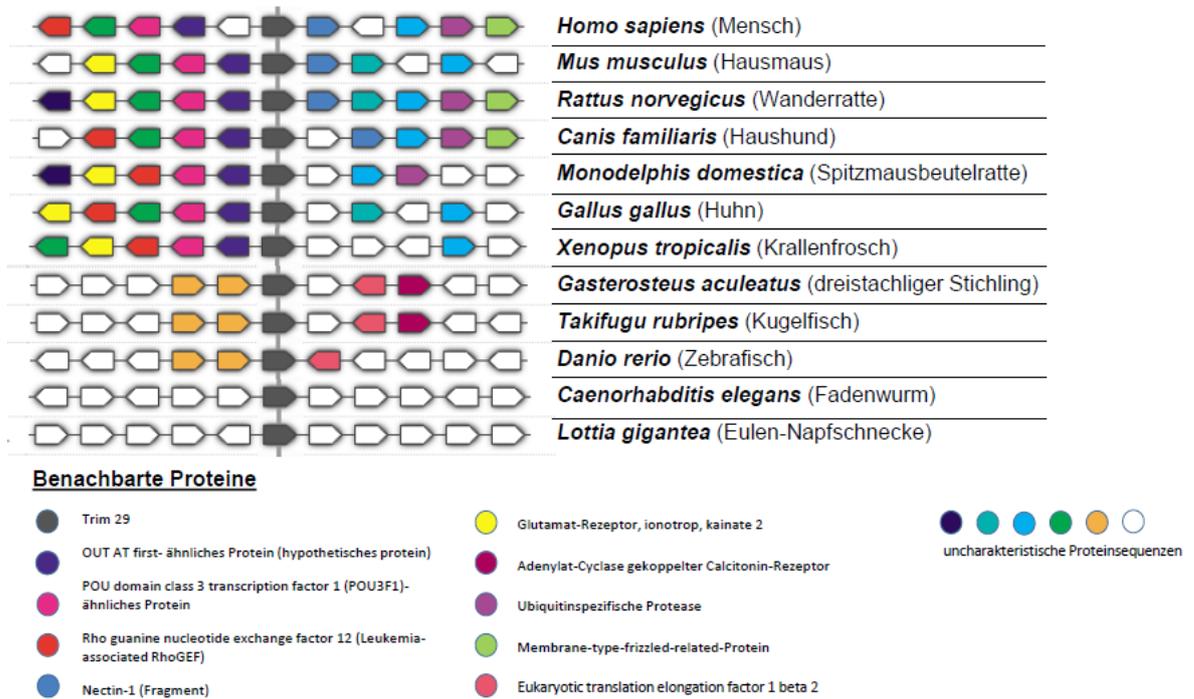


Abb. 38: benachbarte Gene von *trim29* und deren Abfolge in verschiedenen Organismen; Quelle: mit Hilfe von Metazome, 3.01.2015

Abbildung 38 zeigt Syntenie von *trim29* in verschiedenen Organismen. Anhand gleicher benachbarter Sequenzen können Rückschlüsse auf die Konservierung des Gens und seiner Umgebung im Rahmen der Evolution gezogen werden. Auffällig hierbei sind die Unterschiede zwischen Wirbeltieren und Wirbellosen sowie innerhalb der Wirbeltierklassen. Durch die Syntenie-Analyse sowie dem Sequenzabgleich zwischen den verschiedenen Organismen ergibt sich folgender phylogenetischer Baum (Abb.39).

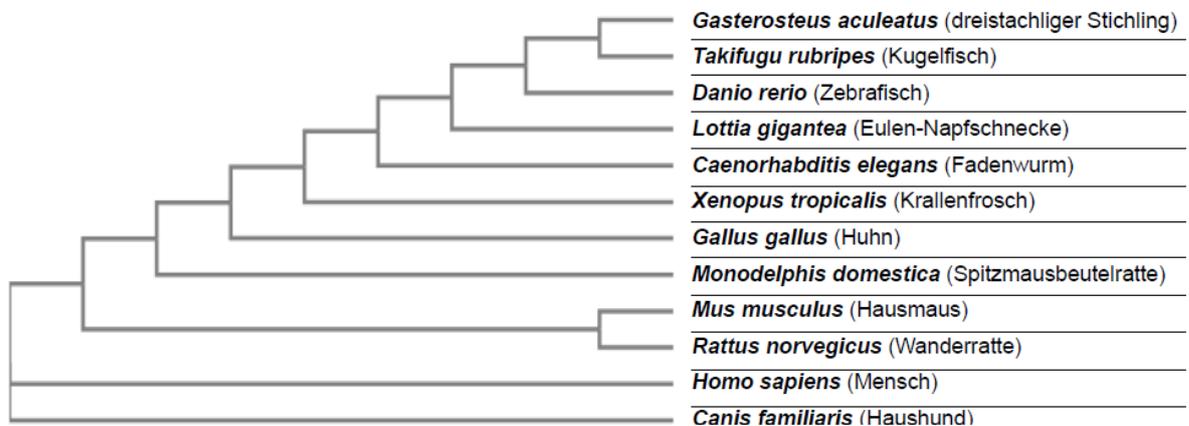


Abb. 39: phylogenetischer Baum; erstellt anhand der Proteinsequenzanalyse von Trim29. Quelle: mit Hilfe von ClustalW, 3.01.2015

#### 4.5.2 Syntenie bezüglich *trim36*

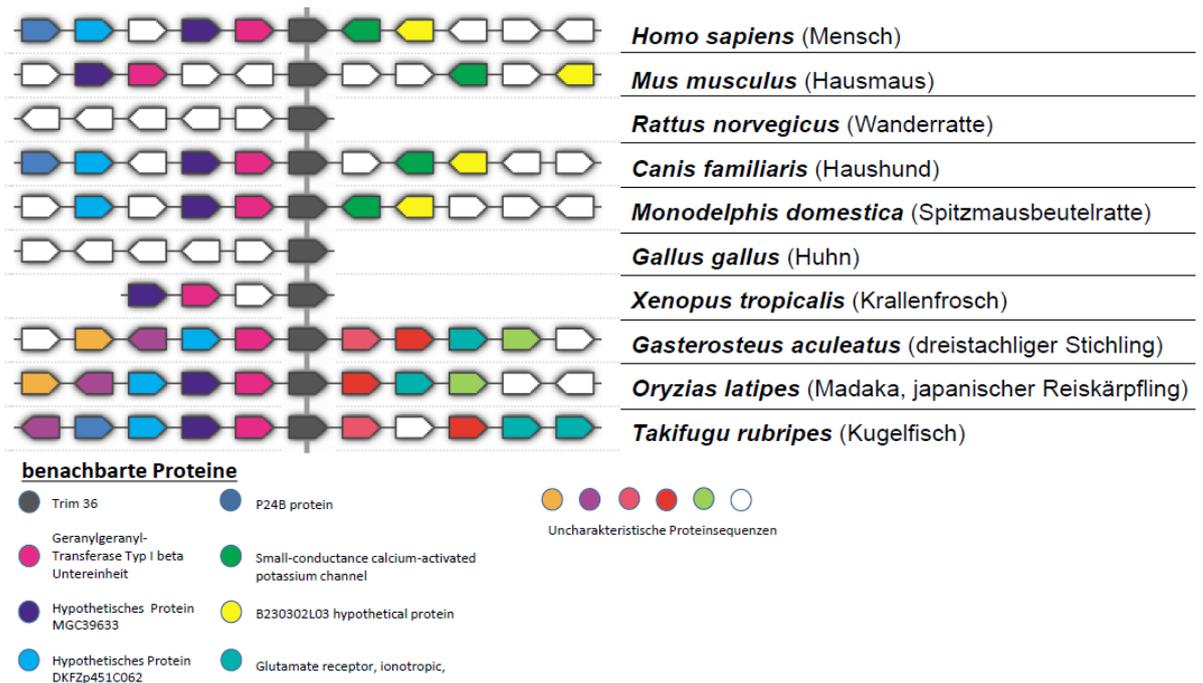


Abb. 40: benachbarte Gene von *trim36* und deren Abfolge in verschiedenen Organismen;  
Quelle: mit Hilfe von Metazome, 3.01.2015

In Abbildung 40 werden benachbarte Gene von *trim36* bei Vertretern verschiedener Wirbeltierklassen gezeigt. Hierbei fallen mehrere Gene in der Umgebung von *trim36* auf, die sich in verschiedenen Organismen ebenfalls in der Nähe von *trim36* befinden. Anhand eines Sequenzabgleiches unter den verschiedenen Organismen konnte ein phylogentischer Baum erstellt werden (Abb. 41).

