

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

Expressionsanalyse der putativen E3 Ligasen Trim23 und Trim7
in der frühen Neuralentwicklung von
Xenopus laevis

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med)

vorgelegt der

Medizinischen Fakultät der Martin- Luther- Universität Halle- Wittenberg

Vorgelegt von:

Cilli Dana Buberl geb. Manteuffel

Geboren am 09.12.1989 in Oschatz

Betreuer: Prof. Dr. Th. Hollemann

Gutachter: 1. Prof. Dr. Th. Hollemann
 2. Prof. Dr. M. Neumann (Magdeburg)
 3. Frau PD A. Schambony (Erlangen)

26.01.2017

19.07.2017

Referat

Die Ubiquitylierung von Proteinen in Eukaryoten induziert den Proteinabbau und wird von drei Enzymen, E1, E2 und E3 Ligasen, reguliert. Die Familie der E3 Ligasen besitzt die größte Diversität (Marín, 2012) und vermittelt sowohl die Substraterkennung als auch die Spezifität der Ubiquitylierung (Pickart, 2001; Robinson and Ardley, 2004). Eine Untergruppe der E3 Ligasen weist ein RING- Finger (**r**eally **i**nteresting **n**ew **g**ene) Sequenzmotiv auf. Ihnen zugehörig ist die Familie der TRIM (Tripartite motif) Proteine (Marín, 2012; Napolitano et al., 2011), welche durch einen strukturellen Aufbau aus Ring-Finger Domäne, B-Box und Coiled-Coil Region charakterisiert werden. Obwohl viele Funktionen dieser Proteine bekannt sind, ist ihre Rolle in der Embryonalentwicklung noch unklar. Daher war es Ziel dieser Arbeit an Hand von Embryonen des *Xenopus laevis* die Expression von Trim23 und Trim7, zwei Vertretern der TRIM Familie, mittels „Whole-mount“ *in situ* Hybridisierung (Wmish) und RT- PCR zu untersuchen. Zur phylogenetischen Einordnung wurde ein entsprechender Stammbaum sowie eine Syntenieanalyse angefertigt. Für beide Trim's konnte in der zeitlichen Expressionsanalyse eine maternale Expression nachgewiesen werden. Trim23 wies im Gegensatz zu Trim7 Transkripte im frühen Schwanzknospenstadium (ab NF-Stadium 27) auf. In der räumlichen Expressionsanalyse wurde für beide Trim's eine Expression im animalen Pol innerhalb der Blastula Stadien nachgewiesen. Mit fortschreitender Entwicklung zeigten beide Trim's eine Expression in den Augenvesikeln und in kaudalen Abschnitten des Neuralrohres.

Für Trim23 zeigte die phylogenetische Analyse eine starke Homologie zwischen den dargestellten Organismen. Besonders starke Übereinstimmung bestand in der für Trim23 charakteristischen ARD1 (**A**DP- **r**ibosylation factor **d**omain protein **1**) Domäne mit putativer GTPase Funktion. In Mausembryonen wurde eine Expression des Trim23 an Lysosomen bzw. Golgi- Apparat nachgewiesen. Eine Beteiligung des Trim23 an zellulären Transportprozessen zur Regulation der Proteinhomöostase ist deshalb wahrscheinlich. Für Trim7 gelang der Nachweis eines reinen maternalen Erbganges. Besonders die frühen Embryonalstadien wiesen die meisten Transkripte auf. Erst in späteren Entwicklungsstadien konnte Trim7 in den kaudalen Abschnitten des Neuralrohres nachgewiesen werden. Bekannt ist eine Interaktion des Trim7 als GNIP (**G**lykogenin- **I**nteraktions **P**rotein 1) mit Glykogenin sowie die Wirkung als Progenitor in der Entstehung maligner Neoplasien. Die hohe Diversität zwischen einzelnen Organismen innerhalb der phylogenetischen Analyse weist auf unterschiedliche Funktionen der einzelnen Organismen hin. Für beide Trim's ist die genaue Funktion aktuell unklar.

Buberl, Cilli Dana: „Expressionsanalyse der putativen E3 Ligasen Trim23 und Trim7 in der frühen Neuralentwicklung von *Xenopus laevis*.“ Halle (Saale), Martin-Luther-Universität, Institut für physiologische Chemie, 80 Seiten, 2017.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 <i>Xenopus laevis</i> als Modellorganismus	1
1.2 Überblick der Embryonalentwicklung des <i>Xenopus laevis</i>	1
1.2.1 Befruchtung und Furchung	2
1.2.2 Gastrulation	3
1.2.3 Neurulation und Ausbildung des zukünftigen Nervensystems.....	5
1.2.4 Somitenbildung	9
1.2.5 Überblick über die Entwicklung des Auges	10
1.3 Ubiquitynylierung	12
1.4 Forschungsüberblick Trim23 und Trim7	14
1.4.1 Trim23.....	14
1.4.2 Trim7.....	15
2 Ziel dieser Arbeit	17
3 Methoden	18
3.1 RNA-Isolierung	18
3.2 Reverse Transkription mittels SuperScript® II Reverse Transkriptase	18
3.3 PCR	18
3.4 Agarose-Gelelektrophorese	19
3.5 RNA-Sonden Herstellung	19
3.6 Präparation der <i>Xenopus laevis</i> Embryonen	21
3.6.1 Herstellung Spermien suspension aus <i>Xenopus laevis</i> testis	21
3.6.2 Stimulation der Eiablage und Embryonengewinn.....	21
3.6.3 <i>In vitro</i> Fertilisation.....	21
3.7 Whole mount <i>in situ</i> Hybridisierung (Wmish)	22
3.8 Anfertigen von Vibratomschnitten	24
3.9 Erstellen des Aminosäuresequenzvergleiches	25
3.10 Syntenie	25
3.11 Phylogenetischer Stammbaum	25
4 Ergebnisse	26
4.1 Phylogenetische Einordnung und Aminosäuresequenzvergleich des Trim23 und Trim7	26
4.1.1 Phylogenetische Betrachtung und Aminosäuresequenzanalyse des Trim23.....	26
4.1.2 Phylogenetische Betrachtung und Aminosäuresequenzanalyse des Trim7	28
4.2 Syntenieanalyse	30
4.2.1 Syntenieanalyse des <i>trim23</i>	30
4.2.2 Syntenieanalyse des <i>trim7</i>	31

4.3 Darstellung der räumlichen Expression.....	32
4.3.1 Darstellung der räumlichen Expression ganzer Embryonen des Trim23	32
4.3.2 Darstellung der räumlichen Expression ganzer Embryonen des Trim7	37
4.4 Darstellung der zeitlichen Expression.....	42
5 Diskussion	44
5.1 Funktionen der TRIM-Familie	44
5.2 Phylogenetische Betrachtungen	46
5.2.1 Phylogenetische Betrachtungen des Trim23	46
5.2.2 Phylogenetische Betrachtungen des Trim7	48
5.3 Expressionsanalyse des Trim23 und Trim7.....	55
5.3.1 Expressionsanalyse des Trim23	55
5.3.2 Expressionsanalyse des Trim7	57
6 Zusammenfassung	61
7 Literaturverzeichnis	62
8 Thesen	74
9 Abbildungsverzeichnis	75
10 Tabellenverzeichnis.....	76
Anhang A	77
A.1 Material.....	77
A.1.1 Chemikalien	77
A.1.2 Puffer und Lösungen	78
A.1.3 Kits	78
A.1.4 Enzyme.....	79
A.1.5 verwendete Konstrukte für whole mount <i>in situ</i> Hybridisierung	79
A.1.6 PCR-Primer	79
A.1.7 Geräte, Zubehör, Mikroskope	79
A.1.8 Versuchstiere	80
A.1.9 Software	80

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Ak	Antikörper
APB	Alkalische Phosphatase-Puffer
ARD1	<i>ADP-ribosylation factor domain protein 1</i>
ARF	<i>ADP-ribosylation-factor</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-indoxylphosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMB	Boehringer Mannheim Blocking Reagenz
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BRCA 1	Brustkrebsgen 1
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CARDs	<i>Caspase activate and recruitment Domänen</i>
Cdc2	<i>cyclin dependent cinase 2</i>
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-(3-cholamidopropyl) dimethylammonio-1-Propansulphat
CTP	Cytosintriphosphat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DHCR7	7-Dehydrocholesterol
Dig	Digoxigenin-11-2'-deoxuridin-5'-triphosphat
DNA	<i>desoxy-ribonucleic-acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
EMT	Epitheliale Mesenchymale Transition
EtOH	Ethanol
FGF	<i>Fibroblast-Growth-Factor</i>
GAP	<i>GTPase- activating protein</i>
gdf7	<i>growth differenziation-factor 7</i>
GEF	<i>GTP-exchange factors</i>
GGA	am Golgi-Netzwerk lokalisierte, γ -ear-Domäne enthaltende, ARF-bindende Proteine
GNIP	Glykogenin- Interaktions Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HCMV	humanes Zytomegalie Virus
HIV	humanes Immundefizienz Virus
HNF3 β	<i>winged helix transcription factor β</i>
IFN	Interferon
MAB	Maleinsäurepuffer
MBS	modifizierte Bart's-Lösung
MBT	Midblastula Transition
MID1/Mid1	<i>Midline1</i>
Mitf	<i>microphthalmia-associated-transcription factor</i>
MEM	MOPS/EGTA/Magnesiumsulfat
MEMFA	MOPS/EGTA/Magnesiumsulfat/Formaldehyd
MOPS	4-Morpholinpropanoschwefelsäure
MPF	Maturation promoting factor
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
NaAc	Natriumacetat
NBT	Nitroblau- Tetrazoliumchlorid
NCAM	<i>neural crest adhesion molecule</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

Abkürzungsverzeichnis

NEMO	<i>NF-kappa-B essential modulator</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NF	Stadieneinteilung nach Nieuwkoop und Faber
NFPC	NF-Protocadherin
NHL-Repeat	Aminosäuresequenz (benannt nach NCL-1, HT2A und Lin-41)
NTP's	Nucleotridtriphosphate
ODC1	Ornithindecaboxylase 1
o.g.	oben genannt
Oxt2	<i>homeodomain-containing-transcription-factor</i>
PAPC	paraxiales Protocadherin
Pax6	<i>Paired-box-Gene 6</i>
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PNS	peripheres Nervensystem
PML	Promyelozyten Leukämie Gen
prmd1	<i>PR domain zinc finger protein 1</i>
RACO1	<i>RING domain AP-1 co-activator 1</i>
RB-Zellen	<i>Rohon-Beard-Zellen</i>
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene 1</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
Shh	<i>Sonic hedgehog</i>
Sip1	<i>Smad- interacting- protein 1</i>
SSC	Standard Salz-Citrat-Puffer
Tab.	Tabelle
TAF1	<i>TATA- binding protein associated factors</i>
TGFβ	<i>transforming growth factor β</i>
TRAF6	Tumor Necrosis Factor Rezeptor (TNFR)-assoziierter Factor 6
TRIM	<i>Tripartite motif</i>
<i>TRIM7/Trim7/trim7</i>	<i>Tripartite motif7, Genbezeichnung im Menschen/Maus/ Xenopus laevis</i>
<i>TRIM23/Trim23/trim23</i>	<i>Tripartite motif23, Genbezeichnung im Menschen/Maus/ Xenopus laevis</i>
u.a.	unter anderem
UV- Licht	Ultraviolettes Licht
Vol.	Volumen
vgl	vergleiche
VegT	am animalen Pol der Xenopus Oozyten lokalisierte RNA, welche ein T-box Protein codiert
Wmish	Whole mount <i>in situ</i> Hybridisierung
WnT	Zusammensetzung aus <i>Wingless</i> und <i>Int-1</i>
Xwnt	Xenopus WnT
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Das humane Genom besteht aus 20.000-30.000 einzelnen Genen und wurde im April 2003 komplett entschlüsselt. Eine der größten Familien des menschlichen Genoms stellen die TRIM Gene dar (Napolitano and Meroni, 2012). Aktuell sind über 100 verschiedene Mitglieder bekannt, im Menschen existieren allein ca. 68 Vertreter (Napolitano et al., 2011). Mitglieder der TRIM Familie zeichnen sich durch ihren konservierten Aufbau aus *Ring-Finger* Domäne, *B-Box*, *Coiled coil* Region und variablen C-Terminus aus. Als Ubiquitin E3 Ligasen nehmen sie an diversen zellulären Regulationsprozessen teil. Mutationen innerhalb der TRIM's führen zu schweren Systemerkrankungen, wie das Smith-Lemly-Opitz-Syndrom (Mutation in TRIM18) oder das familiäre Mittelmeerfieber (Mutation in TRIM20) (Cox et al., 2000; James et al., 2007; Woo et al., 2006).

In vorliegender Arbeit wurden Trim23 und Trim7 im Rahmen einer Expressionsanalyse innerhalb der Embryonalentwicklung des *Xenopus laevis* analysiert und charakterisiert. Damit sollte diese Arbeit zum Verständnis einer möglichen Funktion der TRIM's innerhalb der Embryonalentwicklung beitragen.

1.1 *Xenopus laevis* als Modellorganismus

Xenopus laevis gehört zu den südafrikanischen Krallenfröschen oder auch zungenlosen Fröschen (Pipidae). Die durch humanes Gonadotropin stimulierten Weibchen sind in der Lage mehrmals täglich und vor allem jahreszeitlich unabhängig Gelege zu produzieren. Die sich extern entwickelnden Eier sind mit circa einem Millimeter sehr groß, weshalb mikrochirurgische Manipulationen einfach beobachtet werden können. All dies begründet, weshalb *Xenopus laevis* als Modellorganismus der Embryonalforschung gilt (Segerdell et al., 2013).

1.2 Überblick der Embryonalentwicklung des *Xenopus laevis*

Nieuwkoop und Faber beschrieben die Embryonalentwicklung des *Xenopus laevis* und entwickelten ein System zur Einteilung der einzelnen Entwicklungsstadien (Abb. 1).

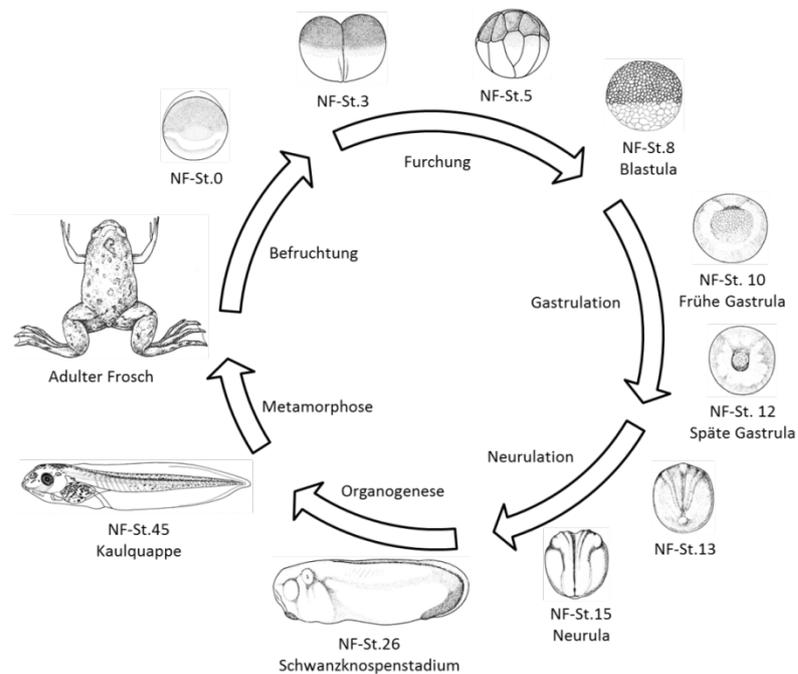


Abbildung 1 Entwicklungszyklus des *Xenopus laevis* (schematische Darstellung nach (Hubrecht-Laboratorium (Embryologisch Instituut) et al., 1967)). Das Blastulastadium wird innerhalb von ca. 5-6 Stunden nach Befruchtung erreicht. Die Gastrulation beginnt nach ca. 13 Stunden. Das Neurulastadium wird ca. 7 Stunden später erreicht. Die Organogenese schließt sich an. Der Embryo hat sich 4 Tage nach der Befruchtung schon zu einer freischwimmenden Kaulquappe entwickelt. Nach ca. 60 Tagen und einer Metamorphose entsteht der adulte Frosch.

1.2.1 Befruchtung und Furchung

Die Eizelle gliedert sich in animalen und vegetalen Pol. Letzterer erscheint heller auf Grund des höheren Dottergehaltes. Nach der Befruchtung erfolgt eine Rotation der Zygoten, wobei der animale Pol oben zu liegen kommt. Die Zellen des animalen Pols (*animalation (engl.)*= schnell Bewegen) weisen eine höhere Teilungstendenz auf. Die Furchungsteilungen beginnen in diesem Bereich und setzen sich in den vegetalen Pol fort. Die ersten beiden mitotischen Teilungen verlaufen streng parallel. Innerhalb dessen kommt es zu einer rasanten Zellzunahme bei Reduktion der Zellgröße. Die so entstehenden Zellen werden Blastomere genannt. Als Ergebnis dieser mitotischen Teilungen entsteht eine *Blastula*.

Die Zellzyklusregulation in den Blastomeren des *Xenopus* erfolgt durch zytoplasmatisch lokalisierte *Maturation promoting factors* (MPF = CyclinB/Cdc2) (Satterwhite et al., 1992). Diese hochkonservierten Kinasen sind für den Beginn, wie auch für das Beenden der Mitose verantwortlich (Beckhelling et al., 1999). Die oszillierende Aktivität des MPF reguliert die ersten Phasen nach Befruchtung (Chesnel et al., 2005). Innerhalb der Teilungen wird in den Zellen Zyklin synthetisiert und akkumuliert (Rankin and Kirschner, 1997). Das entstandene Zyklin bildet mit der *cyclin dependent cinase 2* (Cdc2) (Hartley et al., 1996, 1997; Pomerening

Einleitung

et al., 2005) einen Komplex zur Phosphorylierung mitotischer Substrate, die den Übergang der Interphase in die Mitose fördern (Pomerening et al., 2005).

Mit fortschreitender Entwicklung werden die Teilungen zunehmend asynchron und ungleichmäßig (Arata et al., 2014). Im Zuge der Zellvermehrung kommt es ab dem 12. Zellzyklus zum Anstieg der Gentranskription. Der Übergang maternaler in zygotischer Expression wird Midblastula Transition genannt (MBT). Zur Regulation der zeitlichen Abfolge der Genexpression werden Methylierungen und Demethylierungen an speziellen Gen Promotoren innerhalb der MBT genutzt (Stancheva et al., 2002).

1.2.2 Gastrulation

Als nächster Schritt in der Embryonalentwicklung folgt die Ausbildung der Keimblätter, auch *Gastrulation* genannt. Diese wird im Wesentlichen von den Zellbewegungen des Mesoderms geleitet (Keller et al., 2003; Winklbauer and Keller, 1996). Ausgangspunkt dabei ist der dem Spermieintritt 180° gegenüberüberliegende Punkt der Oozyte, in der äquatorialen Zone der Blastula (Marginale Zone). In diesem Bereich bildet sich eine kleine Vertiefung aus. Diese Blastopore markiert die dorsale Seite des Embryos. Eine etwas stärker pigmentierte Vertiefung in diesem Bereich des Embryos stellt die dorsale Blastoporenlippe dar. An dieser ist der „Speemannorganisator“ lokalisiert. Dieser besitzt die Fähigkeit, durch Signaltransduktion das umgebende Gewebe zu steuern (Zimmerman et al., 1996). In diesem Bereich kommt es während der Gastrulation zur Bildung von *Noggin*, *Follistatin*, *Chordin* und *Wnt*. Alle diese Moleküle zeichnen sich durch die Inhibierung des *BMP*-Signalweges aus. Gleichzeitig besitzen sie die Fähigkeit, die Bildung von Neuralgewebe zu induzieren (Gerhart et al., 2011).