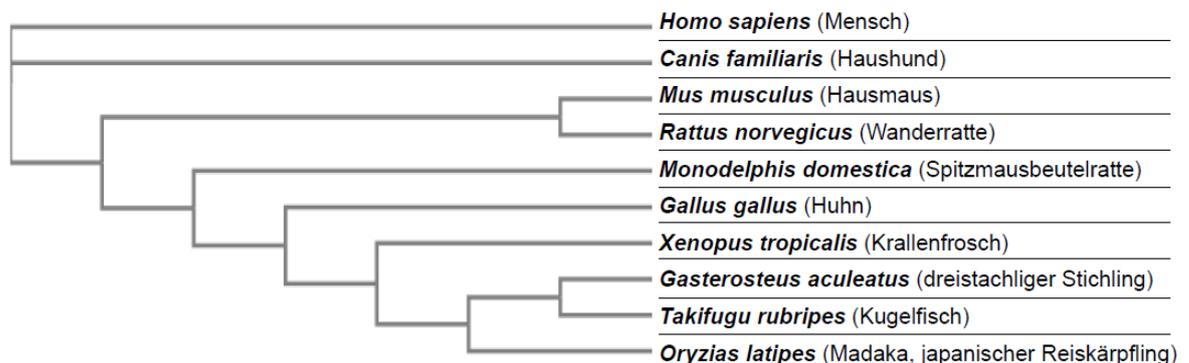


Abb. 41: phylogentischer Baum; erstellt anhand der Sequenzanalyse von Trim36  
Quelle: Metazome, 3.01.2015

## **5. Diskussion**

### **5.1 Bedeutung und Funktion der Tripartite-motif-Familie**

Den Tripartite-motif-Proteinen werden diverse Funktionen zugeschrieben. Dies ist im Zusammenhang mit ihrer gut konservierten Struktur, bestehend aus einer RING-Finger-Domäne, ein oder zwei B-Boxes und einer Coiled-Coil-Domäne, zu sehen (Meroni *et al.*, 2005). Zink-Finger-Domänen sind Bestandteil sowohl der RING-Struktur als auch der B-Box. Unter Konformationsänderung besitzen Zink-Finger-Domänen die Möglichkeit, Zielstrukturen zu binden. Daher spielen Trim-Proteine unter anderem beim Prozess der Ubiquitinierung, im Sinne einer E3-Ligase, eine bedeutende Rolle (Meroni *et al.*, 2005). Schlussfolgernd lässt sich daher auch die Funktion der Trim-Proteine im Abbau fehlgefalteter Proteine, bei der Transkriptionsregulation, bei Vorgängen der Signaltransduktion sowie in der Zellzyklusregulation diskutieren. Hier scheint die Bindungsstelle von Ubiquitin wichtig zu sein. Die Ubiquitinbindung an Lysin48 stellt eine Form der posttranslationalen Modifikation dar, die zum proteasomalen Abbau führt. Die Ubiquitinbindung an Lysin63 wird in Zusammenhang mit dem NF- $\kappa$ B-Signalweg, DNA-Reparatur und Lysosommarkierung gebracht (Napolitano und Meroni, 2012).

Des Weiteren werden den Proteinen der Trim-Familie neben Beteiligung an zellulären Prozessen, wie Proliferation, Differenzierung, Entwicklung, Krebsentstehung und Apoptose auch antivirale Fähigkeiten zugeschrieben (Nisole *et al.*, 2005). Diese diversen Funktionen sind nicht nur durch die für die Proteinfamilie charakteristischen Domänen bedingt. Nach der typischen Grundstruktur schließen sich in den meisten Fällen C-terminale Domänen an. Zu den häufigsten zählen B30.2, SPRY, PRY und FN3 (Boudinot *et al.*, 2011). Den Domänen werden verschiedene Fähigkeiten wie immunglobulinähnliche Faltung, Transkriptionskontrolle durch Chromatinbindung oder mRNA-Bindung zugeschrieben (Tocchini und Ciosk, 2015).

Weiterhin werden für einige Trim-Proteine Funktionen innerhalb des Immunsystems beschrieben. Eine antivirale Funktion wird von Nisole *et al.* erläutert. Dabei wird in zwei Gruppen von TRIM-Proteinen unterschieden. Einerseits existieren TRIM-Proteine, deren Expression durch Interferone induziert wird. Diese blockieren hauptsächlich zu späten Zeitpunkten der viralen Replikation die Amplifikation viraler RNA bzw. DNA. Andererseits greife die zweite Gruppe antiviraler TRIM-Proteine bereits in frühen Schritten der viralen Replikation in den Replikationszyklus ein (Nisole *et al.*, 2005). Neben Trim-Proteinen, die durch Interferon I oder II hochreguliert werden, existieren Trim-Proteine, die u.a. Zytokine als Baustein des Immunsystems induzieren (Rajsbaum *et al.*, 2013).

Ebenfalls können Trim-Proteine die Autophagozytose regulieren. Eine Steuerung der Autophagozytose kann durch Interaktion zwischen Trim-Proteinen und verschiedenen Autophagiefaktoren erfolgen (Mandell *et al.*, 2014). Trim-Proteinen wird dabei auch eine

Rezeptorfunktion zugeschrieben. Trim5 $\alpha$  besitzt die Fähigkeit, durch seine C-terminale SPRY-Domäne direkt an virales Kapsid binden, was eine selektive Autophagie vermittelt (Mandell et al., 2014).

Zusammenfassend spielen die Mitglieder der Tripartite-motif-Familie eine bedeutende Rolle in Regulations- und Differenzierungsprozessen der Zelle sowie in der angeborenen Immunabwehr.

### 5.2 Expression von *trim29*

In der whole mount in situ Hybridisierung, wie auch in der RT-PCR, zeigte sich eine Expression ab NF-Stadium 12 (Abb. 12). In den früheren Entwicklungsstadien scheint Trim29 somit keine Rolle zu spielen. Im NF-St. 12 lassen sich die drei Keimblätter, Ekto-, Meso- und Entoderm, unterscheiden. Daher lässt sich erkennen, dass sich die Expression im Zeitraum des Gastrulationsprozesses auf das ektodermale Gewebe beschränkt (Abb. 12). In der weiteren Embryogenese wurde nun betrachtet, ob *trim29* in allen ektodermalen Keimblattderivaten exprimiert wird. Aus dem Ektoderm entwickeln sich Haut, Nervensystem und die Sinnesorgane. Bereits zum Zeitpunkt der Neurulation wird jedoch deutlich, dass kaum Färbung von *trim29*-Transkripten im neuroektodermalen Bereich sichtbar ist. Die Neuralrinne zeigt sich in der WISH komplett ohne Signal. Im Bereich der Neuralfalten lässt sich eine minimale Expression erkennen (Abb. 13). Jedoch wird *trim29* ausgeprägt in der embryonalen Haut exprimiert. In wie weit sich die Expression auf die Haut des Embryos beschränkt, zeigt die Betrachtung der Embryonen und deren Schnittbilder. Deutlich wird auch hier eine Färbung, die sich auf das Oberflächenektoderm beschränkt. Genauer wird *trim29* während der Gastrulation (Abb. 12) nur in der apikalen Schicht des Ektoderms exprimiert. Während der Neurulation (Abb. 14) zeigt sich eine Expression in beiden Schichten des Oberflächenektoderms. In Anteilen des Nervensystems, wie Rückenmark oder cerebralen Strukturen, konnte keine Expression nachgewiesen werden. Weitere ektodermale bzw. neuroektodermale Keimblattderivate, wie die Sinnesorgane Ohr und Vestibularorgan zeigen ebenfalls keine Färbung (Abb. 18). Die Färbung im Bereich der Augen beschränkt sich auf Hornhaut und demzufolge auf ektodermales Gewebe. Das retinale Pigmentepithel als ektodermales Derivat zeigt wiederum keine Färbung. Die neurosensorische Retina, welche neuroektodermaler Herkunft ist, lässt kein Signal erkennen (Abb. 18).

Über die Funktion von Trim29 in der embryonalen Haut lässt sich nur spekulieren, denn über Expression und Funktion dieses Gens im Modellorganismus *Xenopus laevis* ist derzeit nichts bekannt.

In Bezug auf den menschlichen Organismus zeigt sich die Datenlage hinsichtlich Expression und Funktion von *trim29* weitaus vielseitiger. Beim Mensch ist das Gen auf Chromosom 11q23 lokalisiert und wird in verschiedenen Organen exprimiert.

## Diskussion

Ein physiologisches Vorkommen des Proteins zeigt sich in humaner Plazenta sowie Lunge, Thymus, Prostata, Testis und im Colon. Nicht nachweisbar ist TRIM29 in Herz, Gehirn, Skelettmuskel, Pankreas, Milz, Eierstöcken und Dünndarm (Zhi-Yi Zhou *et al.*, 2012). Über die Expression im humanen Embryo liegen bisher keine Daten vor, sodass ein Vergleich der Expressionsorte zwischen *Xenopus* und Mensch schwierig ist.

Des Weiteren spiele TRIM29 beim Menschen eine große Rolle in der Kanzerogenese. In einer Vielzahl von Tumoren wird das Gen entweder hoch- oder runterreguliert (Zhi-Yi Zhou *et al.*, 2012).

Zum einen werde eine erhöhte Expression in Bronchialkarzinomen im Vergleich zu gesundem Lungengewebe beschrieben. Dieser Sachverhalt bezieht sich vor allem auf nichtkleinzellige Bronchialkarzinome. Außerdem wird hier auf die Interaktion zwischen TRIM29 und  $\beta$ -Catenin, was als Schlüsselmolekül für den Wnt-Signalweg fungiert, und deren Rolle in Bezug auf die Lungenkrebsentstehung hingewiesen (Zhi-Yi Zhou *et al.*, 2012).

$\beta$ -Catenin scheint in mehreren Karzinomen in Zusammenhang mit der Expression von TRIM29 zu stehen. Wenn man das Expressionsmuster von  $\beta$ -Catenin im *Xenopus* (Tran *et al.*, 2010) mit dem von *trim29* vergleicht, zeigen sich deutliche Unterschiede. Während  $\beta$ -Catenin in höheren Embryonalstadien hauptsächlich mesodermal, wahrscheinlich in Zusammenhang mit den hämatopoetischen Vorläuferzellen, exprimiert wird (Tran *et al.*, 2010), konnte in der Expressionsanalyse von *trim29* eine rein ektodermale Expression gezeigt werden. Weiterhin ist für den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg bekannt, dass er Einfluss auf die Ausbildung des Spemann-Organisators hat und damit auch Einfluss auf die Differenzierung zwischen Oberflächen- und Neuroektoderm. Inwiefern die Interaktion von Trim29 und  $\beta$ -Catenin in der Entwicklung eine Rolle spielt, lässt sich nicht voraussagen. Es müssten weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden. Einerseits könnten zunächst Studien bezüglich der Kolo-kalisation beider Proteine folgen. Andererseits könnten bei Funktionsverluststudien von Trim29 die Auswirkungen auf das Vorkommen von Wnt/ $\beta$ -Catenin untersucht werden bzw. umgekehrt könnte dargestellt werden, ob der Ausfall von Wnt/ $\beta$ -Catenin einen Einfluss auf die Expression von *trim29* aufweist.