Im Zuge der *Gastrulation* kommt es zur Invagination der äußeren Zellschichten (Abb. 2). Die marginalen Zellen invaginieren über die dorsale Blastoporenlippe entlang der inneren Oberfläche des Blastocoel Daches in Richtung des animalen Pols (Winklbauer and Keller, 1996). Die zuerst einwandernden Zellen bilden das pharyngeale Endoderm des Vorderdarms. Darauf folgen Zellen der zukünftigen Prächordial Platte (Vorläufer des Kopfmesoderms) sowie die Chordamesodermzellen, welche die Chorda dorsalis bilden. Mit steigender invaginierender Zellzahl breitet sich die Blastoporenlippe nach dorsal, lateral und ventral über den gesamten Embryo aus. Es kommt zur Ausbildung des Dotterpfropfens am ventralen Pol des Embryos.

Einleitung

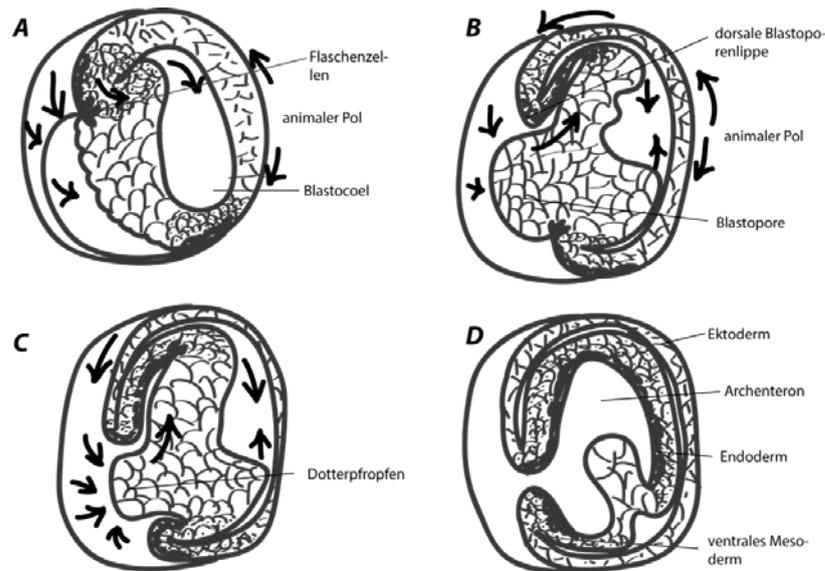


Abbildung 2 Gastrulation (schematisch nach Sive et al., 2000): Die Pfeile stellen die Richtung der Zellbewegungen dar. Über die dorsale Blastoporenlippe wandern die Zellen des zukünftigen Meso- und Endoderms in das Innere des Embryos und lagern sich am Dach des Blastocoels an (B). Dadurch werden die drei Keimblätter gebildet. Das Mesoderm kommt dabei zwischen dem Endo- und Ektoderm zu liegen (C). Durch diese Zellwanderung bildet sich das Archenteron als neue Höhle aus. Das Blastocoel ist am Ende der Gastrulation nicht mehr vorhanden. A- frühe Gastrula; B,C- mittlere Gastrula, D- späte Gastrula.

Die frühe Gastrulation wird im Wesentlichen durch die Expression von paraxialem Protocadherin (PAPC) bestimmt (Kai et al., 2015). PAPC besitzt mehr als fünf extrazelluläre Cadherin-domänen, eine Transmembrandomäne und einen zytoplasmatischen Schwanz (Kai et al., 2015; Kim et al., 1998). Die Gewebetrennung während der Transition der invaginierenden Zellen entlang des Blastocoeldaches erfolgt durch Zellinteraktionen an der Gewebegrenzschicht (Luu et al., 2015). PAPC mindert die Adhäsion an Zellgrenzen durch eine Herabregulierung von Zellpolarisationen sowie durch Fremd-/ Eigenerkennungen. So führt die Erkennung gleicher Signale zur Kontaktformation. Aus einer unterschiedlichen Signalexpression resultiert eine Spaltbildung (Luu et al., 2015).

Im Zuge der Auskleidung der Blastula durch die invaginierenden Zellen kommt es zur Ausbildung des Urdarms (Archenteron) und zum Verschwinden des Blastocoels. Die *Gastrulation* ist beendet, wenn das frühere animale Ektoderm den gesamten Embryo bedeckt. Letztlich kommt das Mesoderm zwischen dem Ektoderm (außen) und dem Endoderm (innen) zu liegen. Aus diesen 3 Keimblättern gehen folgende Organe hervor:

Ektoderm: neurales Gewebe (Gehirn, periphere Nervenfasern), Auge, Riech- und Hörorgane,
Epidermis

Mesoderm: Chorda dorsalis, Muskulatur, Knorpel, Knochen, Nieren, Herz

Endoderm: Darm, Lunge, Leber und Bauchspeicheldrüsen, lymphatisches System

1.2.3 Neurulation und Ausbildung des zukünftigen Nervensystems

Die *Neurulation* im *Xenopus* beginnt mit der Induktion der Neuralplatte im dorsalen Ektoderm (Rashid et al., 2006). Umfangreiche Zellinterkalationen führen zur Ausbreitung der Neuralplatte in antero-posteriorer Richtung (Extension) sowie zur mediolateralen Verschmälerung (Konvergenz) (Keller et al., 1992). Eine Ablösung der Neuralplatte vom umgebenden Gewebe wird durch apikale Konstriktion verhindert. Initiiert wird dieser Prozess durch *Shroom*, ein Aktin-Bindungs-Protein (Haigo et al., 2003). Im Verlauf flacht die Neuralplatte ab und erhebt sich an den anterioren Rändern zu Neuralfalten, welche sich zum Neuralrohr schließen (Abb. 3). Diese Bildung ist im Wesentlichen von Adhäsionsmolekülen abhängig. Ursprünglich exprimierten alle ektodermalen Zellen E-Cadherin. Dessen Expression wird in den Zellen der Neuralplatte mit fortschreitender Neurulation herabreguliert. Innerhalb des Neuralrohres kommt es somit zur Expressionssteigerung von N-Cadherin als auch von Cadherin 6B. Das nicht neuronale Ektoderm exprimiert weiterhin E-Cadherin (Nakagawa and Takeichi, 1998; Rogers et al., 2013).

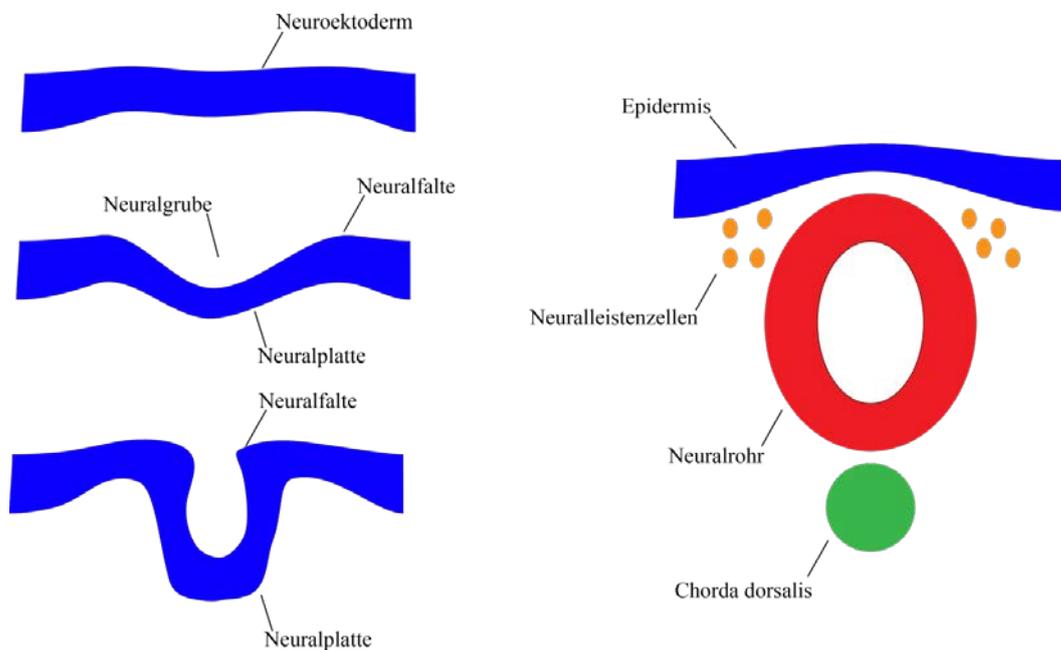


Abbildung 3 Neurulation (schematisch): Die im dorsalen Ektoderm gebildete Neuralplatte flacht sich ab und erhebt sich an den Rändern zu Neuralfalten, welche sich zum Neuralrohr schließen. In dessen dorsalen Bereichen kommt es zur Bildung der Neuralleistenzellen. Diese embryonalen Stammzellen migrieren durch das Mesenchym, um das periphere Nervensystem, den kranialen Knorpel und Knochen sowie Melanozyten zu bilden (Kerosuo and Bronner-Fraser, 2012).

Einleitung

Ein weiterer wichtiger Mediator des Neuralfaltenschlusses ist NF-Protocadherin (NFPC). Es ist in den Spitzen der Neuralfalten lokalisiert (Rashid et al., 2006). Protocadherine stellen die größte Subgruppe der Cadherine dar. Die einzige Gemeinsamkeit besteht in dem Vorhandensein einer extrazellulären Domäne (Heggen and Bradley; Hirano et al., 2003). Dessen zytoplasmatische Domäne wird von TAF1 gebunden, welches in der anterioren, wie auch kaudalen Neuralplatte exprimiert wird (Thomas und Chiang, 2006; Tora, 2002). Die Inhibition beider Moleküle führt zu Aberrationen in der Bildung der Neuralfalten bis zum vollständigen Verlust anteriorer Strukturen (Rashid et al., 2006). Die genaue Interaktion beider Moleküle mit dem Zytoskelett ist noch nicht vollständig geklärt. Eine Wechselwirkung mit *Shroom* wird vermutet.

Gleichzeitig mit der Formation des Neuralrohres kommt es in dessen dorsalen Bereichen zur Bildung von Neuralleistenzellen (Abb. 3). Dabei handelt es sich um transiente embryonale Stammzellen, welche durch das Mesenchym migrieren, um das periphere Nervensystem, den kranialen Knorpel und Knochen sowie Melanozyten zu bilden (Kerosuo and Bronner-Fraser, 2012). Die Differenzierung sowie das Auftreten und die zeitliche Abfolge der Emigration der Neuralleistenzellen aus der dorsalen Region des Neuralrohres wird durch einen gut untersuchten Ablauf von Transkriptionsfaktoren (u.a. *Sox9*, *Snail/Slug*, *AP2*) und Signalwegen (z.B. *BMP*, *Wnt*) spezifiziert (Park and Gumbiner, 2010).

Als Voraussetzung der Migration der Neuralleistenzellen gilt der Durchlauf der Epithelialen Mesenchymalen Transition (EMT). Kernstück dabei ist die Transformation von streng verbundenen polarisierten epithelialen Zellen in locker verbundene migrierende mesenchymale Zellen (Rogers et al., 2013). Während der Migration kommt es neben der Änderung der Zellmorphologie zu einem Wechsel des Expressionsmusters. Zu Beginn der Transition exprimieren die Neuralleistenzellen Adhäsionsmoleküle N-Cadherin und NCAM, welche im Verlauf verloren gehen (Akitaya and Bronner-Fraser, 1992). Am Ende der Migration aber noch vor der Bildung der sympathischen Ganglien, kommt es zum Wiederanstieg der N-Cadherin Expression. Mit dem Entstehen motiler mesenchymaler Zellen wechselt das Expressionsmuster von N- zu E-Cadherin (Rogers et al., 2013). Die Transkriptexpression wird dabei von Sip1 reguliert. Ein Ausschalten dieses Faktors führt zu einer gehemmten Migration.

Die EMT in Neuralleistenzellen zeichnet sich durch Deepithelialisierung und Delaminierung (Park and Gumbiner, 2012) aus. Der erste Schritt der Deepithelialisierung wird durch die Expression von Cadherin 6B reguliert. Es handelt sich dabei um ein Typ II Cadherin, welches vorrangig in den vormigratorischen Zellen des Rumpfes und bereits migrierten Zellen exprimiert wird. Dieser Prozess wird durch den BMP-Signalweg induziert (Park and Gumbiner, 2012). BMP's sind Mitglieder der TGF β Familie (Park and Gumbiner, 2012). BMP's sind

Einleitung

wesentlich für die Embryonalentwicklung zur Differenzierung von Organsystemen/ -geweben sowie zur Differenzierung von Stammzellen.

Am Ende der Gastrulation kann eine Unterteilung des Ektoderms in neuronal und nicht neuronale Bereiche erfolgen. Die neuronalen Strukturen stellt die Neuralplatte dar, aus ihr geht das spätere zentrale Nervensystem hervor. Das nicht neuronale Ektoderm formt die spätere Epidermis. An der Grenzschicht, der sog. Neuralplattengrenze, kommt es zur Bildung von Neuralleistenzellen, Zellen der kranialen Plakoden sowie *Rohon-Beard* (RB)-Zellen (Rossi et al., 2008). Letztere werden nicht in allen Vertebraten gebildet. Im *Xenopus* befinden sich diese Zellen nach der Neurulation im dorsalen Bereich des sich schließenden Neuralrohres und bilden sensorische Neurone aus (Park et al., 2012). Diese *Rohon-Beard*-Zellen besitzen sowohl lange Dendriten, welche entlang der lateralen Fasciculi den Hirnstamm erreichen, als auch kurze, für die Innervation der Haut (Yajima et al., 2014). Besonders letztere dienen zur Informationsverarbeitung der Umwelt sowohl in Embryonen des *Xenopus* als auch des Zebrafisches. Schon durch leichte taktile Reizung dieser Nervenendigungen erfolgt eine Kontraktion der kontralateralen Muskulatur. Diese Ausweichbewegung des Rumpfes stellt einen primitiven Fluchtreflex dar (Rossi et al., 2009). Die Bildung dieser sensorischen RB-Neurone wird durch BMP induziert. Neben BMP4 spielt *prmd1* eine wesentliche Rolle. Dabei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor der *Downstream* von BMP agiert (Rossi et al., 2008). Expressionsstudien in Zebrafischen zeigten, dass dessen Fehlen zu falsch gerichteten Reizantworten sowie zum Verlust der RB-Zellen führt (Rossi et al., 2008). Mit fortschreitender Entwicklung erfolgt die Apoptose der *Rohon-Beard*-Zellen. An ihre Stelle treten dorsale Wurzelglia Zellen. Als Schlüsselregulator dieser Transition gilt der Transkriptionsfaktor *Six1*, welcher vermehrt vor der Apoptose der RB-Zellen exprimiert wird (Yajima et al., 2014).

Das Neuralrohr ist der zentrale Ausgangspunkt für die weitere Entwicklung des zentralen Nervensystems. Dabei wird zwischen der anterior-posterioren und der dorsal-ventralen Achsenstrukturierung unterschieden. Die anterioren Bereiche bilden Vorder- und Mittelhirn und die posterioren Bereiche das Hinterhirn und Rückenmark (Saha et al., 1997). Mit fortschreitender Entwicklung unterteilt sich das Vorderhirn (Prosencephalon) in Tel- und Diencephalon. Die zerebralen Hemisphären gehen aus dem Telencephalon hervor. Innerhalb des Diencephalons werden die optischen Vesikel sowie die thalamischen und hypothalamischen Regionen gebildet. Das Mesencephalon wird nicht unterteilt. Aus Hinterhirn (Rhombencephalon) bilden sich Zerebellum und Medulla oblongata.

Diese Achsenstrukturierung ist fundamental innerhalb der Embryogenese der Amphibien. Sie unterliegt dem Zusammenspiel zwischen den Transkriptionsfaktoren Nodal/Vg1, Wnt und BMP. Nodal ist für die Ausbildung der dorsalen Achse verantwortlich, während Vg1 die Anteriorisierung bestimmt. Veg T und Vg1, beides T-Box transkriptionale Regulatoren von

Einleitung

Nodal-Genen, sind wichtig für die Kopfentwicklung und werden maternal exprimiert. Vg1 und Nodal wirken antagonistisch zu BMP, welches zu Ventralisation und Posteriorisierung führt (Onai et al., 2010).

Die Ausbildung anteriorer neuraler Gewebe (Prosenzephalon) wird durch Chordin, Noggin und Follistatin induziert. Dem gegenüber stehen die Induktion der posterioren Gewebe durch Retinsäure, Wnt und BMP (Ribes et al., 2010). Funktionsstudien in Mäusen zeigten, dass der Verlust von Wnt1 zum Abbruch der Bildung des Mittelhirns und Cerebellums führt, während sich das restliche Neuralrohr normal weiter entwickelte (Saint-Jeannet et al., 1997).

Die Ausbildung der dorsal-ventralen Achse des Neuralrohres erfolgt in Abhängigkeit der umgebenden Gewebe (Lee et al., 1997; Roelink et al., 1995). Als Beispiel dient das zukünftige Rückenmark. Das darüberliegende Ektoderm induziert die Bildung der Deckplatte, während die unterliegende Chorda dorsalis die Grundplatte der Wirbelsäule induziert. Als Schlüsselmolekül der Bildung der Grundplatte und der darin enthaltenen Motorneuronen gilt die Sezernierung des Sonic hedgehog (Shh) aus der Chorda dorsalis (Abb 4). Ein weiterer wesentlicher Faktor in der Polarisierung der dorsal-ventralen Achse ist die Expression von HNF3 β (Patten und Placzek, 2002). Dessen Expression wird durch das dorsale Mesoderm induziert. Expressionsanalysen zeigten, dass beide Moleküle die gegenseitige Bildung induzieren können (Ribes et al., 2010).

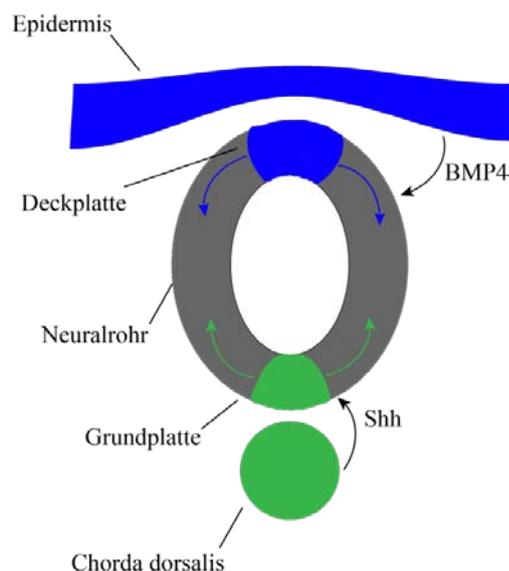


Abbildung 4 Polarisierung des Neuralrohres. Das Ektoderm induziert durch BMP4 die Induktion der Deckplatte im Neuralrohr. Die Grundplatte wird durch Shh aus der Chorda dorsalis induziert. Insgesamt herrscht innerhalb des Neuralrohres ein dorso-ventraler Konzentrationsgradient des BMP4 und Shh. Entsprechend der einzelnen Konzentrationen werden verschiedene Neuronen ausgebildet. Shh- Sonic hedgehog; BMP4- Bone-morphogenic protein 4.

Die weitere Spezifizierung der Grundplatte unterliegt dem Konzentrationsgradienten des Shh.

Einleitung

Die Konzentration des Shh sinkt mit steigender Entfernung zur Chorda. Hohe Shh-Konzentrationen führen zur Expression der Homeobox Proteine Nkx6.1 und Nkx2.2 und damit zur Bildung von V3-Neuronen (ventrale Neuronen). In den dorsal benachbarten Zellen liegen verminderte Shh-Konzentrationen vor, weshalb hier Nkx 6.1 und Pax6 exprimiert werden. Dies führt zur Entstehung von Motorneuronen. Die folgenden Zellreihen werden zu V2- und V1-Interneuronen mit noch geringeren Shh-Konzentrationen (Patten und Placzek; 2002, Ribes et al., 2010).

Die Bildung der Deckplatte erfolgt abhängig von der Sekretion von BMP's (BMP 2,4,7), gdf7, activin und dorsalin aus dem überliegenden Ektoderm (Swapna und Borodinsky, 2012). Wie in der Grundplatte besteht auch in der Deckplatte ein Konzentrationsgradient. Das BMP4 innerhalb der Deckplatte induziert eine TGF β -Kaskade. Je weiter ventral die Zellen lokalisiert sind, desto geringer ist dessen Konzentration. Auf Grund der unterschiedlichen Konzentrationen kommt es zur Ausbildung diverser Interneurone. Ergebnis dieser Achsenstrukturierung ist die Ausbildung verschieden lokalisierter Neurone, welche bestimmte Funktionen auf Grund ihrer Lokalisation erfüllen können.

1.2.4 Somitenbildung

Entlang des *Neuralrohres* verdichtet sich beiderseits das Mesoderm und bildet die *Somiten*, auch „Urwirbel“ genannt. Aus diesen entstehen die spätere Rückenmuskulatur, die Dermis und das Skelettsystem. Durch Metamorphose entsteht der adulte Frosch.

Innerhalb des parachsialem Mesoderms, welches dem Neuralrohr und der Chorda dorsalis benachbart ist, entstehen transiente Zellansammlungen, sog. Somiten (Münsterberg et al., 1995). Initial handelt es sich dabei um eine Sphäre epithelialer Zellen. Mit fortschreitender Entwicklung kommt es durch die EMT des ventralen Somitenepithels zur Bildung des Sklerotoms, welches Vorläuferzellen der Wirbelkörper und Rippen enthält. Das dorsale Somitenepithel verbleibt *in situ* und bildet das Dermomyotom (Capdevila et al., 1998). Das Dermomyotom unterscheidet zwischen einem medialen und einem lateralen Anteil. Die Zellen des medialen Dermomyotoms, welches dem Neuralrohr benachbart ist, entwickeln sich zu Rücken- und Interkostalmuskulatur. Aus den Zellen des lateralen Dermomyotoms entsteht die Muskulatur der Extremitäten und der ventralen Rumpfwand (Münsterberg et al., 1995).

Zwischen Sklerotom und Dermomyotom bildet sich das Myotom aus, welches Vorläuferzellen der skelettalen Muskulatur enthält.

Die Somiten unterliegen, ebenso wie das Rückenmark, dem Einfluss des umgebenden Gewebes (Abb. 5). Die Chorda dorsalis und die Grundplatte des benachbarten Neuralrohres exprimieren Shh. Dieses aktiviert in den Sklerotomen die Expression von Pax1, welches die Differenzierung

Einleitung

der darin enthaltenen Zellen induziert (Dietrich and Gruss, 1995; Münsterberg et al., 1995). Das Dermomyotom wird wesentlich durch den Wnt Signalweg beeinflusst. Als wichtigsten Vertreter gilt Wnt1. Expressionsstudien zeigten, dass eine Überexpression des Wnt1 zu einer Repression des Sklerotoms führt (Bumcrot und McMahon, 1995; Capdevila et al., 1998).

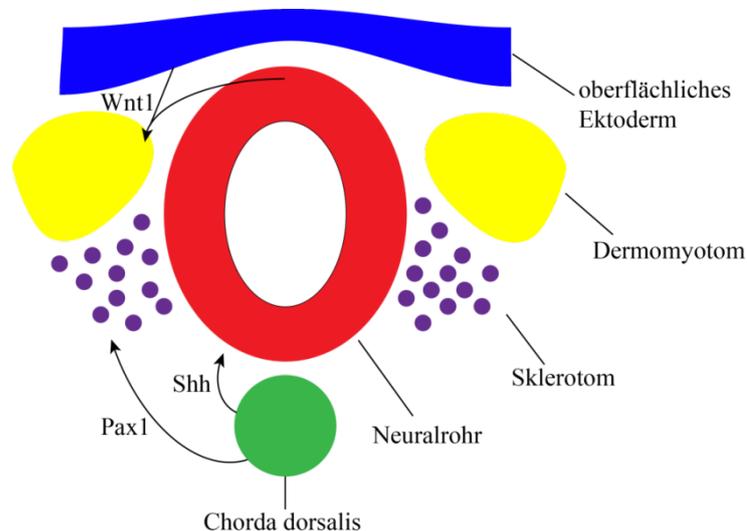


Abbildung 5 Somitenbildung: Somiten sind transiente Zellansammlungen, aus denen die zukünftige Rückenmuskulatur entsteht. Durch die EMT kommt es zur Bildung von Dermomyotom (Vorläufer der Rumpfmuskulatur) und Sklerotom (Vorläufer der zukünftigen Wirbelkörper und Rippen). Durch die Exkretion entsprechender Signalmoleküle aus Ektoderm und Chorda dorsalis wird die entsprechende Ausdifferenzierung innerhalb des Sklero- und Dermomyotoms aktiviert.

Als letzten Entwicklungsschritt durchlaufen alle Amphibien die Metamorphose. Speziell bei Anuren (Fröschen und Kröten) durchlaufen alle Organe Veränderungen wie z.B. Wachstum, Umbau oder Zelltod. Initiiert wird dieser Prozess durch die Schilddrüse der Kaulquappe. Das daraus sekretierte T3 (Triiodthyronin) und T4 (Thyroxin) erreicht über die Blutbahn die peripheren Gewebe und induziert die oben genannten Veränderungen (Cai and Brown, 2004; Crump et al., 2002). So verknöchert z.B. der zuvor knorpelige Schädel der Kaulquappe, die Kiemen bilden sich zurück und an deren Stelle weitet sich die Lunge aus. Mit dem Einsatz der Gametogenese ist die Metamorphose beendet und ein neuer Entwicklungszyklus beginnt.

1.2.5 Überblick über die Entwicklung des Auges

Die Entwicklung der Augen beginnt bereits während der Gastrulation (Zygar et al., 1998). Sie entstehen aus sog. „Optischen Vesikeln“, wobei es sich um bilaterale Ausstülpungen des Diencephalons handelt (Abb.6). Erreicht das Vesikel das oberflächliche Ektoderm wird an dieser Stelle die Linsenbildung induziert (Harmon Lewis, 1906; Hyer et al., 2003). Eine

Einleitung

wesentliche Rolle dabei spielen Pax6, Six3 und Sox2 (Bailey et al., 2006). Die Expression von Six3 findet im oberflächlichen Ektoderm statt und induziert Pax6 und Sox2 (Liu et al., 2006). Die Induktion von Sox2 wird von BMP7 reguliert.

Mit fortschreitender Verdichtung der Linsenplakode beginnt die Invagination, welche zur Ausbildung des Linsenvesikels und des doppelschichtigen Augenbechers führt (Chow and Lang, 2001). Dabei bildet die innere Schicht die neuronale Retina und die äußere Schicht das retinale Pigmentepithel. Treffen sich diese beiden Strukturen kommt es zur Ausbildung der Iris bzw. des Ziliarkörpers.

Die Spezifizierung der Retina ist komplex. Für die Bildung des retinalen Pigmentepithels ist die Expression von Mitf und Oxt2 wesentlich (Martínez-Morales et al., 2003). Für die weitere Differenzierung im Augenbecher ist die Expression von BMP nötig (Sjödäl et al. 2007). Insbesondere BMP4 ist verantwortlich für die Induktion der Linsenbildung. Für die Spezifizierung der neuronalen Retina spielt der FGF-Signalweg eine Rolle. Im Linsenektoderm zeigen besonders FGF1 und FGF2 eine starke Expression (Hyer et al., 1998).

Aus den Augenbecher umgebenden Mesenchym bilden sich Choroidea und Augenmuskeln. Das Linsenvesikel wird dichter und kapselt sich vom Ektoderm ab, um die Linse zu bilden. In dem Raum zwischen Linse und Ektoderm kommt es zur Einwanderung von Neuralleistenzellen, die das Kornealendothel bilden (Hu et al., 2013).

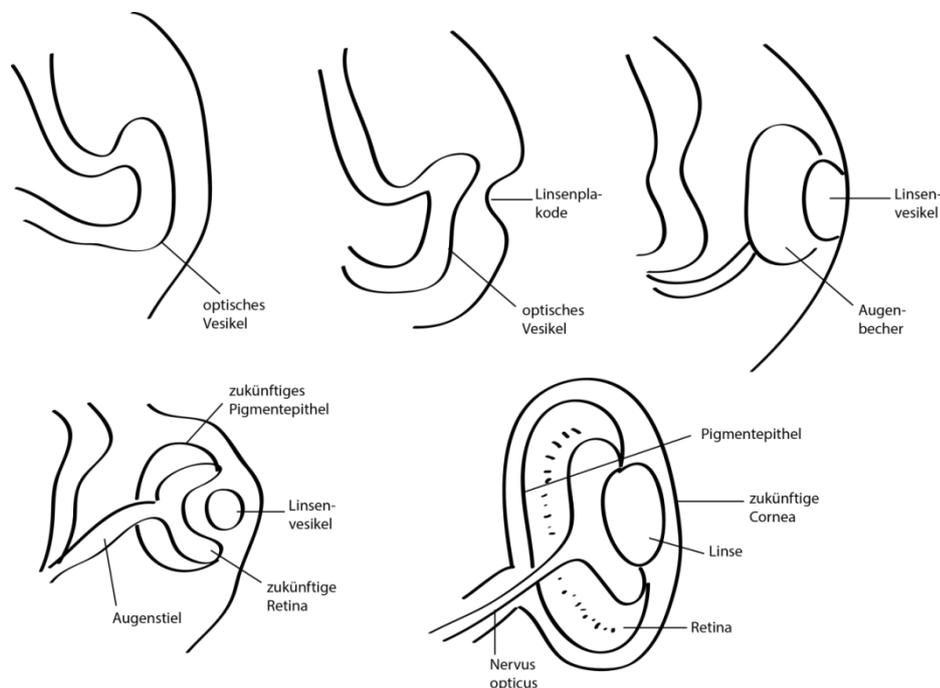


Abbildung 6 Augenentwicklung (schematisch): Das optische Vesikel, als Ausstülpung des Diencephalons, vergrößert sich in Richtung des umgebenden Ektoderms. Der Kontakt beider Strukturen induziert die Bildung der Linsenplakode. Durch Invagination kommt es zur Ausbildung des Linsenvesikels und des doppelschichtigen Augenbechers. Aus der inneren Schicht des Augenbechers geht die zukünftige Retina und aus der äußeren das zukünftige Pigmentepithel hervor. Mit fortschreitender Entwicklung verdichtet sich das Linsenvesikel und kapselt sich vom Ektoderm ab. Einwandernde Neuralleistenzellen zwischen Ektoderm und Linsenvesikel bilden die zukünftige Cornea (Chow and Lang, 2001; Hu et al., 2013; Sive et al., 2000).

1.3 Ubiquitinylierung

Ubiquitin ist ein aus 76 Aminosäuren bestehendes Protein, welches wichtige zelluläre Prozesse reguliert, u.a. Endozytose, lysosomales Targeting (Zielauswahl), nukleären Export, DNA Reparatur, Histonveränderung, Aktivierung von Kinasen sowie Transkriptionsfaktoren (Bielskienė et al., 2015; Fang et al., 2003). In eukaryotischen Zellen spielt die Regulation des koordinierten Proteinabbaus eine wesentliche Rolle (Lindsten and Dantuma, 2003). So werden beispielsweise gealterte oder fehlerhafte Proteine mit Ubiquitin markiert und dem Proteasom zugeführt und vernichtet. Diese Ubiquitinylierung ist ein hoch konservierter Prozess (Xu et al., 2009). Dieser wird durch drei Enzyme ermöglicht (Abb.7). Das Ubiquitin aktivierende Enzym E1 formt unter ATP-Verbrauch ein Ubiquitin-Thioester-Derivat, welches an ein Cystein des Ubiquitin konjugierenden Enzyms E2 übertragen wird. E3 Ligasen übertragen das Ubiquitin von E2 zu einem Lysin des Zielproteins (Glickman and Ciechanover, 2002). Das gebundene Lysin gibt den weiteren Weg vor. Wird das Substrat an Lysin 48 gebunden, erfolgt dessen Abbau. Eine Bindung an Lysin 63 mediiert die Proteinkinaseaktivierung, die DNA-Reparatur und den Zelltransport (Sun and Chen, 2004). Eine Verbindung aus mindestens vier Ubiquitinmolekülen aktivieren das 26S Proteasom (Ardley et al., 2005). Dabei handelt es sich um einen großen proteolytischen Komplex (ca. 2MDa), welcher Proteine in kleinste Bestandteile zerlegt. Ubiquitin wird recycelt und steht für neue Prozesse zur Verfügung (Ardley et al., 2005).

Vergleichend mit den E1 und E2 Enzymen besitzt die Gruppe der E3 Ligasen die größte Diversität (Marín, 2012). So kann eine E3 Ligase mehrerer E2 Enzyme zu unterschiedlichen Ubiquitinketten verbinden. Dadurch werden diverse zelluläre Funktionen reguliert (Fang et al., 2003). Die vielfältigsten E3 Ligasen sind Ring-Finger-Proteine, zu denen unter anderem die Familie der TRIM-Proteine gehört (Marín, 2012; Napolitano et al., 2011). Diese sollen im Folgenden näher beleuchtet werden.

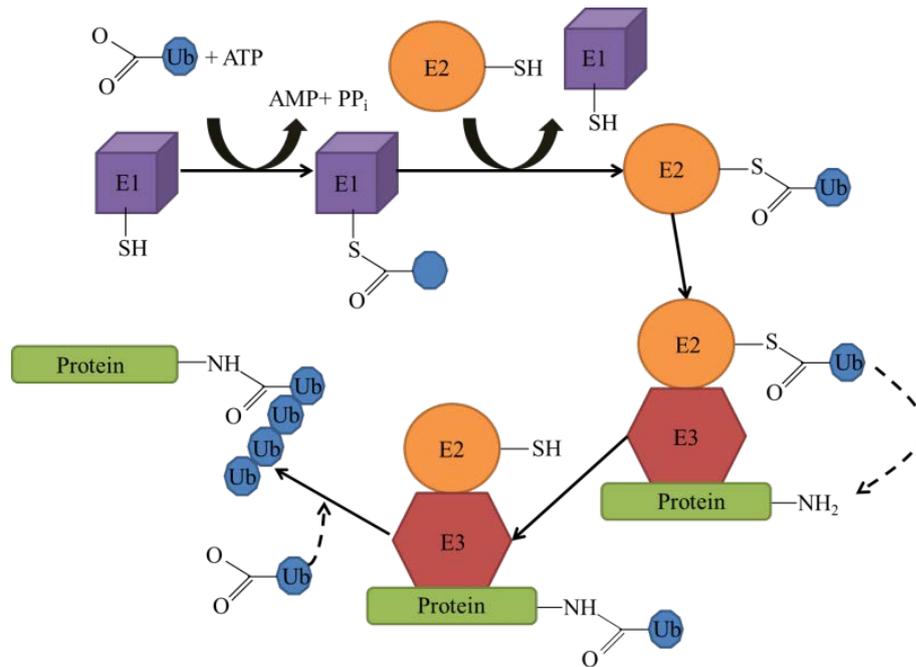


Abbildung 7 Ubiquitinierung (schematisch): Die Ubiquitinierung eines Proteins erfolgt in drei Schritten. Ubiquitin (Ub) wird dabei vom aktivierenden Enzym (E1) auf das konjugierende Enzym (E2) übertragen. Durch die E3 Ligase erfolgt die Übertragung auf das Zielprotein. Erfolgen weitere Verknüpfungen mit Ubiquitin (Polyubiquitinierung), wird das markierte Protein zum Proteasom transportiert und dort abgebaut.

Mitglieder der TRIM (*Tripartite motif*) Familie, auch **RBCC** genannt, sind gekennzeichnet durch ihren molekularen Aufbau. Dabei handelt es sich (vom N-zum C-Terminus) um eine **Ring-Domäne**, 1-2 zinkbindende **B-Boxen**, gefolgt von einer **Coiled-coiled-Region** und dem variablen **C-terminus** (Abb.7). Die Zugehörigkeit zur Familie der TRIM wird dabei durch die B-Boxen am N-Terminus definiert (Meroni and Diez-Roux, 2005). Die erste Beschreibung der RBCC erfolgte 1991 als „*Xenopus nuclear factor 7 gene (Xnf7)*“ (Reddy und Etkin, 1991). Seit dem wurden über 100 solcher RBCC entdeckt, über 68 allein im Menschen (Napolitano et al., 2011).

TRIM's gehören zu der Familie der Ringfinger-Proteine. Die Ring-Finger-Sequenz fand erstmalig 1991 Erwähnung im Zusammenhang mit dem menschlichen Gen RING1 (**really interesting new gene**). Damals wurde sie unter dem Namen A-Box 1 bekannt (Torok and Etkin, 2001). Das Motiv der Ringfinger besteht aus acht linearen Cystein-Histidin Resten, welche zwei Zinkatome binden können und nach dem „*cross-brace*“ Schema aufgebaut sind (Fang et al., 2003; Freemont, 2000). Diese Domäne ist entscheidend für die Interaktion mit Ubiquitin (Joazeiro und Weissman, 2000; Meroni and Diez-Roux, 2005). B-Boxen sind ebenfalls cystein- und histidinreiche Regionen, welche im Gegensatz zu der Ringfinger-Domäne nur ein Zinkatom binden können (Meroni and Diez-Roux, 2005). Verschiedene Proteine weisen eine unterschiedliche Anzahl B-Boxen auf. Ist nur eine Box vorhanden, handelt es sich immer um B-

Einleitung

Box2. B-Box 1 tritt nur zusammen mit einer B-Box 2 auf (Sardiello et al., 2008). Die sich daran anschließende leucinreiche Coiled-coiled-Region besteht aus ca. 100 Molekülen und ist für die Homo- wie auch Heterooligomerisierung (Sanchez et al., 2014) sowie zur Bildung von hochmolekularen Komplexen verantwortlich (Meroni and Diez-Roux, 2005).

Die strukturelle Anordnung dieser einzelnen Domänen innerhalb des RBCC ist stark konserviert (Sardiello et al., 2008). Die einzelnen Familienmitglieder unterscheiden sich nur anhand des C-terminalen Restes. Eine Vielzahl der TRIM's besitzen die SPRY/PRY, auch B30.2 Domäne genannt (Kawai and Akira, 2011). Diese vermittelt die Protein-Protein-Interaktion, z.B. die Regulation von Zytokinsignalwegen und die Freisetzung des intrazellulären Calciums (Rhodes et al., 2005).