Weiterhin wird von einer Überexpression bei Magenkarzinomen im Vergleich zum umliegenden Gewebe berichtet (Kosaka *et al.*, 2007). In dieser Studie zeigte sich eine schlechtere Prognose für Patienten mit TRIM29-Marker im Blut. Deswegen lässt sich über TRIM29 als Tumormarker bzw. Metastasenmarker bei Magenkarzinom diskutieren (Kosaka *et al.*, 2007). Untersuchungen zum Vorkommen von Trim29 in adultem *Xenopus*-Gewebe wären daher denkbar, um zu Organe oder Organsysteme mit Trim29 zu detektieren und Vergleiche zum menschlichen Organismus anzustellen.

Hinsichtlich des beim Mammakarzinom beschriebenen Zusammenhanges zwischen Polaritätsverlust der Zellen und TRIM29-Konzentration wäre eine Untersuchung des Einflusses

## Diskussion

von Trim29 auf die Polarität von Zellen im *Xenopus*-Organismus denkbar. Gerade in der Haut, wo *trim29* im Modellorganismus exprimiert wird, spielt die Zellpolarität eine große Rolle. Zunächst müsste analysiert werden, in welcher der drei Zelltypen der *Xenopus*-Haut (mucus-sezierende Zellen, multiziliäre, mitochondrienreiche Zellen) *trim29* wirklich exprimiert wird. Derzeit ist in den Schnittbildern (Abb. 12 und Abb. 14) nur zu erkennen, dass während der Gastrulation *trim29* in der apikalen Schicht des Ektoderms und während der Neurulation im gesamten Oberflächenektoderm exprimiert wird. In Funktionsverluststudien kann dann nach eventuellen Fehlbildungen der Haut gefahndet werden. Von Interesse wären weiterhin Experimente zur eventuellen Kolo-kalisation von Trim29 und Rab11, der GTPase, die in Zusammenhang mit Vesikeltransport zur apikalen Zelloberfläche in der Haut des *Xenopus* stünde (Kyeongmi *et al.*, 2012). Auswirkungen bei Überexpression und Funktionsverlust von Trim29 auf Rab11 bieten weitere Untersuchungsmöglichkeiten. Nach Sokol (2015) scheint der Wnt-Signalweg für die Ausbildung der Zellpolarität ausschlaggebend zu sein. Wie bereits erwähnt, sollten auch die Zusammenhänge zwischen Trim29 und dem Wnt-Signalweg genauer betrachtet werden.

Da *trim29* vor allem im ektodermalen Gewebe des Embryos exprimiert wird, wären Studien in Zusammenhang zwischen BMP und Trim29 anzustellen. BMP, als wichtiger Faktor bei der Differenzierung zwischen Oberflächenektoderm und Neuroektoderm (Bier und De Roberts, 2015) könnte mit Trim29 assoziiert sein.

In der Studie von Sho *et al.* wird außerdem die Bindung von TRIM29 an TIP60 (*Xenopus* Homolog Kat5), einer zellulären Acyltransferase, beschrieben. Eine Überexpression des Gens führe zu einem Abbau von TIP60. Dies resultiere in einer verminderten Acetylierung von p53, einem Tumorsuppressorgen, und damit in einem erhöhten Zellwachstum und einer, beispielsweise unter Einfluss von UV-Strahlung, vermehrten Transformationssensitivität der Zelle (Sho *et al.*, 2011). Vielleicht spielen ähnliche Signalwege bei Mamma- und Bronchialkarzinomen, wie oben beschrieben, eine Rolle.

Ein weiterer Zusammenhang zwischen Trim29 und Tip60 wurde von Masuda *et al.* 2015 beschrieben. Trim29 spiele eine Rolle bei der DNA-Reparatur. Eine Komplexbildung zwischen Proteinen des DNA-Reparaturkomplexes aus BASC, Cohesion, DNA-PKC und Tip60 würde durch Trim29 vermittelt werden (Masuda *et al.*, 2015).

Sho *et al.* beschreiben weiterhin bezüglich der besonderen Struktur von TRIM29, als Tripartitemotif-Protein ohne RING-Domäne, die theoretische Möglichkeit einer Ausbildung von Dimeren zusammen mit anderen TRIM-Proteinen. Dies könne die Stabilität von TRIM29 verbessern und so die Ubiquitinierung durch Nutzung einer „fremden“ RING-Domäne ermöglichen. Hierhingehend wäre die Untersuchung von Kolo-kalisationen zwischen TRIM29 und anderen TRIM-Proteinen zu erwägen.

Allgemein wird den Trim-Proteinen eine Rolle bei der viralen Abwehr zugesprochen. Gerade die Haut, als Hülle eines Organismus ist an der Abwehr verschiedener Erreger beteiligt. In wiefern Trim29 die virale Abwehr im *Xenopus*-Organismus beeinflussen kann, ist noch unklar. Zusammenfassend lässt sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Expression im *Xenopus*-Embryo und im adulten menschlichen Organismus feststellen. Aufgrund der Limitierung der Untersuchungen auf die frühe Embryonalentwicklung lassen sich keine konkreten Rückschlüsse auf den adulten *Xenopus*-Organismus ziehen. Darüber hinaus muss die Funktion des *Xenopus*-Trim29 nicht mit der der humanen übereinstimmen, denn wenn die Proteinsequenzen in verschiedenen Organismen verglichen werden (Abb. 36), treten doch deutliche Unterschiede auf. Die Korrelation zwischen *Xenopus* und Mensch beträgt 48%. Auffällig ist, dass die charakteristische B-Box-Domäne gut konserviert ist und die Sequenzen dort eine deutlich höhere Korrelation aufweisen. Im Laufe der Evolution können durch die deutlichen Sequenzunterschiede jedoch Funktionsänderungen aufgetreten sein. Um diesen Punkt genauer zu untersuchen, könnte man z.B. eine RT-PCR von *trim29* mit verschiedenen *Xenopus*-Gewebe adulter Organismen durchführen. Außerdem wären Untersuchungen zur Expression des Gens in Mäuseembryonen mittels WMISH möglich. Ein Vergleich könnte dann angestellt werden.

### 5.3 Expression von *trim36*

In der whole Mount in situ Hybridisierung zeigt sich sowohl zeitlich als auch lokal eine unterschiedliche Expression. Die Ergebnisse hinsichtlich der zeitlichen Expression korrelieren mit der RT-PCR.

In den frühen Entwicklungsstadien nach *Nieuwkoop* und *Faber* lässt sich eine Expression im vegetativen Pol des Embryos nachweisen. Auffällig ist hierbei die vegetative Färbung bereits in der befruchteten Eizelle (Abb. 21). Diese maternale Expression zeigt, dass man *trim36* bereits vor der ersten Furchungsteilung eine Funktion zuschreiben kann. Den Nachweis für die vegetative Expression von *trim36* erbrachten bereits Cuykendall und Houston. Sie nutzen hierfür die RT-PCR. Zur Gewinnung von RNA wurden vorher die vegetativen Anteile manuell reseziert und es konnte ein relativ erhöhter Anteil an *trim36*-RNA im vegetativen Pol im Verhältnis zum animalen Pol nachgewiesen werden (Cuykendall *et al.*, 2009).

Hinsichtlich der Funktion übernahm Trim36 in der frühen Embryonalentwicklung die Anordnung der Mikrotubuli. Trim36-depletierte Embryonen verlieren eine organisierte Mikrotubuli-Struktur. Dies resultiert aus dem Fehlen der Ubiquitin-E3-Ligase-Aktivität von Trim36 (Cuykendall *et al.*, 2009).

Dieser Zusammenhang wurde von Mei *et al.* 2013 erneut untersucht. Es zeigte sich eine Kolo-kalisation von Trim36 und Dnd1. Trim36 wäre hier Regulator der Mikrotubuliformation

## Diskussion

und des mikrotubuliassoziierten Transportsystems. Dnd1 wäre essentiell zur vegetativen Verteilung von Trim36 im Embryo (Mei *et al.*, 2013).

Bis NF-St. 12 nimmt die Expression stetig ab (Abb. 21 bis 25), was auf einen Abbau von Trim36 hinweist. Nachdem der Embryo seine eigene Transkription (zygotische Genexpression) ausführt, wird auch wieder *trim36* exprimiert (NF-St. 15; Abb. 26).

Des Weiteren tritt *trim36* vor allem beim Neurulationsprozess in den Vordergrund. In diesem Entwicklungsabschnitt wird eine Expression von *trim36* im Bereich der Neuralplatte sichtbar, wie auch bei Yoshigai *et al.* beschrieben (Abb. 27 und 28). Verfolgt man die Embryonalentwicklung weiter, fallen in der WMISH eine Expression von *trim36* in der neurosensorischen Retina, im Mes- und Rhombencephalon, im Neuralrohr sowie in den kaudal gelegenen Somiten auf (Abb. 29 bis 32).