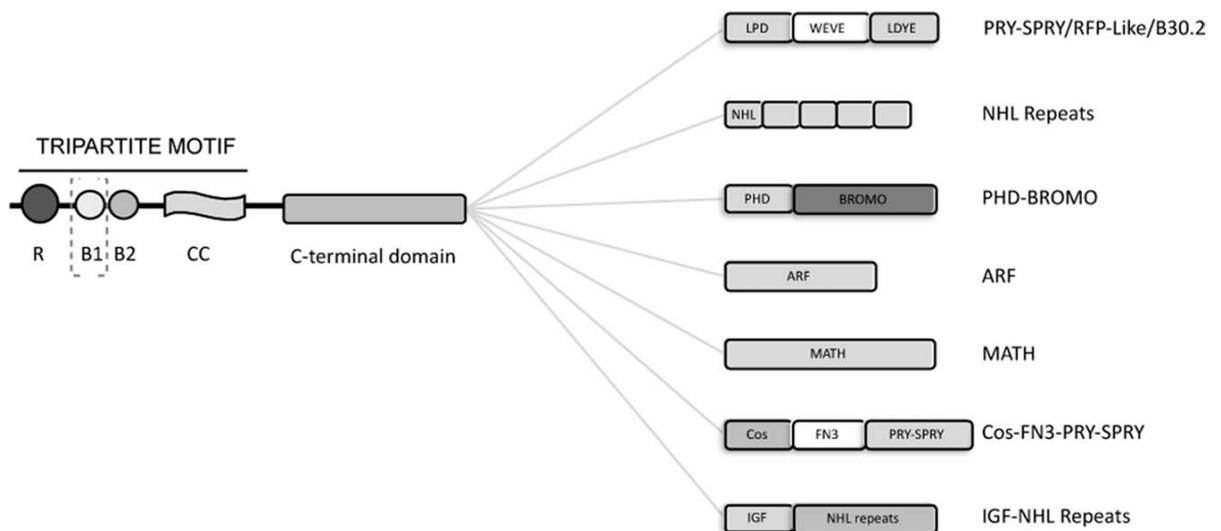


Abbildung 8 Schematische Darstellung des Aufbaus der Proteine der TRIM Familie (Napolitano und Meroni, 2012): R- Ring Domäne; B- B-Box; CC- Coiled-coiled Region; C-terminal Domain- C-Terminus. Im rechten Teil der Abbildung werden die wichtigsten Strukturelemente der C-terminalen Domäne gezeigt.

1.4 Forschungsüberblick Trim23 und Trim7

1.4.1 Trim23

Trim23, ein 64kDa Protein, enthält das TRIM typische RBCC Motiv und wird in der Literatur auch als ARD1 (*ADP-ribosylation factor domain protein 1*) bezeichnet (Vichi et al., 2005). Namensgebend ist die am C-terminalen Ende befindliche ARF (*ADP-ribosylation-factor*) Domäne (Vichi et al., 2005). Benannt wurden die ARF's nach ihrer Fähigkeit, die Cholera toxin induzierte ADP-Ribosylierung der G_{sa} Untereinheit zu beschleunigen (Moss and Vaughan, 1998; Vichi et al., 2005; Vitale et al., 1996).

Einleitung

ARF's gehören zur Familie der GTPasen. In eukaryotischen Zellen erfolgt die Einteilung in sechs Untergruppen basierend auf genetischer Struktur, Aminosäuresequenzanalysen sowie phylogenetischen Analysen (Donaldson and Jackson, 2011; Moss and Vaughan, 1995). Ihre Aktivität wird durch Interaktion mit *GTP-exchange factors* (GEF) und *GTPase-activation protein* (GAPs) reguliert (Vitale et al., 2000). Im Vergleich zu anderen bekannten ARFs besitzt ARD1 am N-terminalen Ende eine GAP-Domäne (Vitale et al., 1996), wodurch eine direkte Bindung von Guanintriphosphat (GTP) und Guanindiphosphat (GDP) möglich ist (Kanamarlapudi and Wilson, 2011; Vitale et al., 2000).

Neueste Studien zeigen, dass ARF's in der Regulation einzelner intrazellulärer Transportvorgänge beteiligt sind. Sie rekrutieren Effektorproteine für den Vesikeltransport und aktivieren Enzyme, z.B. die Phosphatidylinositol-Kinase (Donaldson and Jackson, 2011; Mossessova et al., 2003; Selyunin et al., 2014).

Speziell für ARD1 zeigten Expressionsanalysen eine Lokalisation vornehmlich am Golgi-Apparat und Lysosomen. Eine Beteiligung des ARD1 an der Regulation der Transportvorgänge zwischen beiden Organellen ist jedoch noch nicht bewiesen (Vitale et al., 1998, 2000). Bekannt ist die Regulation zellulärer Abwehrprozesse durch Trim23. Infektionsstudien an humanen Zellen bewies eine Interaktion des Trim23 mit UL 144, einem Protein des Humanen Cytomegalie Virus. Diese Interaktion führt zur viral gesteuerten NF- κ B Aktivierung innerhalb der frühen Infektion (Poole et al., 2009). Die dabei auf zellulärer Ebene ablaufenden Regulationsmechanismen sind zum aktuellen Zeitpunkt noch unklar.

1.4.2 Trim7

Kennzeichnend für Trim7 ist neben dem namensgebenden RBCC Motiv, die SPRY Domäne am C-terminalen Ende, welche zelluläre Interaktionen ermöglicht (James et al., 2007). So erkennt die SPRY-Domäne des TRIM5 α der Rhesusaffen eindringende HIV-1 Capside und baut diese ab (Yang et al., 2012). TRIM22, auf Grund der SPRY-Domäne nukleär lokalisiert, beeinflusst im Rahmen der Funktion als E3 Ligase die posttranslationale Modifizierung des Gag-Moleküls des HIV-1, weshalb dessen intrazellulärer Transport zur Zellmembran verhindert wird (Gao et al., 2009; Hattlmann et al., 2012; Kajaste-Rudnitski et al., 2011). Neben HIV wird durch TRIM22 die Genexpression des Hepatitis B Virus inhibiert (Gao et al., 2009).

Identifiziert wurde die SPRY-Domäne in der *splA* Kinase des *Dictyostelium discoideum* sowie in den Calciumkanälen des Ryanodin-Rezeptors in Säugetieren (Grütter et al.; Woo et al., 2006). Mutationen im Bereich der SPRY-Domäne führen zu schweren Systemerkrankungen,

Einleitung

wie das Familiäre Mittelmeerfieber (Mutationen in TRIM20/Pyrin) oder das Smith- Lemly-Opitz-Syndrom (Mutation in TRIM18/Mid1) (Cox et al., 2000; James et al., 2007; Woo et al., 2006).

In der Literatur wird Trim7 als **Glykogenin-Interaktions-Protein 1 (GNIP 1)** bezeichnet und interagiert mit Glykogenin innerhalb der Glykogen-Biosynthese (Skurat et al., 2002). Auf Grund seiner Selbstglykosylierungsaktivität verlängert Glykogenin unter Bindung von Glukose an Tyrosin des Glykogens die bestehende Glykogenkette bis zu einer Länge von 8-10 Resten (Alonso et al., 1995; Cao et al., 1993). In Expressionsstudien konnte eine Interaktion des Glykogenins mit GNIP dargestellt werden (Skurat et al., 2002).

Aktuell sind drei verschiedene Isoformen des GNIP bekannt. GNIP 1 besitzt sowohl die längste Aminosäurekette als auch eine RBCC-Familie zugehörige Sequenz, welche identisch zu Trim7 ist (Skurat et al., 2002). Unterschiede bestehen jedoch im C-terminalen Ende, weshalb Trim7 eher als Splicevariante des humanen GNIP Genes gesehen werden kann (Skurat et al., 2002).

Expressionsstudien an murinen und humanen Geweben zeigten ein starkes Vorkommen des Trim7 in der Skelettmuskulatur, geringe Transkriptmengen fanden sich in Herz-, Gehirn- und Pankreasgewebe (Reymond et al., 2001; Skurat et al., 2002). Mutationsstudien konnten eine Interaktion zwischen TRIM7 und dem Ras-Signalweg nachweisen (Chakraborty et al., 2015). Dadurch bedingt kam es zur Zunahme des Tumorwachstums, speziell des Lungencarcinoms (Chakraborty et al., 2015). Inwieweit Trim7 als prognostischer Marker dient, ist noch unklar.

Ziel dieser Arbeit

2 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Darstellung der räumlichen und zeitlichen Expression des Trim23 und Trim7 in der Entwicklung von Vertebraten. Dafür wurden Embryonen des *Xenopus laevis* von der befruchteten Eizelle bis zum frühen Kaulquappenstadium mittels Whole mount *in situ* Hybridisierung und semiquantitativer RT-PCR untersucht. Zur phylogenetischen Einordnung der erzielten Ergebnisse wurden auf Basis eines detaillierten Sequenzvergleiches ein entsprechender Stammbaum und eine Syntenieanalyse erstellt.

Insgesamt sollte diese Arbeit zum Verständnis über die mögliche Funktion dieser Trim's innerhalb der Embryonalentwicklung beitragen.

3 Methoden

3.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte mittels RNeasy mini Kit (*Qiagen*) laut Anleitung. Der Lysisbuffer wurde gewichtsadaptiert verwendet. Zum Schluss erfolgte die Konzentrationsbestimmung der RNA im Eluat mittels *NanoDrop*[®] und die Auftragung von 1µl dieser Lösung auf ein Agarose-Gel.

3.2 Reverse Transkription mittels SuperScript[®] II Reverse Transkriptase

Die Transkription der RNA in DNA erfolgte mittels SuperScript[®]II Reverse Transkriptase Kit entsprechend dem dazugehörigen *Invitrogen* Protokoll. Der Mix wurde bei 42°C für 45 Minuten inkubiert und anschließend bei 72°C für 10 Minuten inaktiviert.

3.3 PCR

Die für die PCR notwendigen Primer (Anhang 1.6) wurden von *Sigma-Aldrich Biotechnology, L.P. and Sigma-Aldrich Co.* erworben.

Restriktionsansatz:

2µl cDNA (100ng/µl)
11,5µl destilliertes H₂O
2µl 10x Puffer

1µl dNTP's (10mM)
1,25µl forward Primer (0,2mM)
1,25µl reverse Primer (0,2mM)
1µl Taq-Polymerase (0,5U)

Reaktionsprogramm:

Initialisierung: 96°C für 1,30 Minuten
Denaturierung: 96°C für 30 Sekunden
Annealing: Trim7: 58°C für 30
Sekunden, 28 Zyklen
Trim23: 53°C für 30
Sekunden, 30 Zyklen
Elongation: 72°C für 45 Sekunden
Ligatur: 72°C für 10 Minuten

Methoden

Der Erfolg der PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die analytische Auftrennung entsprechender DNA/RNA-Fragmente erfolgte mittels Agarose-Flachbrettgelen (7 x 10cm). Für die Auftrennung der DNA-Fragmente wurden 1,5%ige und für die Auftrennung RNA-Fragmente 0,8%ige Agarose-Gele genutzt. TBE (1x) diente als Lösungs- und Laufpuffer. 70ml flüssiger Agarose wurden 1,5µl Ethidiumbromid zugesetzt. Vor dem Auftragen wurden 10µl DNA-Probe oder 1µl RNA-Probe mit jeweils 5µl Ladepuffer (1x) (Anhang A1.1) versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 70V. Unter Zuhilfenahme eines UV-Transilluminators konnten die erhaltenen Bandenmuster visualisiert und fotografiert werden. Mittels mitgeführter Molekulargewichtsmarker konnte die Fragmentgröße bestimmt werden.

3.5 RNA-Sonden Herstellung

Zur Darstellung gewünschter mRNA in Embryonen im Rahmen der *in situ* Hybridisierung werden Sonden in Form einer antisense RNA benötigt.

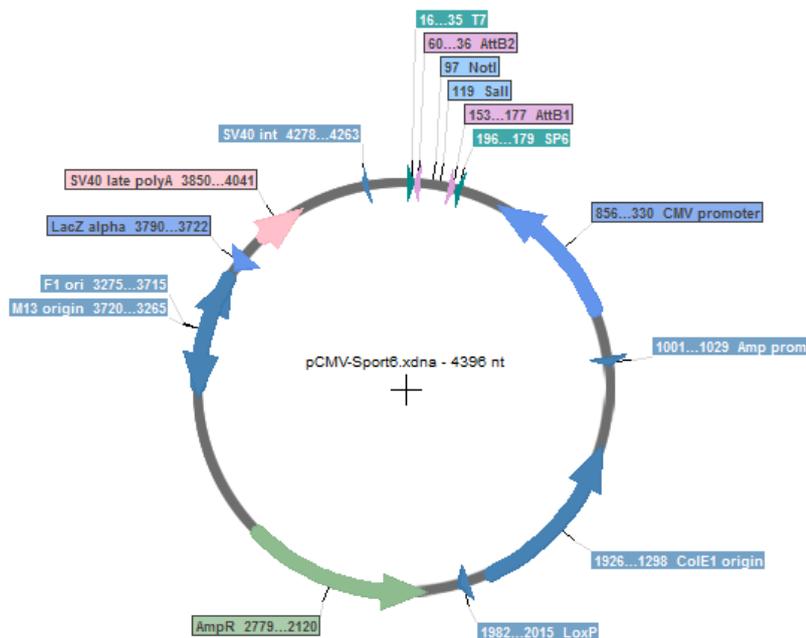


Abbildung 9 Schematische Darstellung des pCMV-Sport6 Vektors. Als Schnittstellen dienen SalI und NotI.

Methoden

Zuerst erfolgte die Linearisierung des Plasmids, welches die genspezifischen Sequenzen enthält. Schnittstellen waren SalI und NotI. Als Restriktionsenzym diente SalI. Der entsprechende Reaktionsansatz (50µl) lautete:

5µl Plasmid (1µg/µl)
2,5µl Enzyme SalI (50U)
5µl enzymespezifischer 1x Puffer
37,5µl RNase freies Wasser

Nach Inkubation des Ansatzes über Nacht bei 37°C und anschließender Plasmidaufreinigung (PCR-Purification Kit; *Qiagen*) folgte eine Kontrolle der vollständigen Aufspaltung mittels Gelelektrophorese und Bestimmung der Konzentration mittels Photometer. Die anschließende *in vitro* Transkription erfolgte mittels RNA-Polymerase T7 in Anwesenheit von Digoxigenin markiertem rUTP nach folgendem Ansatz:

1µg linearisiertes Plasmid
2µl Transkriptionspuffer (10x)
2µl Digoxigenin labeling Mix
1µl RNase Inhibitor (20U/µl; *Invitrogen*)
2µl T₇ RNA Polymerase (50U/µl)
auf 20µl RNase freies dH₂O auffüllen

Die Probe wurde bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die DNA Matritze nach Zugabe von 2µl RNase freier DNaseI (*Ambion*) bei 37°C für 30 Minuten verdaut. Danach erfolgte eine Agarosegelelektrophorese mit 1µl des Reaktionsansatzes zur Kontrolle einer erfolgreichen Transkription. Die Aufreinigung der transkribierten RNA erfolgte unter Zugabe von 33µl NaAc (7,5M), 100µl RNase freies dH₂O und 300µl EtOH (100%).

Nach Fällung bei -80°C für 1 Stunde erfolgte eine Zentrifugation (15000 rpm) bei 4°C für 10 Minuten. Anschließend folgte ein Waschschriff mit 70%igem Ethanol und eine weitere Zentrifugation (15000 rpm) der Proben bei 4°C für 5 Minuten. Das Pellet wurde luftgetrocknet und in 20µl RNase freiem Wasser unter Zugabe von 1µl RNA Inhibitor (20U/µl; *Invitrogen*) gelöst, gefolgt von der endgültigen Konzentrationsbestimmung der Auftragung von 1µl der fertigen Sonde auf ein Agarose Gel. Zum Schluss wurde die Probe in 7,5ml Hybridisierungspuffer verdünnt und bei -20°C gelagert.

3.6 Präparation der *Xenopus laevis* Embryonen

3.6.1 Herstellung Spermiesuspension aus *Xenopus laevis* testis

Unter Betäubung wurde ein *Xenopus laevis* Männchen dekapitiert und ventral aufgeschnitten. Die Testis wurden entfernt und in eiskaltes 1x MBS überführt. Im Anschluss wurden $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{5}$ des Hodens mittels Mikroschere in 1000 μ l 1x MBS maszeriert.

3.6.2 Stimulation der Eiablage und Embryonengewinn

Die Stimulation der Eiablage erfolgte 12 Stunden vor Experimentbeginn. Dafür wurde den *Xenopus laevis* Weibchen circa 600-800U humanes Gonadotropin (β HCG) in den dorsalen Lymphsack injiziert. Diese Tiere wurden bei ca. 16°C über Nacht gehalten. Die Eier wurden am nächsten Tag durch sanftes Massieren des weiblichen Rumpfes gewonnen.

3.6.3 *In vitro* Fertilisation

In einer Petrischale wurden 100 μ l der Spermiesuspension mit 900 μ l dH₂O verdünnt und sofort über das Gelege gegeben. Zur Befruchtung wurden die Eier zu einer Einzelschicht ausgebreitet und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Eier mit 0,1x MBS überschichtet und für circa 45 Minuten bei gleicher Temperatur stehen gelassen.

Danach erfolgte eine 3 minütige Behandlung mit 2% Cysteinlösung zur Entfernung der Gallerthülle. Im Anschluss wurden die Eier in 0,1x MBS drei- bis fünfmal gewaschen. Die Kultivierung der Embryonen erfolgte in 0,1x MBS bis zum gewünschten Stadium. Die Stadienbestimmung folgte dabei der Einteilung nach Nieuwkoop und Faber (NF-Stadien) (Hubrecht-Laboratorium (Embryologisch Instituut) et al., 1967). Erreichten die Embryonen das gewünschte NF-Stadium, wurden sie in 5ml Schraubdeckelglasröhrchen auf einer Wippe für eine Stunde in 1x MEMFA inkubiert und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe (25% EtOH, 50% EtOH, 75% EtOH, 100% EtOH) dehydriert. Embryonen ab NF-Stadium 15 wurden vor der Fixierung mittels Mikropinzetten aus ihrer Vitellinmembran befreit. Die Lagerung der Embryonen für die Wmish erfolgte in 100% Ethanol.

3.7 Whole mount *in situ* Hybridisierung (Wmish)

Eine weit verbreitete Methode, um die zeitliche und räumliche Expression von Genen zu analysieren, ist die *in situ* Hybridisierung. Dabei bindet eine Dig-markierte antisense-RNA-Sonde an die für sie komplementäre endogene mRNA. Mittels gekoppelter Farbreaktion wird die Expression sichtbar. Jeweils 5 *Xenopus laevis* Embryonen werden in verschließbare Röhrchen überführt.

Am ersten Tag erfolgte eine Rehydrierung der Embryonen durch eine absteigende Ethanolkonzentration (Tabelle 1).

Tabelle 1 Rehydrierungsschritte

			Dauer in Minuten	Wiederholungen auf Wippe
1	Ethanol 100%		5	1x
2	Ethanol 75%	H2O 25%	5	1x
3	Ethanol 50%	H2O 25%	5	1x
4	Ethanol 25%	PTw 75%	5	1x
5		PTw 100%	5	4x

Um die Embryonen durchlässiger für die antisense- Sonden zu machen, wurden sie bei Raumtemperatur in 1ml PTw-Puffer mit 10µg/ ml Proteinase K inkubiert. Die Behandlungszeit musste den Entwicklungsstadien angepasst werden:

NF-Stadium 0-12	1 Minute
NF-Stadium 15-24	9 Minuten
NF-Stadium 27-36	14 Minuten

Anschließend folgte ein zweimaliger Waschschrift in Triethanolamin für jeweils 5 Minuten und die Acetylierung mit Acetanhydrid zur Neutralisierung vorhandener freier Amine (Sive et al., 2000) (Tabelle 2). Danach schloss sich die Refixierung der Embryonen an (Tabelle 3). Die Waschung in PTw diente zur Entfernung möglicher Acetanhydridreste

Tabelle 2 Acetylierung der Embryonen

	Puffer	Zugabe von	Dauer in Minuten	Wiederholungen auf Wippe
1	Triethanolamin 0,1 M		5	2 x
2	Triethanolamin 0,1 M	Acetanhydrid 12,5 µl	5	1 x
3		Acetanhydrid 12,5 µl	5	1 x
4	PTw 100 %		5	2 x

Tabelle 3 Refixierung der Embryonen

	Puffer	Dauer in Minuten	Wiederholungen auf Wippe
1	PTw+ 4 % (P)FA	20	1 x
2	PTw 100 %	5	5 x

Zur Hybridisierung der Embryonen wurde die Lösung bis auf ca. 1ml PTw abgesaugt und mit 250µl Hybridisierungsmix aufgefüllt. Waren alle Embryonen abgesunken, wurde diese Lösung mit 500µl Hybridisierungsmix aufgefüllt und für 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Danach wurde der Hybridisierungsmix entfernt, das Röhrchen mit 2ml antisense Reagenz aufgefüllt und über Nacht bei 60°C inkubiert.