Diese Ergebnisse werden unterstützt durch Ergebnisse aus Funktionsverluststudien. Die Unterdrückung der Translation durch Antisense-Oligonukleotide gegen *trim36* resultierte in einer verminderten Körperlänge und Abnormalitäten im Bereich der Somiten (Yoshigai *et al.*, 2009). Depletiert man bereits die maternale *trim36*-RNA mittels Morpholino, werden im Laufe der weiteren Entwicklung dysmorphe Strukturen in der dorsalen Körperachse deutlich. Die Embryonen entwickelten sich bis zu Gastrulation regelrecht. Danach wären sie entweder unfähig eine Neuralplatte zu bilden oder die Entwicklung führe zur Zystenbildung am dorsalen Embryo (Cuykendall *et al.*, 2009). Im Detail zeigte sich bei Yoshigai *et al.* eine Störung der Anordnung und Organisation der Somitenzellen. Dies äußerte sich in einer abnormen Zellform und Defekten in der Zelladhäsion. Trim36 wird daher eine Funktion bei der Differenzierung von Somiten aus mesodermalem Gewebe zugeschrieben (Yoshigai *et al.*, 2009).

Des Weiteren wurde in Funktionsverluststudien eine verminderte Alpha-Aktin-Konzentration bei *Xenopus*-Embryonen festgestellt (Yoshigai *et al.*, 2009). Da Alpha-Aktin zentraler Bestandteil der Skelettmuskulatur ist, können hier Veränderungen bezüglich der Muskelausprägung bzw. der Funktionalität der Skelettmuskulatur vermutet werden.

Darüber hinaus schließen die Autoren Yoshigai *et al.* auf eine Schlüsselfunktion von Trim36 in der Modulation der Proteine Thylacine1, Delta2 und Papc. Jene Proteine werden ebenfalls im Bereich der Somiten exprimiert (Takashi *et al.*, 2006). Es zeigte sich jedoch, dass Thylacine1, Delta2 und Papc nicht durch den Trim36-Funktionsverlust vermindert waren. Sie würden zwar eine Rolle im Segmentationsprozess spielen, jedoch keinen Bezug zur Zellanordnung und Differenzierung der Somiten aufweisen.

Cuykendall und Houston betrachteten den Einfluss von Trim36 auf den Wnt/beta-Catenin-Signalweg. Hier kristallisierte sich aber kein klarer Zusammenhang heraus. Des Weiteren wurde ein früher Marker für Somitenentwicklung, Myod, in den Focus gerückt (Cuykendall und Houston, 2009). Myod spielt eine große Rolle bei der Differenzierung von Muskulatur. Es zeigte sich ebenfalls eine Verminderung des Proteins bei Unterdrückung der Translation von

## Diskussion

*trim36* in *Xenopus*-Embryonen, was die Störung der Somitenentwicklung bei Trim36-Depletierung bestärkt.

Anhand der Proteine Myod und Alpha-Aktin lässt sich ein Vorkommen von Trim36 in der Muskulatur vermuten. Hier könnten RT-PCR auf adultem *Xenopus*-Gewebe, insb. Muskelgewebe, durchgeführt werden.

Da *trim36* eine Rolle beim Neurulationsprozess zu spielen scheint, wäre interessant, ob ein Zusammenhang zwischen BMP, einem wichtigen Faktor zu Differenzierung zwischen Oberflächen- und Neuroektoderm, und Trim36 besteht (Bier und De Roberts, 2015).

*Trim36* wird außerdem in der späten Spermatogenese exprimiert. Hier wurde *Trim36* eine weitere Aufgabe zugeschrieben, die sich auf die Akrosomenreaktion bezieht (Kitamura *et al.*, 2005). Dieser Zusammenhang wurde im Maus-Organismus bzw. dessen Sperma nachgewiesen. Hier konnte eine Expression von *Trim36* im reifen Sperma bzw. reifen Spermatiden nachgewiesen werden. Nach der Akrosomenreaktion war keine Expression mehr vorhanden. Mit Antikörpern, welche spezifisch am N-terminalen Ende von TRIM36 binden, konnten Kitamura *et al.* die Akrosomenreaktion verhindern. Über die Antikörper konnte spezifisch die RING-Domäne des Proteins blockiert werden. Antikörper, welche im Bereich des C-terminalen Endes binden, konnten die Akrosomenreaktion nicht blockieren, sodass vor allem die RING-Domäne von Bedeutung für die Akrosomenreaktion zu sein scheint (Kitamura *et al.*, 2005).

Die Expressionsanalysen in den frühen Stadien von *Xenopus laevis* aus dieser Arbeit stimmen mit den Ergebnissen aus den Arbeiten von Yoshigai *et al.* sowie Cuykendall *et al.* überein.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit das Auftreten von Trim36 in cerebralen Strukturen und im Auge betrachtet. Insbesondere konnte die Expression in einzelnen Hirnabschnitten, wie Rhomb- und Mesencephalon, nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lassen sich Aussagen über den Phänotyp des *Xenopus*-Embryos sowie Funktionsausfall bei Trim36-Funktionsverlust treffen, jedoch existieren noch keine Ergebnisse über einen definitiven Zusammenhang zwischen Trim36 und einem Signaltransduktionsweg. Zu untersuchen wären für das Nervengewebe spezifische Marker. Eine Möglichkeit wäre hierbei den Zusammenhang zwischen neuronenspezifischen Klasse III beta-Tubulin und *trim36* näher zu beleuchten.

## 5.4 Korrelation zwischen Ergebnissen der *in situ* Hybridisierung und der RT-PCR

### 5.4.1 Korrelation bezüglich *trim29*

Betrachtet man beide Verfahren zum Nachweis eines spezifischen Transkriptes, so stellt man fest, dass sowohl in der WMISH als auch in der RT-PCR eine Expression von *trim29* erst ab *NF*-Stadium 12, also während der Gastrulation, feststellbar ist. In den Stadien 0, 3, 6 und 9 zeigt sich in der *in situ* Hybridisierung (Abb. 8 bis 11) kein Signal und in der Gelelektrophorese nach

RT-PCR (Abb. 32) ebenfalls keine Bande. Auffällig ist die Bandenstärke in den Stadien 12, 15, 18 und 21 (Abb. 34) im Vergleich zu den darauffolgenden betrachteten Entwicklungszeitpunkten. Aufgrund der semiquantitativen PCR kann man daher auf eine stärkere Expression von *trim29* in den genannten Stadien im Vergleich zu den späteren Stadien schließen. In gewissem Maß spiegelt sich die starke Amplifikation des Transkriptes in der RT-PCR auch in der in situ Hybridisierung wieder, denn vor allen in den Stadien 12, 15, 18 und 21 (Abb. 12 bis 15) ist das Signal in der in situ Hybridisierung besonders stark. Die RT-PCR zeigt weiterhin in den NF-Stadien 24, 27, 30, 33 und 36 (Abb. 33) eine etwa gleich intensive Bande, die jedoch schwächer erscheint als zu früheren Entwicklungszeitpunkten. *Trim29* scheint daher in diesen Stadien weniger exprimiert zu sein. Im Hinblick darauf stellt sich in der WMISH, wenn überhaupt, nur eine leicht verminderte Signalintensität in den Stadien 24, 27, 30, 33 und 36 (Abb. 16 bis 20) im Vergleich zu den NF-Stadien 12, 15, 18 und 21 (Abb. 11 bis 14) dar. Insgesamt zeigt sich in Stadien mit einer Signalanreicherung in der in situ Hybridisierung ebenfalls eine Bande in der Gelelektrophorese nach RT-PCR. Bezüglich der stärkeren Expression in der RT-PCR in den Stadien 12 bis 21 kann vermutet werden, dass *trim29* bei oben gezeigter dermalen Expression eine wichtige Rolle während der Gastrulation bei der Ausbildung einer Hülle um den Embryo spielen könnte. Des Weiteren wäre es möglich, dass *trim29* während der Neurulation bei Ausbildung des Neuralrohres eine wichtige Funktion übernimmt, denn hier ist dorsales Annähern der ektodermalen Zellen zum Schluss des Neuralrohres notwendig. Danach ist der Embryo vollständig von einer Hülle umschlossen. Die Expression von *trim29* ist im Verhältnis weniger stark. Eine mögliche Ursache für die verminderte Expression wäre hier, dass die Hülle des Embryos zwar weiter mit wächst, also Zellteilung passieren muss, jedoch weniger ein Migrationsprozess der ektodermalen Zellen stattfinden muss.

### 5.4.2 Korrelation bezüglich *trim36*

Zur Korrelation zwischen den Ergebnissen in der WMISH und der RT-PCR in Bezug auf *trim36* lässt sich zunächst feststellen, dass zu jedem betrachteten Entwicklungszeitpunkt ein Signal in der WMISH auch mit einer Bande in der Gelelektrophorese nach RT-PCR (Abb. 35) einhergeht.

In den frühen Stadien der *Xenopus*-Embryogenese (NF-Stadium 0, 3, 6 und 9) konnte eine Signalanreicherung im vegetativen Pol der Embryonen gezeigt werden (Abb. 21 bis 24). Analog dazu stellt sich auch nach der RT-PCR zu diesen Zeitpunkten eine Bande mit vergleichsweise hoher Intensität in Bezug auf andere Entwicklungsstadien. Auffällig zeigt sich Stadium 12 (Abb. 25) in der in situ Hybridisierung. Hier ist nur eine minimale Expression im noch äußerlich sichtbaren vegetativen Anteil des Embryos erkennbar. Die Bande in der Gelelektrophorese ist ebenfalls schwächer als in den NF-Stadien zuvor (Abb. 35). Nach Beginn der zygotischen Genexpression (NF-St. 15 bis 36) ist es in schwierig, in der in situ Hybridisierung über

verschiedene Intensitätsstärken zu urteilen (Abb. 25 bis 31). Dies liegt vor allem an der ausgeprägt lokal begrenzten Expression in neuralen Geweben. In der RT-PCR zeigen sich jedoch unterschiedliche Bandenstärken. In den NF-Stadien 15, 18 und 21 zeigt sich mehr amplifiziertes Transkript als in den Stadien 24, 27, 30, 33 und 36.

Die hier beschriebene, quantitativ unterschiedliche Expression ließe sich durch ein unterschiedliches Expressionsausmaß während verschiedener Entwicklungsphasen des *Xenopus* erklären. Eine stärkere Expression in NF-Stadium 15 bis 21 lässt eine essentielle Rolle von Trim36 während der Neurulation vermuten. Während der Organogenese wird *trim36* weniger stark exprimiert. Nachdem alle Organe angelegt wurden und ein Größenwachstum dieser folgt, wird *trim36* verhältnismäßig mehr exprimiert, was mit der Größenzunahme der neuralen bzw. cerebralen Strukturen zusammenhängen könnte.

## 5.5 Homologie und Struktur der Proteine in verschiedenen Organismen

### 5.5.1 Homologie und Struktur bezüglich Trim29

Hinsichtlich der Struktur von Trim29 zeigt sich eine Besonderheit. Die eingangs geschilderte Grundstruktur der Tripartite-motif-Familie, ist hier nicht ersichtlich (siehe Abb. 36). Es existieren Theorien, dass bei fehlender RING-Domäne eine Dimerbildung mit anderen TRIM-Proteinen statt findet um somit die Funktion aufrecht zu erhalten (Sho *et al.*, 2011). Hierbei spielen die Coiled-coil-Domänen eine wichtige Rolle. Unter anderem sind sie ein wichtiges Element im Rahmen der Homo-, Heterodimerbildung (Horie-Inoue, 2013) bzw. Multimerbildung (Van der Aa *et al.*, 2009). Durch Interaktion mit anderen Trim-Proteinen, könnte beispielsweise eine Ring-Domäne hinzugewonnen werden.

Obwohl Trim29 nicht in allen Organismen die für die Familie typischen Domänen aufweist, wird das Gen zur Familie der Tripartite-motif-Familie gezählt.

Die B-Box, als wichtige Domäne hinsichtlich der Funktion, Zielstrukturen zu binden, findet sich in verschiedenen Organismen (siehe Abb. 36). Vergleicht man die Sequenz dieser Domänen und die Länge der Proteinabschnitte zeigt sich Domäne als gut konserviert. Betrachtet man die gesamte Proteinsequenz, hat sich diese in den verschiedenen Organismen stark verändert (48% Übereinstimmung zwischen *Xenopus laevis* und Mensch). Hiermit ließe sich auch ein möglicher Funktionswandel des Proteins erklären. Während der Embryonalphase des *Xenopus laevis* zeigte sich eine Expression nur in der Haut des Embryos. Über detaillierte Funktionen ist hier noch nichts bekannt. Da weder embryonale Untersuchungen aus anderen Organismen bzw. Untersuchungen mit adultem *Xenopus*-Material vorliegen, kann eine vergleichbare Funktion nicht ausgeschlossen werden. Falls allerdings Unterschiede auftreten sollten, lassen sich diese auf die zu 52 Prozent veränderte Proteinsequenz zurückführen.

### 5.5.2 Homologie und Struktur bezüglich Trim36

Im Vergleich zur Trim29-Homologie zeigt der Vergleich der Trim36-Äquivalente eine größere Übereinstimmung. Ebenfalls ist hier die charakteristische Grundstruktur der Trim-Proteine erhalten (Abb. 37). Zusätzlich besitzt Trim36 zwei weitere charakteristische Domänen, FNIII und SPRY. Innerhalb aller Domänen zeigt sich eine hohe Übereinstimmung innerhalb der Sequenzen. Die Domänen sind daher gut konserviert. Insgesamt stimmt die Proteinsequenz von Mensch und *Xenopus* zu 64 Prozent überein. Daher können deutliche Funktionsunterschiede zwischen den Organismen auftreten.

### 5.6 Syntenie- benachbarte Gene und deren Abfolge in verschiedenen Organismen

#### 5.6.1 Syntenie bezüglich *trim29*

Wie in Abbildung 38 ersichtlich, zeigen sich Unterschiede zwischen Wirbeltieren und Wirbellosen sowie innerhalb der Wirbeltierklassen. Während bei Fadenwurm und Eulen-Napfschnecke, als Vertreter der Wirbellosen, keine gleichen benachbarten Gensequenzen zu finden sind, zeigen sich bei den Vertretern der Fische drei benachbarte, sich wiederholende Sequenzen. Diese differieren jedoch deutlich zu den benachbarten Sequenzen in den Wirbeltierklassen der Säugetiere, Vögel und Amphibien. Hierbei zeigen sich zwei Sequenzen für die Proteine „Out at first- ähnliches Protein“ und „POU3F1-ähnliches Protein“ als benachbarte Gensequenzen von *trim29* bei den oben aufgeführten Säugetieren, Vögeln und Amphibien. Die Analyse der benachbarten Gene bzw. deren Abfolge dient dazu, Rückschlüsse auf die Konservierung des jeweiligen DNA-Abschnittes zu gewinnen. Es zeigt sich also, dass bei Säugetieren, Vögeln und Amphibien auch die umgebenden Gene gleich sind.

#### 5.6.2 Syntenie bezüglich *trim36*

In Abbildung 40 werden benachbarte Gene von *trim36* bei Vertretern verschiedener Wirbeltierklassen gezeigt. Hierbei fällt auf, dass eine benachbarte Gensequenz, die für Geranylgeranyl-Transferase codiert, bei Fischen und Amphibien und zum Teil bei Säugetieren (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Canis familiaris* und *Monodelphis domestica*) vorkommt. Beim Haushuhn, als Vertreter der Vögel, ist die Sequenz nicht in der Nähe von *trim36* auffindbar. Ähnlich verhält es sich für zwei weitere Proteine „MGC39633“ und „DKFZp451C062“. Gleiche benachbarte Gene sind ein Indiz für eine gut konservierte Struktur von *trim36* und seiner Umgebung.

### 5.7 Besonderheiten und Schwierigkeiten in der Versuchsdurchführung

Um Aussagen über die Expression der beiden Gene *trim29* und *trim36* treffen zu können, müssen zunächst Embryonen generiert werden. Hierzu wurden die *Xenopus*-Weibchen durch Injektion von  $\beta$ -HCG zur Eiablage stimuliert. Von besonderer Wichtigkeit zeigte sich dabei die korrekte Injektion in den dorsalen Lymphsack. Bei falscher Applikation konnten die Froschweibchen nur unzureichend zur Eiablage angeregt werden. Unterschiede ließen sich innerhalb der verschiedenen Weibchen in Bezug auf Qualität und Quantität der Eizellen feststellen, was später bei der Befruchtung bzw. Embryonenaufzucht Schwierigkeiten bereitete. Im Rahmen der RT-PCR, als Methode zum Nachweis einer Genaktivität, traten einige Arbeitsschritte in den Vordergrund, welche sich als wichtig in Bezug auf die spätere Auswertung der Ergebnisse zeigten. Die RT-PCR sollte einen semiquantitativen Charakter aufweisen. Bevor RNA für die Herstellung von cDNA eingesetzt werden konnten, wurden die einzelnen RNA-Proben der verschiedenen Entwicklungsstadien alle auf eine gleiche Konzentration eingestellt und die Verdünnung mittels Extinktionsmessung sowie einer Gelelektrophorese kontrolliert. Ebenfalls wurden nach der cDNA-Herstellung in einer Gelelektrophorese die Bandenstärken der einzelnen Stadien anhand von ODC I miteinander abgeglichen. Daher war es möglich in der Auswertung der eigentlichen PCR eine Aussage über eine relativ erhöhte bzw. verminderte Expression der Gene im Vergleich zu anderen Entwicklungsstufen zu treffen.

Ein weiterer wichtiger Punkt hinsichtlich der PCR-Qualität stellt die Verwendung selbst designter Primer da. Um eine zufällige Amplifikation genomischer DNA in der PCR auszuschließen, werden die Primersequenzen so gewählt, dass sie auf zwei verschiedenen Exonbereichen liegen. Zwischen den gewählten Exonbereichen sollte ein möglichst großer Intronbereich liegen, da die einzelnen Reaktionszeiten in der PCR zeitlich so ausgelegt sind, dass nur gespleißte mRNA bzw. daraus resultierende cDNA vervielfältigt werden kann. Desweiteren wurde das Vorhandensein genomischer DNA bereits bei der RNA-Präparation weitestgehend ausgeschlossen.

Um ein valides Ergebnis zu erhalten, wurden mehrere PCR nach diesem Schema durchgeführt. Ebenfalls wurde die Whole mount in situ Hybridisierung mehrfach durchgeführt. Einerseits spielt dies eine Rolle hinsichtlich der Ergebnisqualität. Andererseits zeigte sich die mehrfache Durchführung als notwendig um optimale Zeiten für die Behandlung mit Proteinase K herauszufinden. Jenes Enzym dient zur Permeabilisierung des Embryos um damit das Eindringen der RNA-Sonden in den Organismus zu ermöglichen. In Bezug auf die WMISH für *trim29* musste hier getestet werden, welche Behandlungszeiten genügen, um den Embryo permeabel für die Sonden zu machen, jedoch nicht die äußere Hülle bzw. die Haut des Embryos anzugreifen. Weil *trim29* ausschließlich in der Haut exprimiert wird, stellte sich der Erhalt des Integuments als besonders wichtig heraus.

## Diskussion

Während sich die Embryonen in den höheren Stadien in vivo in ihrer natürlich länglich geraden Gestalt darstellen, erfahren sie durch die verschiedenen Behandlungen eine deutliche Krümmung. Für die Herstellung von Vibratom-Stellung muss daher beachtet werden, die Schnittebenen für den Erhalt adäquater Transversalschnitte entsprechend der Krümmung anzupassen.