Der zweite Tag begann dann mit der Reinigung der Embryonen (Tabelle 4). Der Hybridisierungspuffer wurde durch SSC ausgetauscht. RNAsen wurden zur Verdauung evtl. überschüssiger RNA zugesetzt und im Anschluss mit SSC gespült. Die Lösung wurde gewechselt und das Röhrchen mit MAB aufgefüllt

Tabelle 4 Reinigung der Embryonen

	Puffer	Dauer in Minuten	Temperatur in °C	Wiederholungen auf Wippe
1	Hybridisierungspuffer	10	60	1 x
2	2 x SSC	20	60	3 x
3	2 x SSC mit RNAsen	60	37	1 x
4	2 x SSC	10	RT	1 x
5	0,2 x SSC	30	60	2 x
6	1 x MAB	15	RT	2 x

Der nächste Schritt war die Antikörperinkubation (Tabelle 5). Dabei sollte auf gleiche Verhältnisse von MAB, BMB und Horse Serum geachtet werden. Die zweimalige MAB-Spülung sorgte für die Entfernung evtl. vorhandener Antikörper- Reste.

Tabelle 5 Antikörperinkubation

	Puffer	Dauer in Minuten	Temperatur in °C	Wiederholungen auf Wippe
1	5 x MAB+ 2 % BMB	15-60	RT	1 x
2	5 x MAB+ 2 % BMB+ 20% Horse Serum	60	RT	1 x
3	5 x MAB+ 2% BMB+ 20 % Horse Serum + Ak (1/5000)	240	RT	1 x
4	1 x MAB	30	RT	2 x
5	1 x MAB	über Nacht	4	1 x

Methoden

Am Tag 3 entwickelte sich die Färbung (Tabelle 6). Die Färbelösung (APB+ NBT+ BCIP) musste regelmäßig gewechselt werden und die Proben sollten dabei vor Licht geschützt sein. War die gewünschte Signalstärke erreicht, folgte das Abstoppen mittels absteigender Methanolreihe (Tabelle 7) und die abschließende Überführung in MEMFA sowie Lagerung bei 4°C.

Tabelle 6 Färbung der Embryonen

	Puffer	Dauer	Temperatur	Wiederholungen auf Wippe
1	1 x MAB	60 min	RT	1 x
2	APB	5 min	RT	2 x
3	APB+ NBT/ BCIP	3-5 Tage	RT	1 x
4	MEMFA	15 min	RT	1 x
5	MEMFA	Übernacht	RT	1 x

Tabelle 7 Abstoppen der Färbung

		Dauer in Minuten	Wiederholungen auf Wippe
1	Methanol 100%	5	1x
2	Methanol 75%	5	1x
3	Methanol 50 %	5	1x
4	Methanol 25	5	1x

3.8 Anfertigen von Vibratomschnitten

Zur Beurteilung der Expressionsmuster der Embryonen nach der Wmish wurden mittels Vibratom 30µm Gewebeschnitte angefertigt.

Zuerst wurden die gewünschten Embryonen in Gelatin/ Albumin für 20 Minuten äquilibriert. Danach wurden 1,5ml Gelatin/Albumin-Einbettungsmedium in einem Wägeschälchen auf Eis mit 105µl 25% Glutaraldehyd-Lösung vermischt und möglichst luftblasenfrei in eine Kunststoffform gegossen. War dieser Sockel ausgehärtet, konnten die zuvor äquilibrierten Embryonen ausgerichtet und überschüssige Flüssigkeit entfernt werden. Danach erfolgte eine Überschichtung der Embryonen mit 1,5ml Einbettungsmedium vermischt mit 105µl 25%iger Glutaraldehyd-Lösung. Der verfestigte Block wurde aus der Kunststoffform gelöst und unter einem Stereomikroskop mittels Rasierklingen trapezförmig geschnitten. Anschließend wurde der Embryo mit Sekundenkleber in gewünschter Orientierung auf einem Metallträger fixiert. Dieser Träger wurde in das Vibratom eingespannt und unter Wasser gesetzt. Dann wurden 30µm dicke Schnitte angefertigt und mit einem Pinsel auf einen mit Tween benetzten

Methoden

Objektträger gestrichen. Nach kurzem Antrocknen konnten die Schnitte mit Mowiol-Lösung überschichtet und mikroskopiert werden.

3.9 Erstellen des Aminosäuresequenzvergleiches

Mittels *NCBI* wurden die gewünschten Proteinsequenzen der Vertebraten im FASTA Format in *Clustal Omega Multiple Sequenz Alignment* eingefügt (Díaz et al., 2014; Kim and Joo, 2010; Larkin et al., 2007; Sievers et al., 2011). Die Bezugssequenz *Xenopus laevis* musste der Beginn sein. Das Programm erstellte den Sequenzvergleich und ermittelte die Homologie der einzelnen Organismen in Prozent Identität. Nachträglich wurden gleiche Aminosäuren grau hinterlegt, sowie die Domänen mittels *NCBI* graphisch dargestellt. Waren mehrere Isoformen vorhanden, wurde diejenige mit der längsten vollständigen Aminosäuresequenz abgebildet.

3.10 Syntenie

Mit Hilfe der online-Software *Metazome* des *Joint Genome Institute, Unites States Departement of Energy*, wurde eine Übersicht des Stammbaumes erstellt. Die aus *NCBI* erhaltene mRNA FASTA-Sequenz des Trim7 und Trim23 wurde mittels *Xenbase blast* mit dem *Xenopus laevis* Genom 7.1 geblastet (Karpinka et al., 2015; Segerdell et al., 2013). Dargestellt wurde die Sequenz mit der stärksten Übereinstimmung. Die einzelnen Sequenzabschnitte wurden mittels *NCBI Blast*[®] innerhalb der gewünschten Organismen (*Homo sapiens*, *Mus Musculus*, *Monodelphis domestica*, *Gallus gallus*) geblastet. Zur graphischen Darstellung kamen die benachbarten Sequenzen. Mittels *Genedetails* konnten eventuelle Gemeinsamkeiten zwischen den Organismen untersucht, sowie die Richtung des Leserahmens festgestellt werden.

3.11 Phylogenetischer Stammbaum

Mittels phylogenetischen Stammbaumes lassen sich verwandtschaftliche Beziehungen einzelner Organismen untersuchen. Zur Erstellung dessen diente die online Software *phylogenie.fr* (Dereeper et al., 2008, 2010). In diese wurden die zuvor über *NCBI* ermittelten Sequenzen des Trim7 und Trim23 diverser Organismen eingepflegt.

4 Ergebnisse

4.1 Phylogenetische Einordnung und Aminosäuresequenzvergleich des Trim23 und Trim7

Zur Beurteilung der evolutionären Beziehung sowie des Konservierungsgrades der Aminosäuresequenzen von Trim23 und Trim7 wurde eine phylogenetische Analyse durchgeführt. Als Grundlage dienten die Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies, welche über die Datenbank des *NCBI* ermittelt wurden (vgl. Methoden 3.9). Mittels der online-Software *Clustal Omega* konnte ein *Sequenzalignment* durchgeführt werden, welches den Vergleich der Sequenzen diverser Spezies mit der entsprechenden des *Xenopus laevis* ermöglichte (Abb. 11, 13) (Goujon et al., 2010; Li et al., 2015; McWilliam et al., 2013; Sievers et al., 2011).

Die Erstellung der phylogenetischen Stammbäume erfolgte mittels der Online Datenbank *phylogene.fr* (Dereeper et al., 2008). Die analysierten Daten basieren auf den Proteinsequenzen der dargestellten Arten. Mittels Verbindungslinien sind die Verwandtschaftsbeziehungen dargestellt. Schwesterngruppen sind direkt benachbart (Abb. 10, 12). Der jeweils dargestellte Maßstab gibt die Mutationen pro Position an und gilt daher als Maß für die Mutationsrate.

4.1.1 Phylogenetische Betrachtung und Aminosäuresequenzanalyse des Trim23

Die Darstellung des phylogenetischen Stammbaumes für Trim23 zeigt eine starke Konsistenz (0,3 Mutationen pro Position) dieses Proteins innerhalb der Entwicklung (Abb. 10). Geringe Abstände zwischen den einzelnen Knoten bzw. Schwesterngruppen des *Xenopus laevis* und den Vertretern der Vertebraten sprechen ebenfalls für eine hohe Ähnlichkeit der einzelnen Sequenzen. Entfernte Beziehungen bestehen zu den Wirbellosen bzw. Vertretern der Fische. Diese Beobachtungen werden in der Aminosäuresequenzanalyse (Abb. 11) verdeutlicht. Es besteht eine fast 90%ige Ähnlichkeit zwischen Trim23 des *Xenopus laevis* und den dargestellten Vertebraten. Eine Konservierung von ca. 90 % gab es zwischen *Xenopus* und Maus, dicht gefolgt vom Menschen mit 88% und Beuteltier mit 85%. Auch die Aminosäuresequenz des Haushuhnes zeigte nur geringe Unterschiede. Trotz der phylogenetisch gesehen nur entfernten Verwandtschaftsbeziehung zwischen *Xenopus* und *Danio rerio* als Vertreter der Fische zeigten beide Sequenzen im Vergleich eine ca. 85%ige Übereinstimmung (Abb. 11).

Ergebnisse

Insgesamt weisen alle Sequenzen eine starke Homologie auf. Die stärkste Ähnlichkeit besteht innerhalb der Domänen. Die TRIM-Familie definierenden Domänen Ring-Finger und B-Box befinden sich zu Beginn des Proteins, während sich die Trim23 charakterisierende ARD1-Domäne am Ende befindet (Abb. 11).

In Zusammenschau der Ergebnisse der phylogenetischen Analyse sowie des Aminosäuresequenzvergleiches liegt eine starke Konservierung des Trim23 innerhalb der Evolution vor.

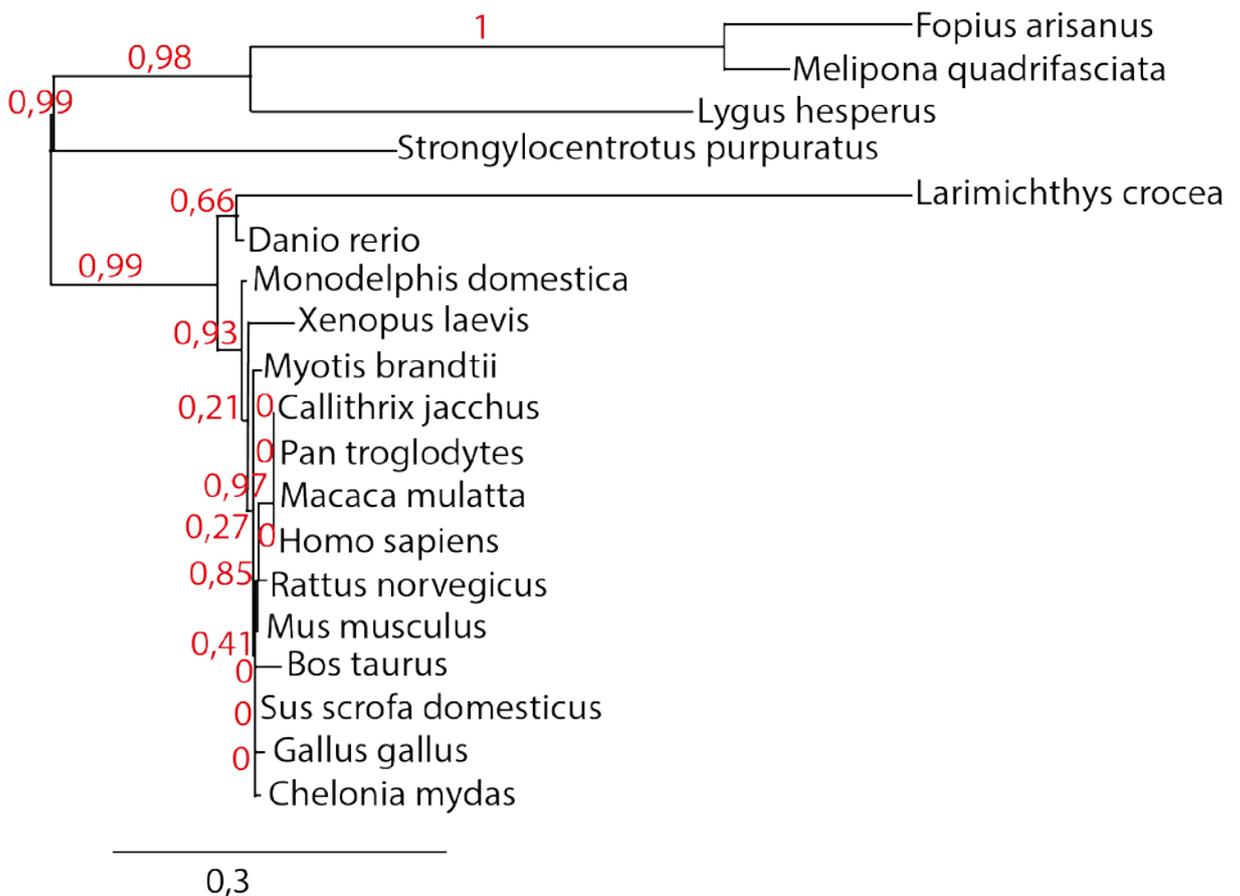


Abbildung 10 Phylogenetischer Stammbaum Trim23: Der Stammbaum basiert auf der Sequenzanalyse des Trim23 der abgebildeten Arten mittels der Online Datenbank phylogene.fr (Dereeper et al., 2008). Verbindungslinien zwischen den Arten stellen die Verwandtschaftsgrade dar. Der Maßstab gibt die Mutationen pro Position an und gilt daher als Maß für die Mutationsrate. Insgesamt zeigen sich starke verwandtschaftliche Beziehungen zwischen *Xenopus laevis* und den restlichen Vertretern der Vertebraten, besonders den Säugetieren. Entferntere Beziehungen bestehen zu den Vertretern der Fische, bzw. den Wirbellosen.

Ergebnisse

```

xl -----MR----- 2
hs ----- 0
mm ----- 35
md -----MRKATPTQRPSVSLPHTPLTEGWAELRVATFL-----RL 115
gg MVRPRDLAAATREEVVKHSAGGAGTSEPGNSCSRYPASDTATARETTAFTGRACGALRRRTVASRALLGRRLGCVVLEGSFRQSRGARRELQ-----FFAVWSEEACAVLLLPQRS 115
dr ----- 0

xl -----MRN-----E-AERANSEFQGAHAQR-----RRQGLFSLPRKTKGPI-LPTKVLVCGVCEDI FSLQGDKVPRLLLCGHTVCHDCLTRPLPHGRAIRC PFDFQATELEDSDSGVWGLKKN 106
hs -----MATLVVNKLGAGVDSGRQGS-----RGTAVVIVLECGVCEDEVFSLQGDKVPRLLLCGHTVCHDCLTRPLPHGRAIRC PFDFQVTDLSDSGVWGLKKN 92
mm -----MFLFYIQVLECGVCEDEVFSLQGDKVPRLLLCGHTVCHDCLTRPLPHGRAIRC PFDFQVTDLSDSGVWGLKKN 72
md CRRTHKWRVRLRLSVGGSCAVAVMAALLVNK--AVPGFENGKLGTRGVPV--AVKVLVCGVCEDEVFSLQGDKVPRLLLCGHTVCHDCLTRPLPHGRAIRC PFDFQVTDLSDSGVWGLKKN 152
gg ACAHWDRRCFVDFPLCS---APSKMAALVVKAGAVPDSRSGASNSRGETGAAVKVLVCGVCEDEVFSLQGDKVPRLLLCGHTVCHDCLTRPLPHGRAIRC PFDFQVTDLSDSGVWGLKKN 233
dr ----- 0

xl FALLELLERLQNGASSQCSTVEEAIGSS-----ESIVRCDEDEAHMASVYCTVCATHL-CADCSLHTSTKT LAKHRRVPLADKHEKTCMQHQVHAIEFVCLDEGQQTSPMLMCCVCKEYGHKQ 226
hs FALLELLERLQNGPIGQYGAAEESIGIS-----ESIIRCDEDEAHMASVYCTVCATHL-CSECSQVTHSTKT LAKHRRVPLADKHEKTCMQHQVHAIEFVCLDEGQQTSPMLMCCVCKEYGHKQ 212
mm FALLELLERLQNGHIGYGAAEESIGIS-----ESIIRCDEDEAHMASVYCTVCATHL-CSECSQVTHSTKT LAKHRRVPLADKHEKTCMQHQVHAIEFVCLDEGQQTSPMLMCCVCKEYGHKQ 192
md FALLELLERLQNGPFGYGTTEEAIVGLM-----ESIVRCDEDETHVASMYCTVCATHL-CACCSQVTHSTKT LAKHRRVPLADKHEKTCMQHQVHAIEFVCLDEGQQTSPMLMCCVCKEYGHKQ 272
gg FALLELLERLQNGPFGYGTTEEAIVGLM-----ESIIRCDEDETHVASMYCTVCATHL-CADCSLHTSTKT LAKHRRVPLADKHEKTCMQHQVHAIEFVCLDEGQQTSPMLMCCVCKEYGHKQ 353
dr -----MRM-RLTLPCTARFVLRIG-----VFSVES SPTF-----FEHWQSTGVCLDEGQGFGLMCCVCKEYGHKQ 61

xl GHKHAVLEPEANCIIRASILDMAHCIRTFTEEI SEYSRKLVGIVQHIIEGGEQIVEDGIGMAHTEHVPGTAEANARSCVRAYFSDLHETLCRQEEMALSVDVAHVREKLIWLRQQQEDMTI LLS 347
hs GHKHSVLEPEANCIIRASILDMAHCIRTFTEEI SDYSRKLVGIVQHIIEGGEQIVEDGIGMAHTEHVPGTAEANARSCIRAYFYDLHETLCRQEEMALSVDVAHVREKLIWLRQQQEDMTI LLS 333
mm GHKHSVLEPEANCIIRASILDMAHCIRTFTEEI SDYSRKLVGIVQHIIEGGEQIVEDGIGMAHTEHVPGTAEANARSCVRAYFSDLHETLCRQEEMALSVDVAHVREKLIWLRQQQEDMTI LLS 313
md GHKHSVLEPEANCIIRASILDMAHCIRTFTEEI SDYSRKLVAIVQHIIEGGEQIVEDGIGMAHTEHVPGTAEANARSCVRAYFSDLHETLCRQEEMALSVDVAHVREKLIWLRQQQEDMTI LLS 393
gg GHKHSVLEPEANCIIRASILDMAHCIRTFTEEI SDYSRKLVGIVQHIIEGGEQIVEDGIGMAHTEHVPGTAEANARSCVRAYFSDLHETLCRQEEMALSVDVAHVREKLIWLRQQQEDMTI LLS 474
dr GHKHAVLEPEANCIIRASILDMAHCIRTFTEEI SEYSRKLVGIVQHIIEGGEQIVEDGIGMAHTEHVPGTAEANARSCVRAYFADLHETLCRQEEMALSVDVAHVREKLIWLRQQQEDMTI LLS 182

xl EVSTACLHCEKALQDDCRVVLAKQEITRLETLQKQQQFTE LADHIQLDASIPVTFTKDNRVHIGPKMEIRVVTLGLDGAGKTTILFKLKQDEFMQPIPTIGFNVEIVEYKLNKFTIWD 468
hs EVSACLHCEKTLQDDCRVVLAKQEITRLETLQKQQQFTE VADHIQLDASIPVTFTKDNRVHIGPKMEIRVVTLGLDGAGKTTILFKLKQDEFMQPIPTIGFNVEIVEYKLNKFTIWD 454
mm QVSTACLHCEKTLQDDCRVVLAKQEITRLETLQKQQQFTE VADHIQLDASIPVTFTKDNRVHIGPKMEIRVVTLGLDGAGKTTILFKLKQDEFMQPIPTIGFNVEIVEYKLNKFTIWD 434
md QVSTACLHCEKTLQDDCRVVLAKQEITRLETLQKQQQFTE VADHIQLDASIPVTFTKDNRVHIGPKMEIRVVTLGLDGAGKTTILFKLKQDEFMQPIPTIGFNVEIVEYKLNKFTIWD 514
gg QVSTACLHCEKTLQDDCRVVLAKQEITRLETLQKQQQFTE LADHVQLDASIPVTFTKDNRVHIGPKMEIRVVTLGLDGAGKTTILFKLKQDEFMQPIPTIGFNVEIVEYKLNKFTIWD 595
dr QVSTACLHCEKTLQDDCRVVLAKQEINRLETLQKQQQFTE LADHIQLDASIPVTFTKDNRVHIGPKMEIRVVTLGLDGAGKTTILFKLKQDEFMQPIPTIGFNVEIVEYKLNKFTIWD 303

xl VGGKHKLRLPWKHYLNTQAVVVIDSSHRDRVSEAHSELAKL LTEKELRDALLIFANKQDVIGSLSVEEMTELLSLHKLCCGRSWSYIQCDA RSGMGLYEGLDWL SRQLVAAGLDVA 588
hs VGGKHKLRLPWKHYLNTQAVVVIDSSHRDRVSEAHSELAKL LTEKELRDALLIFANKQDVAGALSVEEIT ELLSLHKLCCGRSWSYIQCDA RSGMGLYEGLDWL SRQLVAAGLDVA 574
mm VGGKHKLRLPWKHYLNTQAVVVIDSSHRDRVSEAHSELAKL LTEKELRDALLIFANKQDVAGALSVEEIT ELLSLHKLCCGRSWSYIQCDA RSGMGLYEGLDWL SRQLVAAGLDVA 554
md VGGKHKLRLPWKHYLNTQAVVVIDSSHRDRVSEAHSELAKL LTEKELRDALLIFANKQDVAGALSVEEIT ELLSLHKLCCGRSWSYIQCDA RSGMGLYEGLDWL SRQLVAAGLDVA 634
gg VGGKHKLRLPWKHYLNTQAVVVIDSSHRDRVSEAHSELAKL LTEKELRDALLIFANKQDVAGALSVEEIT ELLSLHKLCCGRSWSYIQCDA RSGMGLYEGLDWL SRQLVAAGLDVA 715
dr VGGKHKLRLPWKHYLNTQAVVVIDSSHRDRVSEAHSELAKL LTEKELRDALLIFANKQDVGAVSVEEMTELLSLHKLCCGRSWSYIQCDA RSGMGLYEGLDWL SRQLVAAGLDVA 423

xl 588 100.00%
hs 574 88.22%
mm 554 90.96%
md 634 86.35%
gg 715 86.84%
dr 423 84.83%

```

Abbildung 11 Sequenzvergleiche des Trim23 (Larkin et al., 2007): Zwischen *Xenopus* und anderen Vertebraten besteht eine Homologie von ca. 90%. Identische Aminosäuren sind grau unterlegt, fehlende Aminosäuren sind durch Striche markiert. Die Domänen sind wie folgt markiert: gelber Kasten: Ringfinger, rote Kasten: Zinkfinger B-Box; blauer Kasten: B-Box C-terminale-Domäne (coiled coil Region), grüner Kasten: ARD1; xl- *Xenopus laevis*, hs- *Homo sapiens*; mm- *Mus musculus*, md- *Monodelphis domestica*, gg- *Gallus gallus*, dr- *Danio rerio*.

4.1.2 Phylogenetische Betrachtung und Aminosäuresequenzanalyse des Trim7

Im Gegensatz zu Trim23 stellt sich der phylogenetische Stammbaum des Trim7 weit verzweigt dar (Abb. 12). Die Mutationen pro Position entsprechen 0,6 und stellen fast das Doppelte zu Trim23 dar. Deutlich ersichtlich ist die frühe Abspaltung der Familie der Amphibien. Daraus resultierend bilden die Mammalia einen eigenen phylogenetischen Baum aus. Selbst das Haushuhn (*Gallus gallus*) als Vertreter der *Avies* weist eine frühe Abspaltung und damit evolutionär gesehen kaum verwandtschaftliche Beziehungen zu *Xenopus laevis* auf.

Trim7 zeigt im direkten Vergleich zu Trim23 größere verwandtschaftliche Beziehungen zu den Fischen. Ähnliches zeigt die Sequenzvergleichsanalyse (Abb. 13). Die Sequenz des *Xenopus laevis* weist mit 29% die stärkste Ähnlichkeit zum großen Gelbfisch (*Larimichthys crocea*) auf. Trotz phylogenetisch gezeigter entfernter Verwandtschaft, weist die Sequenz des Menschen mit

Ergebnisse

29 % die größte Übereinstimmung auf. Die weiteren Vertreter der Vertebraten folgen direkt auf. Die geringste Ähnlichkeit besteht zum Haushuhn mit 27%.

Insgesamt weisen die Motive der TRIM-Familie (Ring-Finger, B-Box, cc-Region), sowie die Trim7 charakterisierende PRY/SPRY Domäne eine vergleichsweise hohe Konservierung auf (Abb. 13).

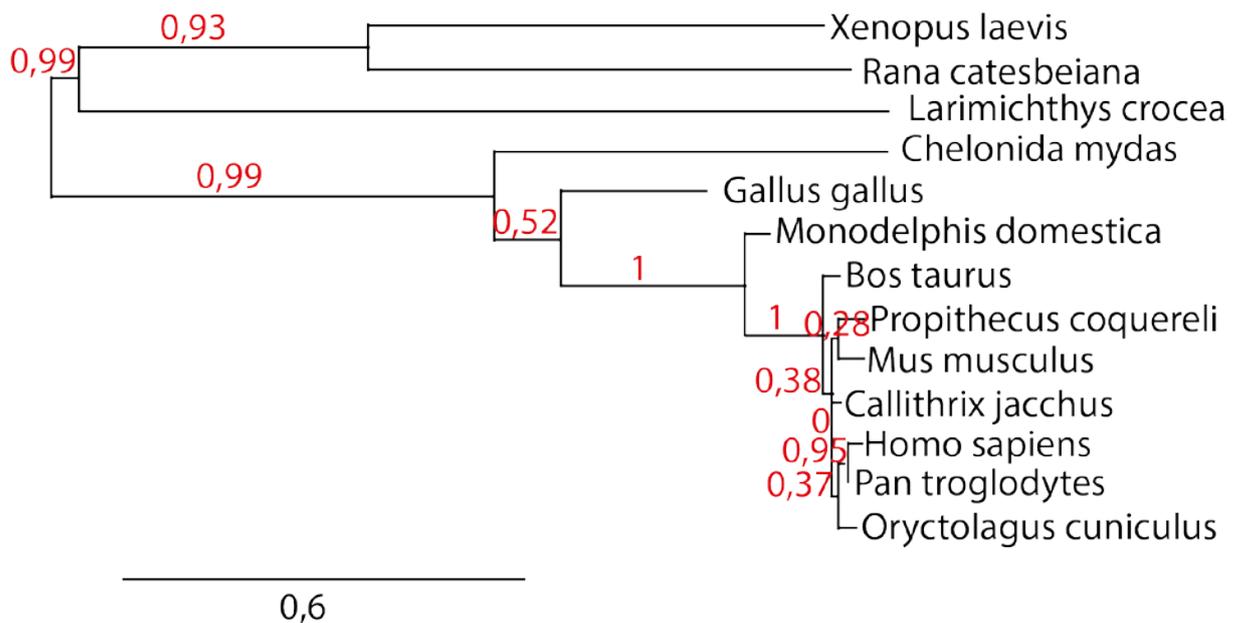


Abbildung 12 Phylogenetischer Stammbaum Trim7: Der Stammbaum basiert auf der Sequenzanalyse des Trim7 der abgebildeten Arten mittels der Online-Datenbank phylogene.fr (Dereeper et al., 2008). Verbindungslinien zwischen den Arten stellen die Verwandtschaftsgrade dar. Der Maßstab gibt die Mutationen pro Position an und gilt daher als Maß für die Mutationsrate. Die entfernten verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen Xenopus laevis und den Mammalia wird deutlich. Letztere bilden einen eigenen phylogenetischen Stammbaum.

Ergebnisse

```

xl -----MKQ-----EGIIQTKP 11
hs -----MAAVGPR-----TGP 10
mm -----MATVGPR-----TGP 10
md -----MAAVGPR-----SGE 10
gg MGEKDKCEAKRFPPLAHLPHCTCGCCDDPSAVLNAGRAVREDAPILHLCSERKQLLSVCSMMKANGESNSQVSEVFTSLRKPDTAVGSFLERERFWGRVPSIHALPPAVPVSVLARR 120
lc ----- 0

xl SYGM---ASADLRELDLCSICLSIYTEFVMLPCGHNFCQGCIVKVLLETQE-----GSGGYTQPECREEYERPALHRRNWTLGNIAE---KCSLA-----QPPEPKTEILCTYC- 108
hs GTGAEALALAEELQGEATCSICLELFREFPVSVCEGHSFCRACIGRCWERPAGSVGAATRAPPFPLPCPQCREPAPRSQ-LRPNRQLAAVATLLRRFSLP-----AAAPGE----- 115
mm NAGAEALALAEELQGEATCSICLELFREFPVSVCEGHSFCRACIMRCWERPAGAT-STATRTLPCPLPCPQCREPAPRSQ-LRPNRQLAAVASLLRRFSLP-----PTAPGE----- 114
md SAGAEALALAEELHGEATCSICLELPQDPVSI ECGHSFCRSC IARCWERP GIPV-----SAPRALPCPQCREPAPRSQ-LRPNRQLAGVASLLRRYSLS-----PSGDGD----- 110
gg REAMAAVFLPNGLQDEATCSVCELEFPKDPVSI ECGHNFCRACIVKSWKD-----LEMDFPQCQREVPQQKS-LRPNRQLANMSEIISQFALR-----GAKGAE----- 213
lc ---MSFSKQEQQLVYLSCPICLQLVLDPVVLP CGHNYCRACIWKTSDTNQN-----DKTLPCCECREEYHGVELLQKNFLSSIIEGFRATVLQLEGHPPEAEARAVVFCDDQCI 108

xl DSPVPAVKSCLQCEETSLCNGHLQKHNSV---QHTLTETCSFMQRGSHSEIFRYHCCEDSVVICVSCCLAGEHRGHRVELSSEAERKKEKLGKRVLEKLTLEREAEAEV-----Q 219
hs -----HGSQAAAAAARARCGQHGEPFKLYCQDDGRAICVVC DRAREHREHAVLPIDEAVQBAKELLESRLRVLKKELEDCEVFRS---TEK 199
mm -----RGTPAVPARAARARCSQHGEPLKLYCQDDGRAICVVC DRAREHREHAVLPIDEAVQBAKELLESRLRVLKKELEDCEVFRS---TEE 198
md -----GEG---AGSLYSGCVQHGEPLKLYCQDDGRAICVVC DRAREHREHAVLPIDEAVQBAKELLESRLGALKKELEEFDFKS---MEE 190
gg -----EGLGVKHRREALKLYCKDRRSICVVC DRSRKRRPHAVLPIDEAVQBAKELLESRLGALKKELEEFDFKS---NDD 287
lc DEQSVAVKTCCLKCEVSLCSRHFQHQDKESFKGHTMVEELNELGFKACANHRRPLEYFCSDDMTLTCATCFRGGHQNHDVLTAVVAEEMRRALESRTKRAVSCRLQMTETLLQKTAEQ 228

xl GLQEDLREKAAGETERVTVLFRDIRRWVDSLEKQMLDVLRSRQEKLSRDLCDVIONLEIKQDELSKIRHIEELCNMADPLVVLQERESHGAAPCGAEAAADTKVPSVRDLDKGLI--- 335
hs KESKELLKQMAAEQKRVGAEPQALRAFLVEQGRLLGRLEELSRVAQKQENLAQLGVEITQLSKLSSQIQETAQKP-DLDPLQEFKSTL-SRCSNVP-G-PKPTTYSSEMKNKVVNVS 315
mm RESKELLKQMAAEKRVGAEPQALRAFLVEQGRLLSRLEVLRSREVTQKQENLAQLGVEITQLSKLSSQIQETAQKP-DLDPLQEFKSTL-SKCSNVP-S-SKPTTYSSEMKNKVVNVS 314
md KESRELLKQVTVREKRVGAEPQALRAFLMEQESRLVGRLEELAREVTQRQENLNQVSEISLCLKTTEMEETSHKP-DLDPLQEFKNTL-GRCDNVP-G-PKPAVSSEMKRKNWNIS 306
gg KNTQELKTIETERQKLLVEEGLRQFLHDQEHLLGQLDRMEKSTAKRQENITDLSKETLLNKLITELLEKIQQP-VLEFLKDVMSI I-SRSDVKG-C-QKPVVCTDMRKHVNTS 403
lc GASEAIGDKLVN---KALTYLMDNMAALVDRYRELRHLVLEEEERGQRKRSWGLSALAEQQHQLLEAQHSATEALNEADPCTFIQRFLVLEHKLREVVTSGI PSKIPSKT PLSKRLQTG 345

xl -SDTLVIGLAEIMR-EVRRARV-----YGQEA-----KVVLDISTAGQFVSQNRK-TASESDIALY PDSDFRFRKYNQVLCNRSFSGCHYWEVEGSTLGD 425
hs LKTFVLKGLMKKFKEDLQGELEKEEK-----VELTLDPDTANPRLILSLDLKGVRLGERAQDLENHPCRFDTNTRVLASCQFSGRHHWEVEVGSKDG 408
mm LKS FVLKGLMKKFKEDLQGELEKEEK-----VELTLDPDTANPRLILSLDLKSVRLGQRAQDLENHPRRFDTNTRVLASCQFSGRHHWEVEVGSKDG 407
md LKTFVLKGLMKKFKEDLQGELEKEEKDRSLYQAHWGGETEERKKGPCPWRAPVVELTLDPDTANPRLILSLDLKSVRLGPRQDLEPNRRRFDTNTRVLASCQFSGRHHWEVEVGSADG 426
gg LRTVVLKGLMKKFKED-----LTLDPDSANHLILSLADLKSVRMGCRKQELPDNRRRFDTNTRVLATTGFSGRHYWEVEVGSADG 484
lc LRTQD-----F---RTEMVR-----LLDSFHILNPLIETFLNLTCAHPVLVSNLRTVKYSPKQYAEHPERFTSAPQVLCNQCFSGCHIWWVEVGTSSM 435

xl WDIGVAYPSIKRDGKESGIGNMHSWLSLCKCADIFYISHNFSEIPVSE---SCHRYRISLDY EAGLLSFYELSKPARHLYTFTASFT EPLHVFVYVGDQ---WVRICK-- 528 100.00%
hs WAFGVARESVRRKGLTP-FTPEEGVWALQLNGGQYWAVTSPERSPLSC--GHLSRVRVALDLEVGAVSFYAVE-DMRHLYTFRVNFQERVFPFLFVCSST---TYLRIWP-- 511 29.32%
mm WAFGVARESVRRKGLTP-FTPEEGVWAMQLNNGGQYWAVTSPERTQLNC--GHLSRVRVALDLEVGAVSFYAVE-DMRHLYTFRVNFQERVFPFLFVCSST---TYLRIWP-- 510 28.48%
md WAFGVARESVRRKGLTP-FTPEEGVWALQLNGGQYWAVTSPERTLSPE--GGRLARVRVALDLEAGAVSFYAAE-DMRHLYTFRVAFRERVFPFLFVCSST---TYLRIWP-- 530 28.84%
gg WAFGVARESVRRKGLTQ-FSPEEGIWAVQNGGRYWAVTSPQRTPLCL-GGKLSKVRVLDYEGEVSFYNAE-NMQHIPTFNVAERKVFPLFVCSST---TYLKLCS-- 588 26.96%
lc WSVGACHKSI PRRGDHSRLGHNSVSWRLQWKNGLTVCQSSCNVALEMI TQPLRIEIALDY EAGTLTFHSTKGRREHLHTRAVRFRFVYPAES IHSNTPESWTLHRGM 546 29.84%

```

Abbildung 13 Sequenzvergleich Trim7 (Larkin et al., 2007): Zwischen *Xenopus* und anderen Vertebraten besteht eine Homologie von max. 33%. Die meisten Übereinstimmungen und damit die stärkste Konservierung finden sich in den Zinkfinger- und B-Box- Domänen. Identische Aminosäuren sind grau unterlegt, fehlende Aminosäuren sind durch Striche markiert. Die Domänen sind wie folgt markiert: *gelber Kasten: Zinkfinger, roter Kasten: B-Box; grüner Kasten: B-Box C-terminales Ende (coiled coil Region); blauer Kasten: PRY-Domäne, lila Kasten: SPRY-Domäne*; xl- *Xenopus laevis*, hs- *Homo sapiens*, mm- *Mus musculus*, md-*Monodelphis domestica*, gg- *Gallus gallus*, lc- *Larimichthys crocea*, Id- Identität.

4.2 Syntenieanalyse

Die Syntenie beschreibt sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede in der Anordnung der Gene (farbige Pfeile) auf einem Chromosom zwischen verschiedenen Arten (Abb. 14, 15). Die Pfeilrichtung gibt die Richtung des Leserahmens an.

4.2.1 Syntenieanalyse des *trim23*

Die Syntenie (Abb. 14) ist zwischen den einzelnen Organismen identisch. Bis auf das Haushuhn wird das *trim23* Gen (schwarzer Pfeil) von gleichen Genen mit identischem Leserahmen (Pfeilrichtung) flankiert. Somit kann von einem hoch konservierten Gencluster gesprochen werden.

Ergebnisse

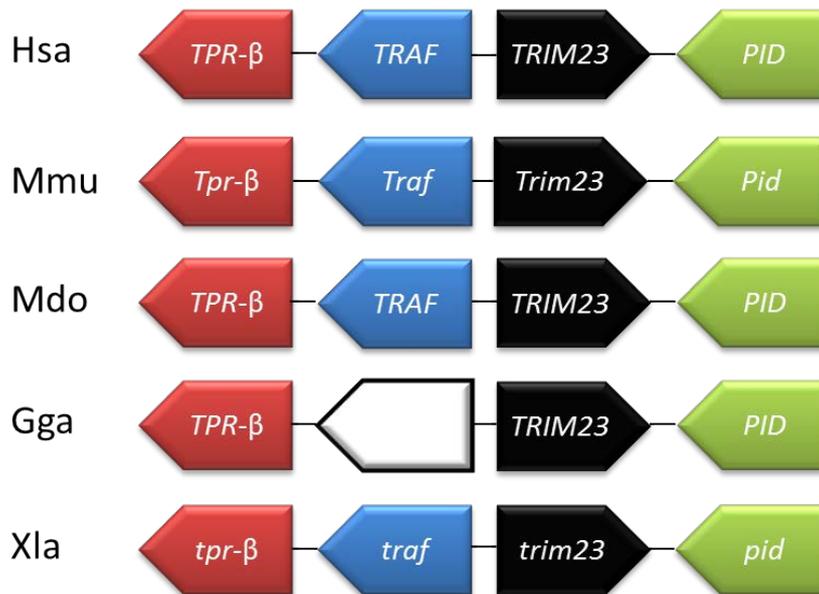


Abbildung 14 Syntenie für *trim23* (Karpinka et al., 2015; Pruitt et al., 2014): Jeder Pfeil entspricht einem Gen. Dessen Farbe beschreibt die Identität, wobei gleiche Farben für gleiche Gene steht. Die Richtung der Pfeile entspricht der Richtung des Leserahmens. *trim23* wird, außer in *Gallus gallus*, in allen hier gezeigten Organismen von gleichen Genen flankiert. Diese stimmen in Leserichtung und Identität überein. Hsa- *Homo sapiens*, Mdo- *Monodelphis domestica*, Gga- *Gallus gallus*, Xla- *Xenopus laevis*; Pfeile: schwarz: *trim23*, rot: small glutamine rich tetratricopeptide repeat (TPR)- containing, beta, blau: trafficking protein particle complex (TRAF), grün: peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat containing protein 1 (PID), weiß- uncharacterized protein

4.2.2 Syntenieanalyse des *trim7*

Der direkte Vergleich zwischen *Xenopus laevis* und den aufgezeigten Vertebraten (Abb. 15) zeigt lediglich eine Übereinstimmung des *trim7* Gens (schwarzer Pfeil) rechts flankierenden *raf-1*-Protoonkogen (blauer Pfeil). Im Beuteltier und im Haushuhn wird das *TRIM7*-Gen links vom *TRIM25*-Gen flankiert. Mensch und Maus zeigen sowohl im links von *TRIM7*-Gen lokalisierten *TRIM27*-Gen (grüner Pfeil) als auch im *RAF-1*-Protoonkogen folgenden *NEDD4*-Gen (oranger Pfeil) Gemeinsamkeiten. *TRIM27* und *NEDD4* sind Gene der E3 Ligasen, wobei das *Trim27*-Gen in der Maus eine entgegengesetzte Leserichtung aufweist. Es wird ersichtlich, dass das *TRIM7*-Gen im Menschen in entgegengesetzter Richtung abgelesen wird. Alle weiteren aufgeführten Gene zeigten keine Übereinstimmungen. Insgesamt kann nicht von einer Konservierung gesprochen werden.