### **6. Zusammenfassung**

Diese Arbeit dient der Expressionsanalyse von *trim29* und *trim36*, zweier Gene, die funktionell wahrscheinlich als E3-Ligasen im Ubiquitinierungsprozess eine Rolle spielen.

Über die Aktivität von *trim29* in der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* war bisher nichts bekannt. Die Expression und Funktion des Gens wurde jedoch im menschlichen Organismus bereits betrachtet. Es konnte gezeigt werden, dass eine Expression in humaner Plazenta, Lunge, Thymus, Prostata, Testis und im Colon besteht (Zhi-Yi Zhou *et al.*, 2012). Des Weiteren wurde bereits über eine Funktion in der Kanzerogenese berichtet (Zhi-Yi Zhou *et al.*, 2012). Daher bietet sich eine genaue Expressionsanalyse im Modellorganismus *Xenopus laevis* an.

Hinsichtlich der Expression von *trim36* existierten bereits Daten. Bekannt ist eine Aktivität des Gens bereits in den frühesten Stadien der Embryonalentwicklung im vegetativen Pol der befruchteten Eizelle sowie in Blastula- und Morulastadien. Darüber hinaus wurde über eine Expression während der Neurulation und der Organogenese in neuroektodermalen Anteilen bzw. Derivaten berichtet. Die genaue organbezogene Lokalisation galt es hier herauszufinden.

Ziel dieser Analyse ist, sowohl die zeitliche als auch die anatomiebezogene Expression der beiden Gene anhand des Modellorganismus *Xenopus laevis* zu erforschen bzw. nachzuvollziehen.

Dies sollte mittels zweier verschiedener Methoden erfolgen. Einerseits wurde die semiquantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis spezifischer Transkripte und damit zum Aktivitätsnachweis der Gene genutzt. Jene Methode erfasst zwar die zeitliche Komponente, indem verschiedene Entwicklungsstadien in die Betrachtung einbezogen werden, trifft jedoch keine Aussage über die Lokalisation der mRNA im Organismus. Daher wurden andererseits Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien ebenfalls in einer whole mount in situ Hybridisierung betrachtet, bei welcher genaue Angaben zur räumlichen Verteilung getroffen werden können. Die Verwendung zweier verschiedenen Methoden diente zusätzlich der Ergebnisvalidierung.

In der Expressionsanalyse von *trim29* ergab sich eine rein auf das ektodermale Keimblatt bezogene Expression. Nachgewiesen wurde die Aktivität erstmals in NF-Stadium 12. In der weiteren Embryogenese blieb die Expression auf die Haut des Embryos beschränkt. Neuroektodermale Derivate zeigten keine Expression. In der RT-PCR konnte zusätzlich eine relativ erhöhte Expression in den Stadien 12 bis 21, also während Neurulation und Gastrulation, im Vergleich zu den Stadien der Organogenese gezeigt werden. Möglich wäre hier ein Zusammenhang zwischen der Expression von *trim29* und Migrationsprozessen des Ektoderms, einerseits bei der Einstülpung des Entoderms, andererseits beim Schluss des Neuralrohres.

## Zusammenfassung

In Bezug auf die Expression von *trim36* konnte wie in vorangegangenen Studien eine Expression in vegetativen Anteilen der befruchteten Eizelle sowie in Morula- und Blastula-Stadien gezeigt werden. Während der Neurulation und Organogenese fällt eine Aktivität des Gens in der Neuralplatte, in Mes- und Rhombencephalon, im Rückenmark, in kaudalen Somiten sowie in der neurosensorischen Retina auf. In der RT-PCR zeigten sich relative quantitative Unterschiede in der Expression. Neben der zygotischen Expression konnte ebenfalls eine stärkere Expression während der Neurulation nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu ist die Expression während der Organogenese vermindert. Nach Anlage der Organe und mit zunehmenden Größenwachstum scheint die Expression wieder zuzunehmen, sodass insgesamt der Zusammenhang zwischen der Expression von *trim36* und dem Neurulationsprozess naheliegt.

Die Ergebnisse der Expressionsanalysen im Modellorganismus *Xenopus laevis* lassen sich jedoch nicht einfach auf andere Modellorganismen bzw. gar auf den Menschen übertragen. Bereits im Vergleich der Proteinsequenzen der Gene in *Xenopus laevis*, *Mus musculus* und *Homo sapiens* lassen sich deutliche Unterschiede erkennen. Dabei bleibt aber der grundsätzliche Aufbau aus RING-Domäne, B-Box und Coiled-coil-Domäne bei *trim36* konserviert. *Trim29* bildet hinsichtlich des typischen Aufbaus eine Ausnahme.

Anhand der vorhandenen Datenlage hinsichtlich der Expression von *trim29* und *trim36* bestünde nun die Möglichkeit, in weiteren Experimenten die Funktion der Gene im Modellorganismen anhand von Funktionsverlust- oder Überexpressionsexperimenten und deren Wirkung auf gewebespezifische Proteine zu untersuchen. Hier wären Untersuchungen zum Einfluss von Trim29 auf Gastrulation und Neurulation sowie Trim36 der auf die Neurulation denkbar. Der Einfluss der beiden Gene auf bestimmte Signalwege ist noch nicht geklärt. Es existieren jedoch Vermutungen über Zusammenhänge zwischen Trim29 und dem Wnt-Signalweg sowie Trim36 und den Proteinen Alpha-Aktin und Myod. Darüber hinaus wären Untersuchungen von adultem *Xenopus*-Gewebe interessant.

**7. Literaturverzeichnis**

- Adler, R.; Canto-Soler, Valeria (2007) Molecular mechanisms of optic vesicle development: Complexities, ambiguities and controversies. *Dev. Biol.* 305: 1-13.
- Balint, Ildiko; Müller, Anke; Nagy, Anetta; Kovacs, Gyula (2004) Cloning and characterisation of the RBCC728/TRIM36 zinc-binding protein from the tumor suppressor gene region at chromosome 5q22.3. *Gene* 332: 45–50.
- Bier, Ethan; De Roberts, Edward M. (2015) BMP gradients: A paradigm for morphogen mediated developmental patterning. *Science* 348: 5838.1-5838.12.
- Boudinot, P.; van der Aa, L.M.; Jouneau, L.; Du Pasquier, L.; Pontarotti, P.; Briolat, V.; Benmansour, A.; Levraud, J.P. (2011) Origin and Evolution of TRIM Proteins: New Insights from the Complete TRIM Repertoire of Zebrafish and Pufferfish. *PLoS One* 6: 220022.
- Brandt, Y.; Mitchell T.; Wu, Y.; Hartley S. (2011) Developmental downregulation of Xenopus cyclin E is phosphorylation and nuclear import dependent and is mediated by ubiquitination. *Dev. Biol.* 355: 65-76.
- Castillo-Briceno, Patricia; Kodjabachian, Laurent (2014) Xenopus embryonic epidermis as a mucociliary cellular ecosystem to assess the effect of sex hormones in a non-reproductive context. *Front. Zool.* 11: 2-18.
- Cho, K.; Blumberg, B.; Steinbeisser, H.; De Robertis, E. (1991) Molecular Nature of Spemann's Organizer: the Role of the Xenopus Homeobox Gene goosecoid. *Cell*: 1111-1120.
- Cuykendall, T. N.; Houston, D. W. (2009) Vegetally localized Xenopus trim36 regulates cortical rotation and dorsal axis formation. *Development* 136: 3057–3065.
- Cvekl, A; Tamm, E (2004) Anterior eye development and ocular mesenchyme: new insights from mouse models and human diseases. *Bioessays* 26: 374-386.
- Doonachar, A.; Gallo, M.D.; Doukas, D.; Pasricha, R.; Lantsberg, I.; Schoenfeld, A.R. (2015) Differential effects of HIF- $\alpha$  isoforms on apoptosis in renal carcinoma cell lines. *Cancer Cell Int.* 15: 23.
- Feroze, R; Shwaky, J; von Dassow, M; Davidson, L.A. (2014) Mechanics of blastopore closure during amphibian gastrulation. *Dev. Biol.* 398: 57-67.
- Fristrup, Niels; Birkenkamp-Demtröder, Karin; Reinert, Thomas; Sanchez-Carbayo, Marta; Segersten, Ulrika; Malmström, Per-Uno et al. (2013) Multicenter validation of cyclin D1, MCM7, TRIM29, and UBE2C as prognostic protein markers in non-muscle-invasive bladder cancer. *Am. J. Pathol.* 182: 339–349.
- Fuhrmann, Sabine (2010) Eye morphogenesis and patterning of the optic vesicle. *Dev. Biol.* 93: 61–84.
- Greer, P.; Hanayama, R.; Bloodgood, B.L.; Mardinly, A.R.; Lipton, D.M.; Flavell S.W.; Kim, T.K.; Griffith, E.C.; Waldon, Z.; Maehr, R.; Ploegh, H.L.; Chowdhury, S.; Worley, P.F.; Stehler, J.; Greenberg, M.E. (2010) The Angelman Syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating arc. *Cell* 140: 704-716.
- Guihong S.; Liezhen F.; Luan W.; Yun-Bo S. (2014) Activation of Sox3 Gene by Thyroid Hormone in the Developing Adult Intestinal Stem Cell During Xenopus Metamorphosis. *Endocrinology* 155: 5024-5032.
- Harland, R. M. (1991) In situ hybridization: an improved whole-mount method for Xenopus embryos. *Methods Cell Biol.* 36: 685–695.
- Hartenstein, V. (1989) Early Neurogenesis in Xenopus: The Spatio-Temporal Pattern of Proliferation and Cell Lineages in the Embryonic Spinal Cord. *Neuron*: 399-411.
- Hatakeyama, Shigetsugu (2011) TRIM proteins and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 11: 792–804.
- Hemmati-Brivanlou, A.; Frank, D.; Bolce, M. E.; Brown, B. D.; Sive, H. L.; Harland, R. M. (1990) Localization of specific mRNAs in Xenopus embryos by whole-mount in situ hybridization. *Development* 110: 325–330.

- Hollemann T., Panitz F., Pieler T., In situ Hybridization Techniques with Xenopus Embryos (Protokoll)
- Hoppler, S; Wheeler G.N. (2015) It's about time for neural crest. *Sciencemag* 348: 1316-1317.
- Horie, K.; Urano, T.; Ikeda, K.; Inoue, S. (2003) Estrogen-responsive RING finger protein controls breast cancer growth. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 85: 101-104.
- Horie-Inue, K (2013) Trim proteins as trim tabs fort he homeostasis. *J. Biochem.* 154: 309-312.
- Horn, E.J.; Albor, A.; Liu, Y.; El-Hizawi, S.; Vanderbeek, G.E.; Babcock, M.; Bowden, G.T.; Hennings, H.; Lozano, G.; Weinberg, W.C.; Kulesz-Martin M. (2003) RING protein Trim32 associated with skin carcinogenesis has anti-apoptotic and E3-ubiquitin ligase properties. *Carcinogenesis* 25: 157-167.
- Huang, C.; Kratzer, M.; Wedlich, D.; Kashef, J. (2016) E-cadherin is required for cranial neural crest migration in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 411: 159-171.
- Jagiello, P.; Hammans, C.; Wieczorek, S.; Arning, L.; Stefanski, A.; Strehl, H.; Epplen, J.T.; Gencik, M. (2003) A novel splice site mutation in the TRIM37 gene causes mulibrey nanism in a Turkish family with phenotypic heterogeneity. *Hum. Mutat.* 21: 630-635.
- Jaurena, M.B.; Juraver-Geslin, H.; Devotta, A.; Saint-Jeannet, J. (2015) Zic1 controls placode progenitor formation non-cell autonomously by regulating retinoic acid production and transport. *Nat Commun:* 1-20.
- Kazlauskaitė A.; Mugit M.M. (2015) PINK1 and Parkin – mitochondrial interplay between phosphorylation and ubiquitylation in Parkinson's disease. *FEBS J.* 282: 215-223.
- Khokha, Mustafa K.; Chung, Christina; Bustamante, Erika L.; Gaw, Lisa W. K.; Trott, Kristin A.; Yeh, Joanna et al. (2002) Techniques and probes for the study of *Xenopus tropicalis* development. *Dev. Dyn.* 225: 499–510.
- Kim, J.; Roeder R. (2011) Nucleosomal H2B Ubiquitylation with Purified Factors. *Methods* 54: 331-338.
- Kimura, T.; Jain, A.; Won Choi, S.; Mandell, M.; Schroder, K.; Johansen, T.; Deretic, V. (2015) TRIM-mediated precision autophagy targets cytoplasmic regulators of innate immunity. *J. Cell Biol.* 210: 973-989.
- Kitamura, Kouichi; Tanaka, Hiromitsu; Nishimune, Yoshitake (2003) Haprin, a novel haploid germ cell-specific RING finger protein involved in the acrosome reaction. *J. Biol. Chem.* 278: 44417–44423.
- Koba, R.; Kokaji, C.; Fujisaki, G.; Oguma, K.; Sentsui, A (2013) Characterization of feline TRIM genes: Molecular cloning, expression in tissues, and response to type I interferon. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 153: 91-98.
- Kosaka, Yoshimasa; Inoue, Hiroshi; Ohmachi, Takahiro; Yokoe, Takeshi; Matsumoto, Toshifumi; Mimori, Koshi et al. (2007) Tripartite motif-containing 29 (TRIM29) is a novel marker for lymph node metastasis in gastric cancer. *Ann Surg Oncol.* 14: 2543-2549.
- Kyeongmi Kim; Blue B. Lake, Tomomi Haremaki, Daniel C. Weinstein, Sergei Y. Sokol (2012) Rab11 regulates planar polarity and migratory behavior of multiciliated cells in *Xenopus* embryonic epidermis. *Dev Dyn.* 24: 1385-1395.
- Liu, Jin; Welm, Bryan; Boucher, Ken M.; Ebbert, Mark T. W.; Bernard, Philip S. (2012) TRIM29 functions as a tumor suppressor in nontumorigenic breast cells and invasive ER+ breast cancer. *Am J Pathol.* 180: 839-847.
- Luehders, K.; Sasai, N; Davaapil, H.; Kurosawa-Yoshida, M.; Hiura, H.; Brah, T.; Ohnuma, S (2015) The small leucine-rich repeat secreted protein Asporin induces eyes in *Xenopus* embryos through the IGF signalling pathway. *Development:* 3351-3361.
- Mandell, A.; Jain, A.; Arko-Mensah, J.; Chauhan, S.; Kimura, T.; Dinkins, C.; Silvestri, G.; Münch, J.; Kirchhoff, F.; Simonsen, A.; Wei, Y.; Levine, B.; Johansen, T.; Deretic,

- V. (2014) TRIM proteins regulate autophagy and can target autophagic substrates by direct recognition. *Dev. Cell.*: 394-409.
- Marín, Ignacio; Schubert, Michael (2012) Origin and Diversification of TRIM Ubiquitin Ligases. *PLoS One* 7: 50030.
  - Masuda, Y., Takahashi, H.; Hatakeyama, S. (2015) TRIM29 regulates the p63-mediated pathway in cervical cancer cells. *Biochem. et Biophys. Act.* 1853: 2296–2305.
  - Masuda, Y.; Takahashi, H.; Sato, S.; Tomomori-Sato, C.; Saraf, A.; Washburn, M.; Florens, L.; Conaway, R.; Conaway, J.; Hatakeyama, S. (2015) TRIM29 regulates the assembly of DNA repair proteins into damaged chromatin. *Nat. Comm.*: 1-13.
  - Mayor, Roberto; Theveneau, Eric (2013) The neural crest. *Development* 140: 2247-2251.
  - Mei, W.; Jin, Z.; Lai, F.; Schwend, T.; Houston, D.W.; King, M.L.; Yang, J. (2013) Maternal Dead-End1 is required for vegetal cortical microtubule assembly during *Xenopus* axis specification. *Development* 140: 2334-2344.
  - Meroni, Germana; Diez-Roux, Graciana (2005) TRIM/RBCC, a novel class of ‘single protein RING finger’ E3 ubiquitin ligases. *Bioessays* 27: 1147–1157.
  - Miyagi, A.; Negishi, T.; Yamamoto, T.; Ueno, N. (2015) G protein-coupled receptors Flop1 and Flop2 inhibit Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and are essential for head formation in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 407: 131-144.
  - Miyajima, Naoto; Maruyama, Satoru; Nonomura, Katsuya; Hatakeyama, Shigetsugu (2009) TRIM36 interacts with the kinetochore protein CENP-H and delays cell cycle progression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381: 383–387.
  - Napolitano, Luisa M.; Meroni, Germana (2012) TRIM family: Pleiotropy and diversification through homomultimer and heteromultimer formation. *IUBMB Life* 64 1: 64–71.
  - Newport, J; Kirschner, M (1982) A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. Characterization and timing of cellular changes at midblastula stage. *Cell* 30: 675-686.
  - Nisole, Sébastien; Stoye, Jonathan P.; Saïb, Ali (2005) TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 799–808.
  - Olson, D.; Oh, D.; Houston, D.W. (2015) The dynamics of plus end polarization and microtubule assembly during *Xenopus* cortical rotation. *Dev. Biol.* 401: 249-263.
  - Quaderi, N.A.; Schweiger, S.; Gaudenz, K.; Franco, B.; Rugarli, E.I.; Berger, W.; Feldman, G.J.; Volta, M.; Andolfi, G.; Gilgenkrantz, S.; Marion, R.W.; Hennekam R.C.; Opitz, J.M.; Muenke, M.; Ropers, H.H.; Ballabio, A (1997) Opitz G/BBB syndrome, a defect of midline development, is due to mutations in a new RING finger gene on Xp22. *Nat Genet.* 17: 285-291.
  - Qui, F.; Xiong, J.; Deng, J.; Xiang, X. (2015) TRIM29 functions as an oncogene in gastric cancer and is regulated by miR-185. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8: 5053-5061.
  - Rajsbaum, R.; García-Sastre, A.; Versteeg, G. (2013) TRIMmunity: The Roles of the TRIM E3-Ubiquitin Ligase Family in Innate Antiviral Immunity. *J. Mol. Biol.* 426: 1265-1284.
  - Raymond, A.; Meroni, G.; Fantozzi, A.; Merla, G.; Cairo, S.; Luzi, L.; Riganelli, D.; Zanaria, E.; Messali, S.; Cainarca, S.; Guffanti, A.; Minucci, S.; Pelicci, P.G.; Ballabio, A. (2001) The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J.* 20: 2140–2151.
  - Shigetsugu Hatakeyama; Masatoshi Kitagawa; Keiko Nakayama; Michiko Shirane; Masaki Matsumoto; Kimihiko Hattori; Hideaki Higashi; Hiroyasu Nakano; Ko Okumura; Kazunori Onoé; Robert A. Good; Kei-ichi Nakayama (1999) Ubiquitin-dependent degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  is mediated by a ubiquitin ligase Skp1/Cul 1/F-box protein FWD1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 3859–386.
  - Schlosser, G (2014) The evolutionary history of vertebrate cranial placodes – I: Cell type evolution. *Dev. Biol.* 389: 98-119.