Ergebnisse

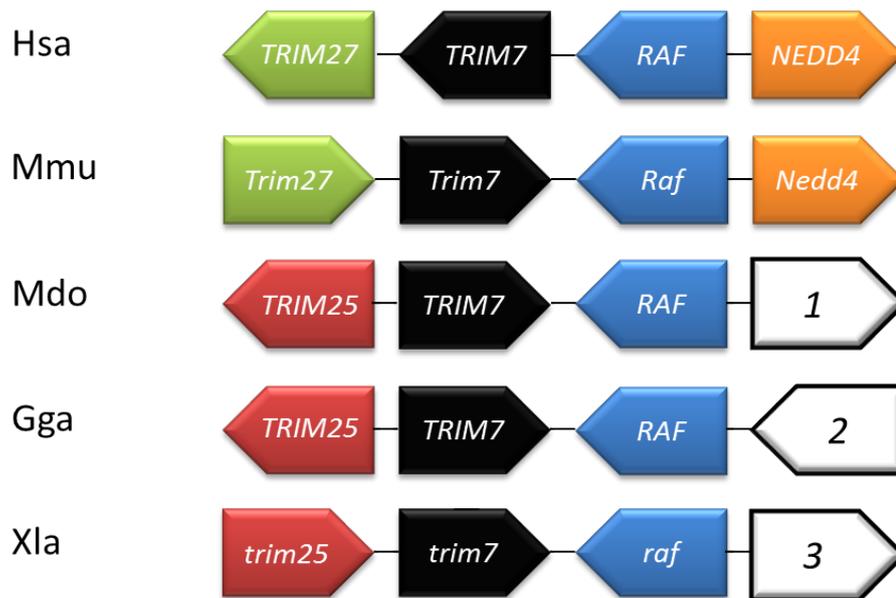


Abbildung 15 Syntenie für trim7 (Karpinka et al., 2015; Pruitt et al., 2014): Jeder Pfeil entspricht einem Gen. Dessen Farbe beschreibt die Identität, wobei gleiche Farben für gleiche Gene steht. Die Richtung der Pfeile entspricht der Richtung des Leserahmens. In jedem Organismus ist Trim7 enthalten. Rechts wird es jeweils vom gleichen Gen (blau) flankiert. Alle anderen hier aufgeführten Gene weisen im Bezug zu *Xenopus laevis* keine Übereinstimmungen auf. Hsa- *Homo sapiens*, Mmu- *Mus musculus*, Mdo- *Monodelphis domestica*, Gga- *Gallus gallus*, Xla- *Xenopus laevis*. Pfeile: schwarz- *trim7*, blau- *RAF1* protoonkogen; serinin/ threonin protein kinase, rot- PREDICTED: E3 ubiquitin/ISG15 ligase Trim25, grün- Trim27, orange- PREDICTED: E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4-like, weiß 1-PREDICTED: methyltransferase-like protein 12, mitochondrial isoform X1, weiß 2- PREDICTED: leucine-rich repeat and WD repeat-containing protein KIAA1239, weiß 3- KH and NYN domain containing

4.3 Darstellung der räumlichen Expression

Mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung konnte ein räumliches und zeitliches Expressionsmuster des Trim23 und Trim7 in *Xenopus laevis* Embryonen nachgewiesen werden. Zur detaillierten Betrachtung der einzelnen Entwicklungsstadien erfolgte die Anfertigung von Vibratonschnitten der NF-Stadien 12, 24, 33 und 36.

4.3.1 Darstellung der räumlichen Expression ganzer Embryonen des Trim23

Schon im NF-Stadium 0 weist der animale Pol Transkripte auf (Abb. 16). Mit fortschreitender Entwicklung breitet sich das Signal über den gesamten Embryo aus, um mit dem Beginn der Invagination innerhalb der Gastrulation (NF-Stadium 12) wieder zu verschwinden (Abb. 17).

Ergebnisse

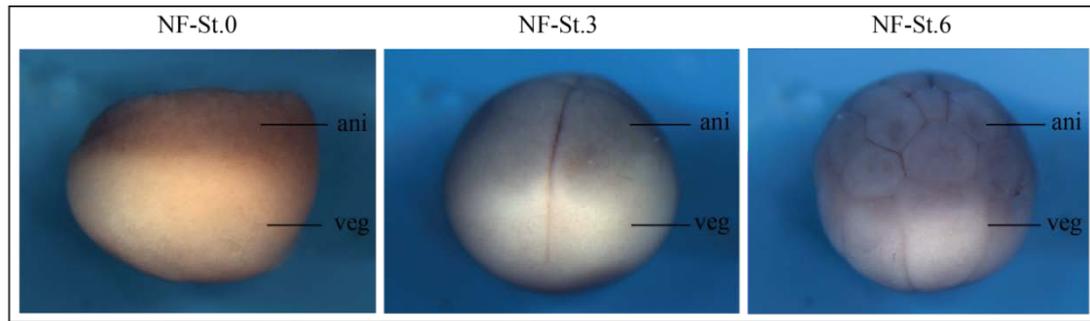


Abbildung 16 Expression Trim23 in NF-Stadien 0-6: Wmish der Embryonalstadien 0-6 des *Xenopus laevis* mittels Dig-markierten RNA-Sonden gegen Trim23. Ansicht der Embryonen von lateral. Erste Transkripte des Trim23 können im animalen Pol des Embryos ab NF-Stadium 0 nachgewiesen werden. ani- animaler Pol, veg- vegetaler Pol

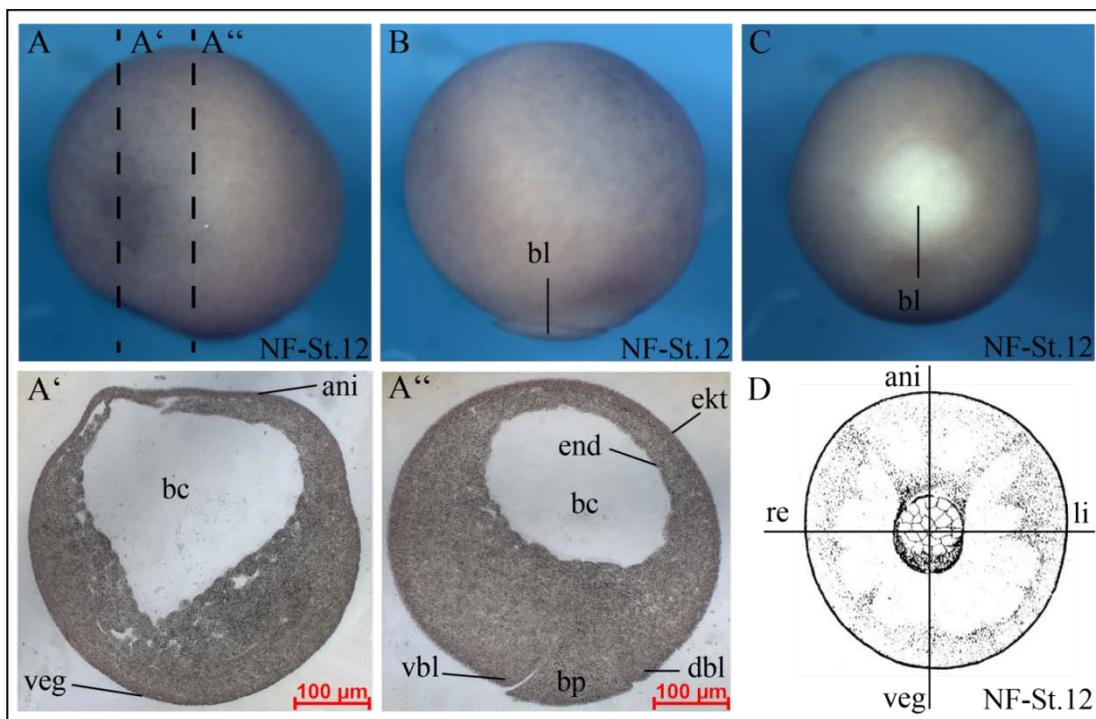


Abbildung 17 Expression Trim23 im NF-Stadium 12: Nachweis der Trim23-RNA mittels Wmish und anschließender histologischer Untersuchung. Schematische Zeichnung zur Achsendarstellung (Karpinka et al., 2015). Mittels Invagination verschwindet das äußere Signal in das Innere des Embryos. Die Bildung der 3 Keimblätter beginnt. ani- animaler Pol, bc- Blastocoel, bl- Blastopore, ddbl- dorsale Blastoporenlippe, end- zukünftiges Endoderm, ekt- zukünftiges Ektoderm, li- links, re- rechts, vbl- ventrale Blastoporenlippe, veg- vegetaler Pol.

Innerhalb der Neurulation befindet sich die Expression unterhalb der Nachweisgrenze (Abb. 28). Erst im frühen Schwanzknospenstadium (NF-Stadium 27) zeigen sich erste Expressionsdomänen in der Mittellinie und der Augenanlage. Diese verstärken sich mit fortschreitender Entwicklung. So zeigt sich eine starke Expression im späten Schwanzknospenstadium (NF-Stadium 30) in der Augenanlage, dem Neuralrohr, den Branchialbögen als auch in den Somiten (Abb. 19-21).

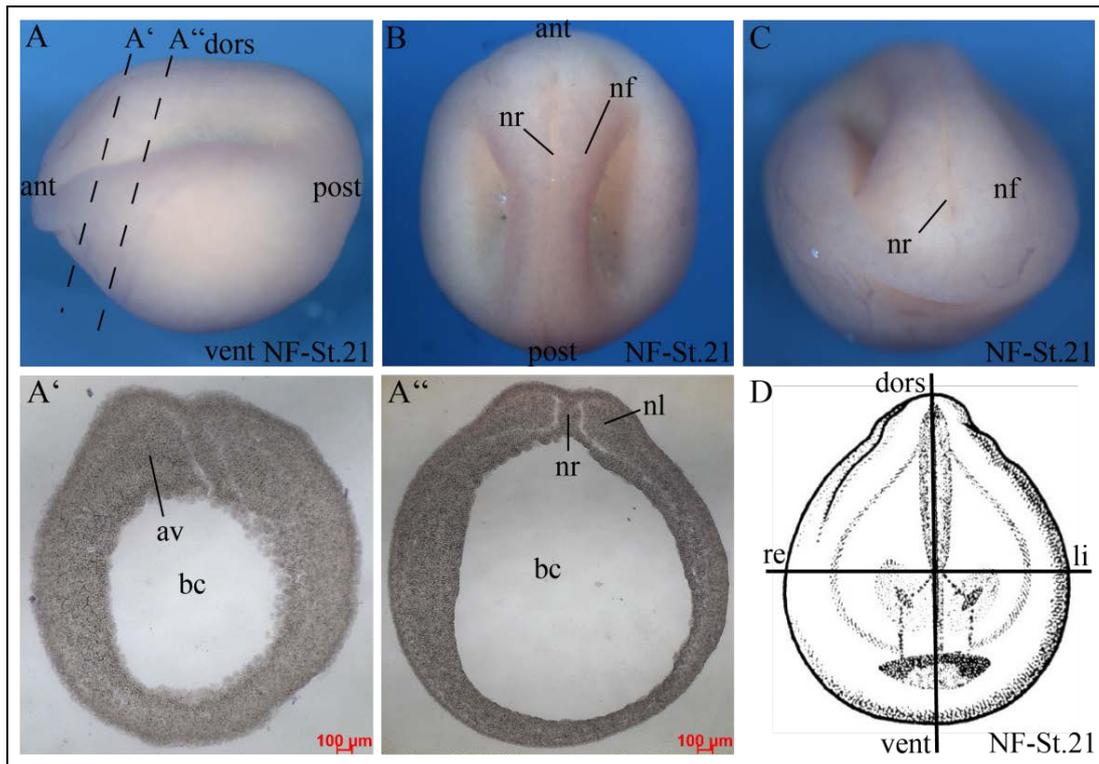


Abbildung 18 Expression Trim23 im NF Stadium 21: Nachweis der Trim23-RNA mittels Wmish und anschließender histologischer Untersuchung. Schematische Zeichnung zur Achsendarstellung (Karpinka et al., 2015). Sichtbar werden die fortschreitende Neurulation sowie die beginnende Augenentwicklung mit der Ausbildung erster Augenvesikel. Eine Expression des Trim23 ist nicht nachweisbar. av- Augenvesikel, ant- anterior, dors- dorsal, li- links, nf- Neuralfalten, nr- Neuralrohr, re- rechts, vent- ventral

Während im Stadium 30 Transkripte im gesamten Augenstroma nachweisbar sind, beschränkt sich das Expressionssignal mit fortschreitender Entwicklung auf die sich entwickelnde Linse (vgl. Einleitung 1.2.5). Erste Transkripte lassen sich im NF-Stadium 33 innerhalb der sich bildenden Linsenplakode nachweisen (Abb. 20). Im folgenden Entwicklungsschritt lässt sich im Linsenvesikel eine starke Expression des Trim23 nachweisen. Besonders deutlich wird nun die Abgrenzung zum umgebenden Augenstroma (Abb. 20).

Im späten Schwanzknospenstadium erfolgt die Unterteilung des zukünftigen Gehirnes in Vorder-, Mittel- und Hinterhirn. Mikroskopisch kann besonders in den kaudalen Anteilen des Neuralrohres (zukünftige Grundplatte) eine Transkriptanreicherung nachgewiesen werden. Erstmals tritt diese im NF-Stadium 30 auf (Abb. 19). Mit fortschreitender Entwicklung kommt es zu einer zunehmenden Verdichtung, sodass im NF-Stadium 36 der gesamte untere Teil des Neuralrohres Expressionsdomänen erhält (Abb. 21).

Die Bildung der Somiten aus Mesodermzellen wird deutlich. Makroskopisch lassen sich Signale innerhalb der Zellkerne der Somiten nachweisen. Mikroskopisch treten Transkripte erst ab NF-Stadium 36 (Abb. 21) auf.

Ergebnisse

Ab NF-Stadium 30 zeigen sich erstmals Expressionsdomänen innerhalb der sich entwickelnden Branchialbögen (Abb. 19). Deren komplette Ausdehnung zeigt sich im NF-Stadium 36 (Abb. 21). Innerhalb der Vibratomschnitte kann diese Entwicklung nicht nachvollzogen werden.

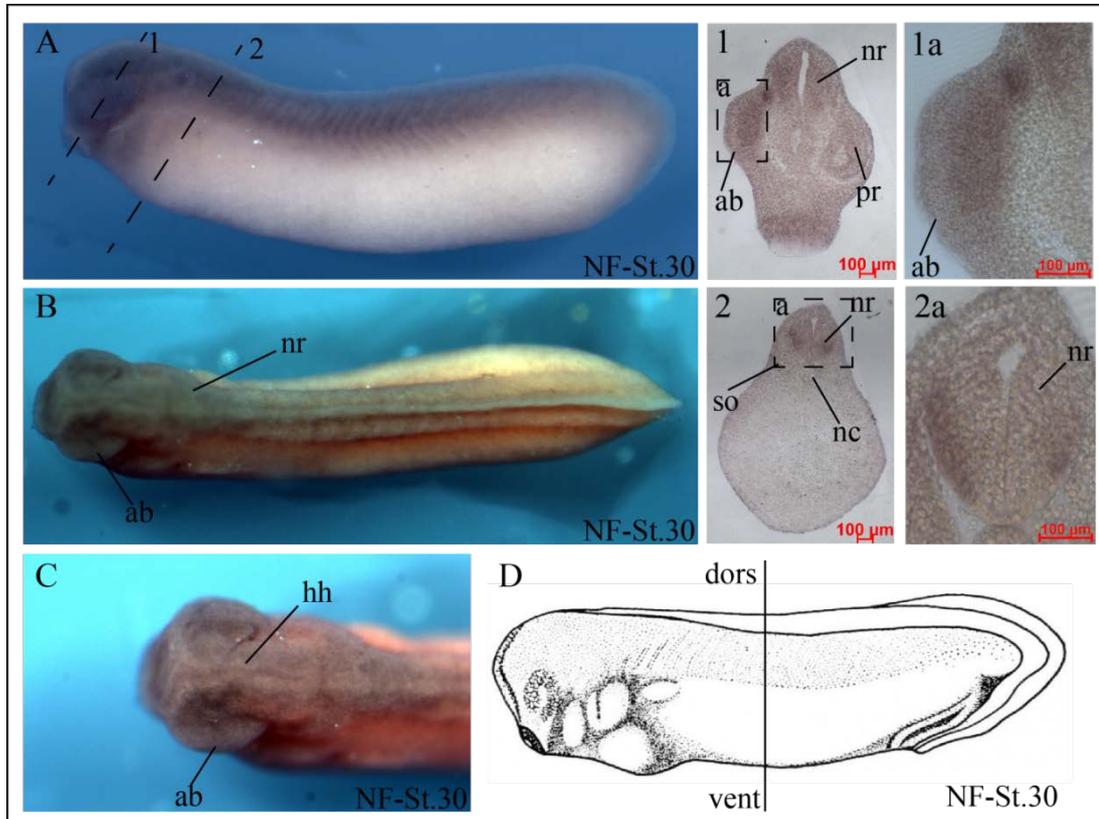


Abbildung 19 Expression Trim23 im NF Stadium 30: Nachweis der Trim23-RNA mittels Wmish und anschließender histologischer Untersuchung. Schematische Zeichnung zur Achsendarstellung (Karpinka et al., 2015). Die Augenentwicklung schreitet weiter voran. Deutlich erkennbar ist die Bildung der prospektiven Retina (1) (Sive et al., 2000). Expressionsdomänen können besonders in den Augenbechern und in den kaudalen Abschnitten des Neuralrohres (zukünftige Grundplatten) nachgewiesen werden (1a, 2a). ab- Augenbecher, dors- dorsal, hh- Hinterhirn, nc- Notochord (Chorda dorsalis), nr- Neuralrohr, pr- prospektive Retina, so- Somiten, vent- ventral