- Schroeder, T.E. (1970) Neurulation in *Xenopus laevis*. An analysis and model based upon light and electron microscopy. *J. Embryol. Exp. Morph.* 23: 427-462.
- Sho, Takuya; Tsukiyama, Tadasuke; Sato, Tomonobu; Kondo, Takeshi; Cheng, Jun; Saku, Takashi et al. (2011) TRIM29 negatively regulates p53 via inhibition of Tip60. *Biochem. et Biophys. Act.* 6: 1245-1253.
- Short, Kieran M.; Hopwood, Blair; Yi, Zou; Cox, Timothy C. (2002) MID1 and MID2 homo- and heterodimerise to tether the rapamycin-sensitive PP2A regulatory subunit, Alpha 4, to microtubules: implications for the clinical variability of X-linked Opitz GBBB syndrome and other developmental disorders. *BMC Cell Biology* 4: 3.
- Short, K.M.; Cox, T. (2006) Subclassification of the RBCC/TRIM superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding. *J. Biol. Chem.* 281: 8970-8980.
- Sive, Hazel L.; Grainger, Robert M.; Harland, Richard M. (Hg.) (2000) Early development of *Xenopus laevis*. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sive, Hazel L.; Grainger, Robert M.; Harland, Richard M. (2007) Synthesis and purification of digoxigenin-labeled RNA probes for in situ hybridization. *CSH Protoc.*: 4778.
- Sokol, Sergei Y. (2015) Spatial and temporal aspects of Wnt signaling and planar cell polarity during vertebrate embryonic development. *Elsevir in Cell & Developmental Biology* 42: 78-85.
- Tan, S.; Liu, S.; Wu, B. (2016) TRIM29 Overexpression Promotes Proliferation and Survival of Bladder Cancer Cells through NF- $\kappa$ B Signaling. *Cancer Res. Treat.*: 1-11.
- Tran, H.T.; Sekkali, B.; Van Imschoot, G.; Janssens, S.; Vleminckx K. (2010) Wnt/beta-catenin signaling is involved in the induction and maintenance of primitive hematopoiesis in the vertebrate embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*: 107.
- Tyler, Mary S. (1994) Developmental biology. A guide for experimental study. Sunderland, Mass: *Sinauer Assoc.*
- Takashi Nagano, Shoko Takehara, Maiko Takahashi, Shinichi Aizawa, Akihito Yamamoto (2006) Shisa2 promotes the maturation of somatic precursors an transition to the segmental fate in *Xenopus* embryos. *Development*: 4643-4654.
- Tocchini, C.; Ciosk, R. (2015) TRIM-NHL proteins in development and disease. *Seminars in Cell & Dev. Biol.*: 52-59.
- Van der Aa, L.M.; Levraud, J.P.; Yahmi, M.; Lauret, E.; Briolat, V.; Herbomel, P; Benmansour, A.; Boudinot, P. (2009) A large new subset of TRIM genes highly diversified by duplication and positive selection in teleost fish. *BMC Biol.* 7: 7.
- Wang, Lidong; Heidt, David G.; Lee, Cheong J.; Yang, Huibin; Logsdon, Craig D.; Zhang, Lizhi et al. (2009) Oncogenic function of ATDC in pancreatic cancer through Wnt pathway activation and beta-catenin stabilization. *Cancer Cell* 15: 20-219.
- Wanzhou, Hu; Haamedi, Nasrin; Lee, Jaehoon; Kinoshita, Tsutomu; Ohnuma, Shin-ichi (2013) The structure and development of *Xenopus laevis* cornea. *Exp. Eye Research* 116: 109-128.
- Wilson, S.; Edlund, T. (2001) Neural induction: toward a unifying Mechanism. *Nat. neurosci. Suppl.* 4: 1161-1168.
- Wolpert, Lewis (2007) Principles of development. Das Original mit Übersetzungshilfen. 3. Aufl. Berlin: Spektrum Akad.-Verl.
- Yang, W-L; Zhang, X.; Lin, H-K (2010) Emerging role of Lys-63 ubiquitination in protein kinase and phosphatase activation and cancer development. *Oncogene* 29: 4493-4503.
- Xu, R.; Hu, J.; Zhang, T.; Jiang, C.; Wang, H. (2016) TRIM29 overexpression is associated with poor prognosis and promotes tumor progression by activating wnt/ $\beta$ -catenin pathway in cervical cancer. *Oncotarget* 7: 28579-28591.
- Yang, H.; Palmbo, P.L.; Wang, L; Kim, E.; Ney, G.; Liu, C.; Prasad, J.; Misek, D.; Yu, X.; Ljungman, M.; Simeone, D. (2015) ATDC (Ataxia Telangiectasia Group D Complementing) Promotes Radioresistance through an Interaction with the

- RNF8 Ubiquitin Ligase. *J. of Biol. Chemistry* 290: 27146-27157.
- Yoshigai, Emi; Kawamura, Shinobu; Kuhara, Satoru; Tashiro, Kosuke (2009) Trim36/Haprin plays a critical role in the arrangement of somites during *Xenopus* embryogenesis. *Biochem. and Biophys. Research Comm.* 378: 428–432.
  - Yuan, Zhigang; Villagra, Alejandro; Peng, Lirong; Coppola, Domenico; Glozak, Michele; Sotomayor, Eduardo M. et al. (2010) The ATDC (TRIM29) protein binds p53 and antagonizes p53-mediated functions. *Mol. Cell. Biol.* 30: 3004–3015.
  - Zhao, Mei-xin; Ding, Shi-gang; Liu, Lin-na; Wang, Ye; Zhang, Jing; Zhang, He-jun; Zhang, Ying (2012) Predicative value of expression of TrkB and TRIM29 in biopsy tissues from preoperative gastroscopy in lymph node metastasis of gastric cancer. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 92: 376–379.
  - Zhijian J. Chen; Lijun J. Sun (2009) Nonproteolytic Functions of Ubiquitin in Cell Signaling. *Molecular Cell* 33: 275-286.
  - Zhou, Zhi-Yi; Yang, Guo-Yi; Zhou, Jing; Yu, Min-Hong (2012) Significance of TRIM29 and  $\beta$ -catenin expression in non-small-cell lung cancer. *J Chin Med Assoc.* 75: 269-274.

**8. Thesen**

1. *Trim29* wird ab NF-Stadium 12 bis NF-Stadium 36 im *Xenopus laevis* exprimiert.
2. *Trim29* stellt einen Marker für das Oberflächenektoderm des *Xenopus*-Embryos dar.
3. *Trim29* weist im *Xenopus*-Organismus keine typische Struktur eines *tripartite-motif*-Proteins auf, da die Ring-Domäne fehlt.
4. *Trim36* weist eine maternale Expression nach der Befruchtung auf. Die Expression nimmt zunächst mit zunehmenden NF-Stadium ab.
5. *Trim36* zeigt während der Neurulation eine neuroektodermale Expression.
6. *Trim36* wird während der Organogenese in Anteilen des Gehirnes (Pros-, Mes- und Rhombenzephalon) sowie im Neuralrohr und in den kaudalen Somiten exprimiert.

## 9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Stefanie Kerstin Förster, geb. Herrmann

Geburtsdatum: 19.12.1989

Geburtsort: Rodewisch

Nationalität: deutsch

Familienstand: verheiratet

Ausbildung:

|                  |   |
|------------------|---|
| 1996-2000        | Grundschule Reumtengrün   |
| 2000-2008        | Goethe-Gymnasium Auerbach Auerbach, Abschluss Abitur  |
| 2008-2014        | Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  |
| 09/2010          | Abschluss der ersten ärztlichen Prüfung   |
| 10/2010- 01/2011 | Anstellung als Hilfwissenschaftler im Institut für Anatomie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg   |
| 09/2011          | Doktorandin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Institut für Physiologische Chemie, AG für medizinische Molekularbiologie bei Prof. Dr. Thomas Hollemann zum Thema “Expressionsanalyse von <i>tripartite-motif29</i> und <i>tripartite-motif36</i> – zwei putative E3-Ligasen in der frühen Embryogenese von <i>Xenopus laevis</i> “ |
| 11/2014          | Abschluss der zweiten ärztlichen Prüfung, Abschluss Ärztin  |
| 01/2015          | Beginn der Weiterbildung zum Facharzt für Orthopädie und Unfallchirurgie am Klinikum Obergöltzsch in Rodewisch  |

---

Unterschrift

**10. Selbständigkeitserklärung**

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

---

Stefanie Förster

**11. Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

---

Stefanie Förster

Danksagung

## **12. Danksagung**

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Hollemann, der mir ermöglicht hat, in seiner Arbeitsgruppe diese Dissertation anzufertigen und viel Geduld aufbrachte, eine Medizinerin in die Arbeit mit den *Xenopus*-Organismen einzuführen.

Weiterhin möchte ich mich im Voraus bei meinen Gutachtern bedanken, welche sich die Zeit nehmen, meine Arbeit zu bewerten.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei allen Mitarbeitern des Institutes für Physiologische Chemie, die mich während der Experimente unterstützt haben und bei sämtlichen Fragen mit Rat und Tat zur Seite standen. Insbesondere danke ich Frau Rebecca Wagner, Herrn Ashwin Lokapally, Frau Dr. Anne Corsing, Frau Dr. Astrid Vess und Frau Juliane Herfurth.

Für die Unterstützung während meines gesamten Lebens und insbesondere beim Anfertigen dieser Arbeit möchte ich mich bei meiner Familie, die mich in allen Vorhaben bestärkt und mir in schwierigen Zeiten den Rücken freigehalten hat, bedanken.