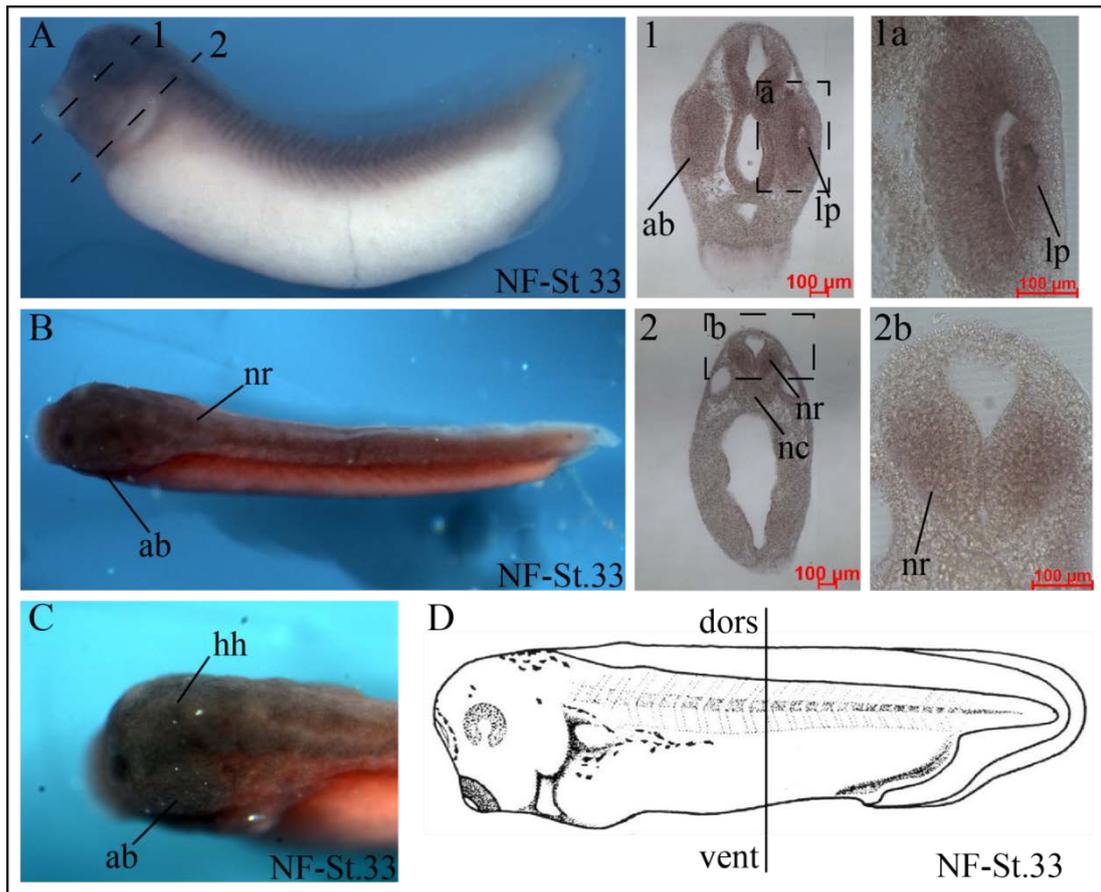


Abbildung 20 Expression Trim23 im NF Stadium 33: Nachweis der Trim23-RNA mittels Wmish und anschließender histologischer Untersuchung. Schematische Zeichnung zur Achsendarstellung (Karpinka et al., 2015). Mit fortschreitender Augenentwicklung kommt es zur Ausbildung einer Linsenplakode. Sowohl diese als auch das Neuralrohr weisen eine starke Expression auf. Mikroskopisch zeigt sich eine schwache Expression in den Somiten. ab- Augenbecher, dors- dorsal, lp- Linsenplakode, nc- Notochrod (Chorda dorsalis), nr-Neuralrohr, so- Somiten, vent- ventral

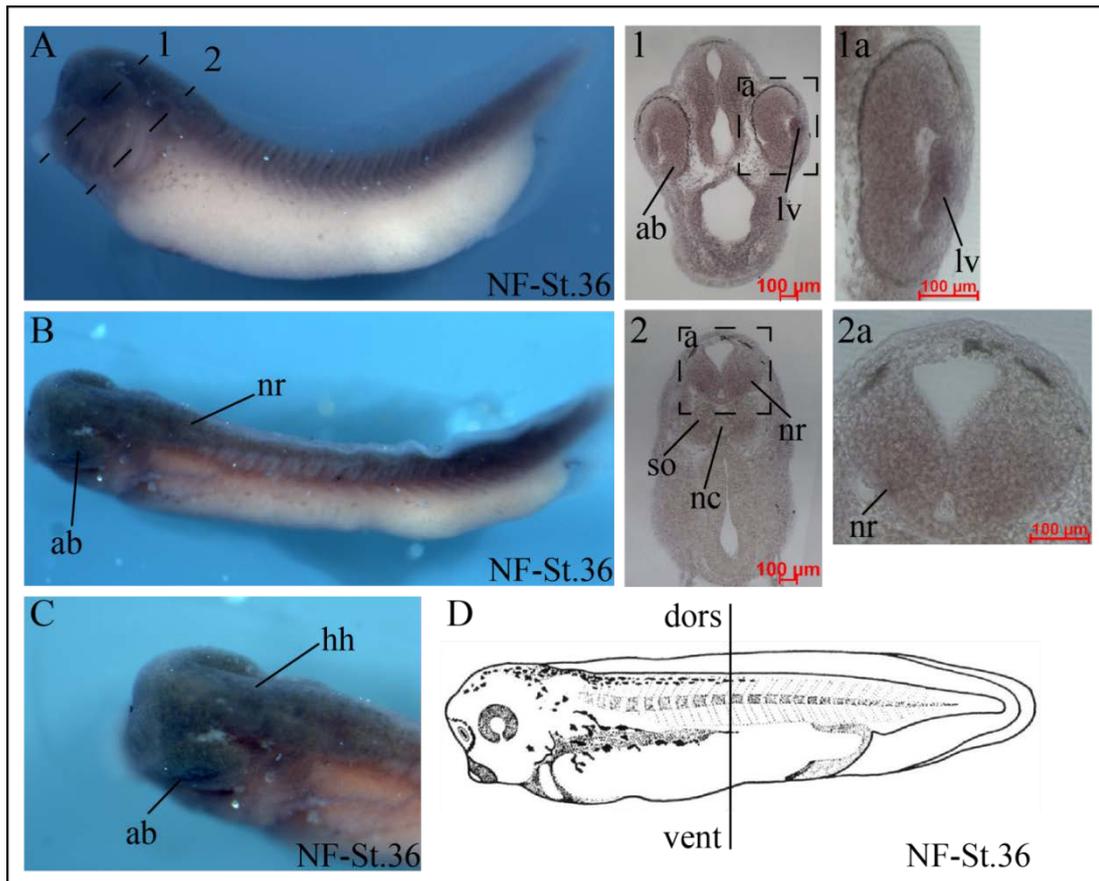


Abbildung 21 Expression Trim23 im NF Stadium 36: Nachweis der Trim23-RNA mittels Wmish und anschließender histologischer Untersuchung. Schematische Zeichnung zur Achsendarstellung (Karpinka et al., 2015). Das Linsenvesikel grenzt sich zum umgebenden Stroma ab. Es enthält neben dem Neuralrohr die meisten Expressionsdomänen. Deutlich transkriptreich zeigen sich die Chorda dorsalis umgebenden Somiten. ab-Augenbecher, dors- dorsal, lv- Linsenvesikel, nc- Notochord (Chorda dorsalis), nr-Neuralrohr, so- Somiten, vent-ventral

4.3.2 Darstellung der räumlichen Expression ganzer Embryonen des Trim7

Im NF-Stadium 3 kann erstmals eine Expression des Trim7 im animalen Pol des Embryos nachgewiesen werden (Abb. 22). Mit fortschreitender Entwicklung kommt es zur Zunahme der Signalintensität.

Ergebnisse

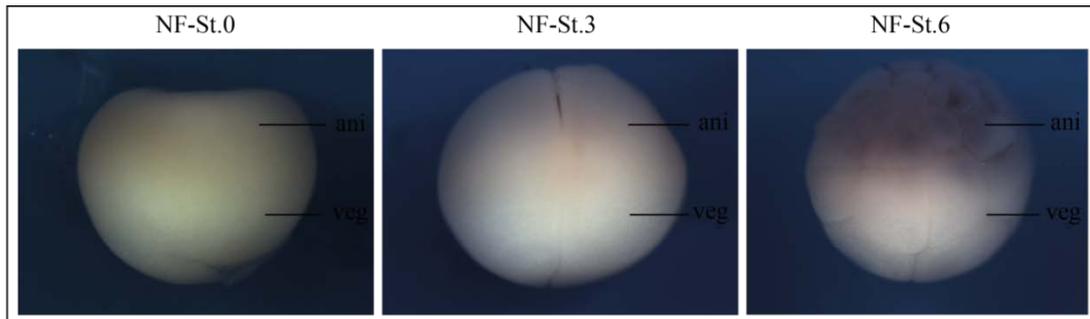


Abbildung 22 Expression Trim7 in NF-Stadien 0-6: Wmish der Embryonalstadien 0-6 des *Xenopus laevis* mittels Dig-markierten RNA-Sonden gegen Trim7. Ansicht der Embryonen von lateral. Erste Transkripte des Trim7 können in animalen Pol des Embryos ab NF-Stadium 3 nachgewiesen werden. ani- animaler Pol, veg- vegetaler Pol

In der Gastrulation erfolgt u.a. mittels Invagination die Bildung der drei Keimblätter (vgl. Einleitung 1.2.2). Im Zuge dessen „wandert“ die äußerlich sichtbare Expression mit den ausgebildeten Blastoporenlippen in das Innere des Embryos (Abb. 23). In den folgenden Entwicklungsstadien ist kein Signal sichtbar (Abb.24).

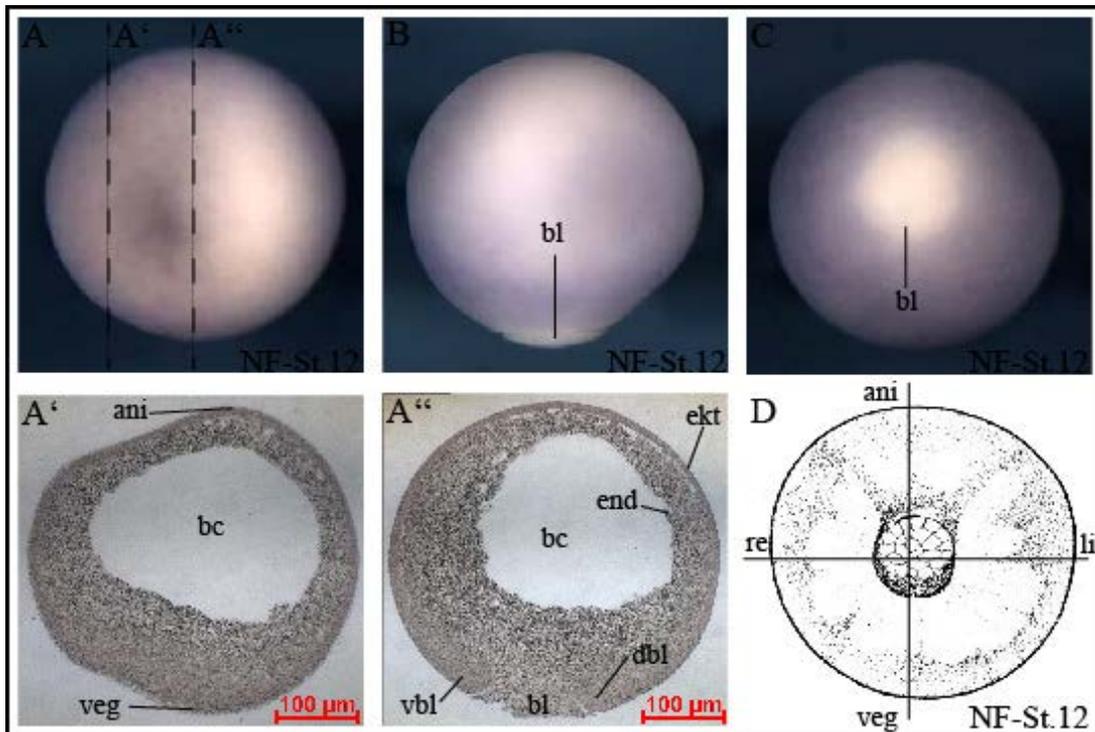


Abbildung 23 Expression Trim7 im NF-Stadium 12: Nachweis der Trim7-RNA mittels Wmish und anschließender histologischer Untersuchung. Schematische Zeichnung zur Achsendarstellung (Karpinka et al., 2015). Mittels Vagination verschwindet das äußere Signal in das Innere des Embryos. Die Bildung der 3 Keimblätter beginnt. ani- animaler Pol, bc- Blastocoel, bl- Blastopore, ddbl- dorsale Blastoporenlippe, end- zukünftiges Endoderm, ect- zukünftiges Ektoderm, li- links, re- rechts, vbl- ventrale Blastoporenlippe, veg- vegetaler Pol.

Ergebnisse

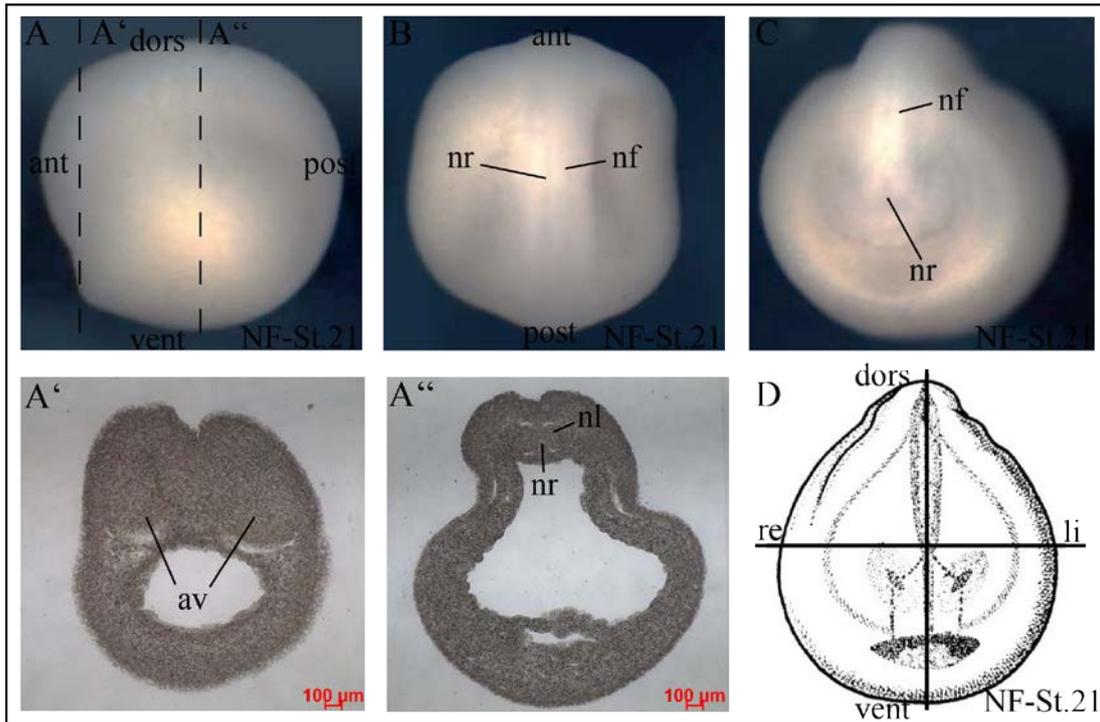


Abbildung 24 Expression Trim7 im NF Stadium 21: Nachweis der Trim7-RNA mittels Wmish und anschließender histologischer Untersuchung. Schematische Zeichnung zur Achsendarstellung (Karpinka et al., 2015). Eine Expression des Trim7 ist nicht nachzuweisen. Sichtbar wird die fortschreitende Neurulation sowie die beginnende Augenentwicklung. av- Augenvesikel, ant- anterior, dors- dorsal, li- links, nf- Neuralfalten, nr- Neuralrohr, re- rechts, vent- ventral

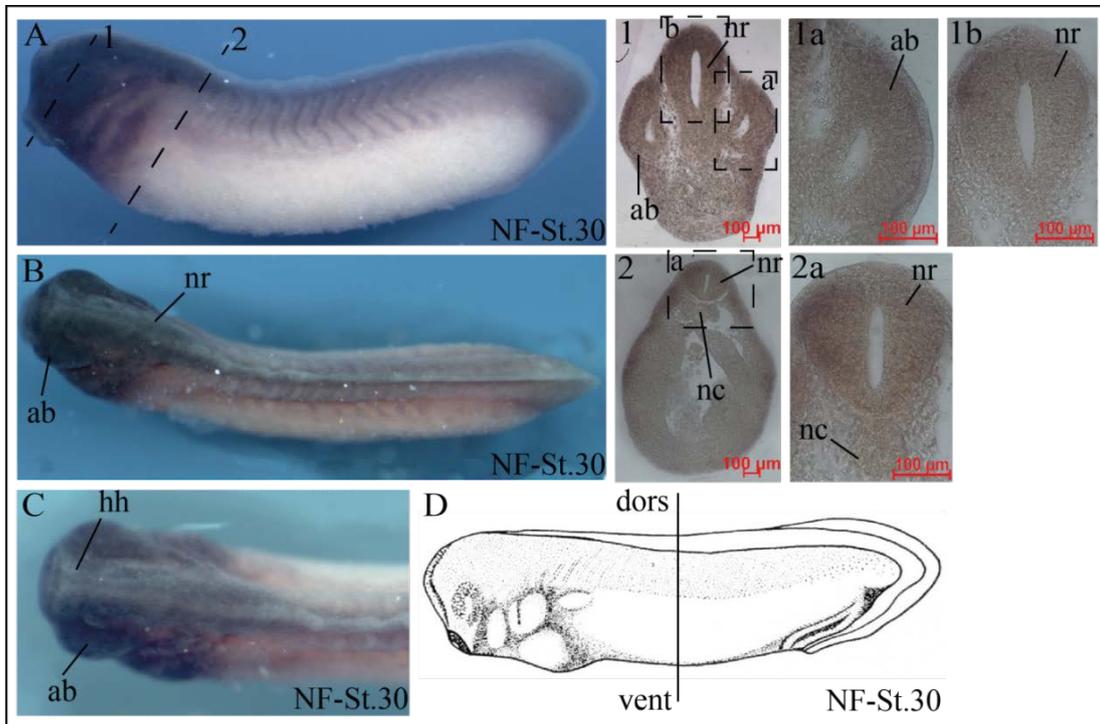


Abbildung 25 Expression Trim7 im NF Stadium 30: Nachweis der Trim7-RNA mittels Wmish und anschließender histologischer Untersuchung. Schematische Zeichnung zur Achsendarstellung (Karpinka et al., 2015). Expressionsdomänen können in den Augenbechern und dem Neuralrohr nachgewiesen werden. Die Somiten enthalten wenige Transkripte. ab- Augenbecher, dors- dorsal, hh- Hinterhirn, hv- Hirnventrikel, nr- Neuralrohr, so- Somiten, vent- ventral

Ergebnisse

Erst im frühen Schwanzknospenstadium (NF-Stadium 27) lassen sich schwache Expressionen in den Augenanlagen, den Branchialbögen, den Somiten sowie in dem sich entwickelnden Gehirn nachweisen, welche sich mit fortschreitender Organogenese (spätes Schwanzknospenstadium NF-Stadium 30-44) verstärken (Abb. 25-27).

Im späten Schwanzknospenstadium kann das Gehirn in Vorder-, Mittel-, und Hinterhirn unterteilt werden. Der Bereich des Hinterhirns weist makroskopisch gesehen die meisten Expressionen auf (Abb. 25-27). Kaudalwärts lassen sich makroskopisch lediglich in den Zellkernen der Somiten Expressionsdomänen nachweisen (Abb. 25-27).

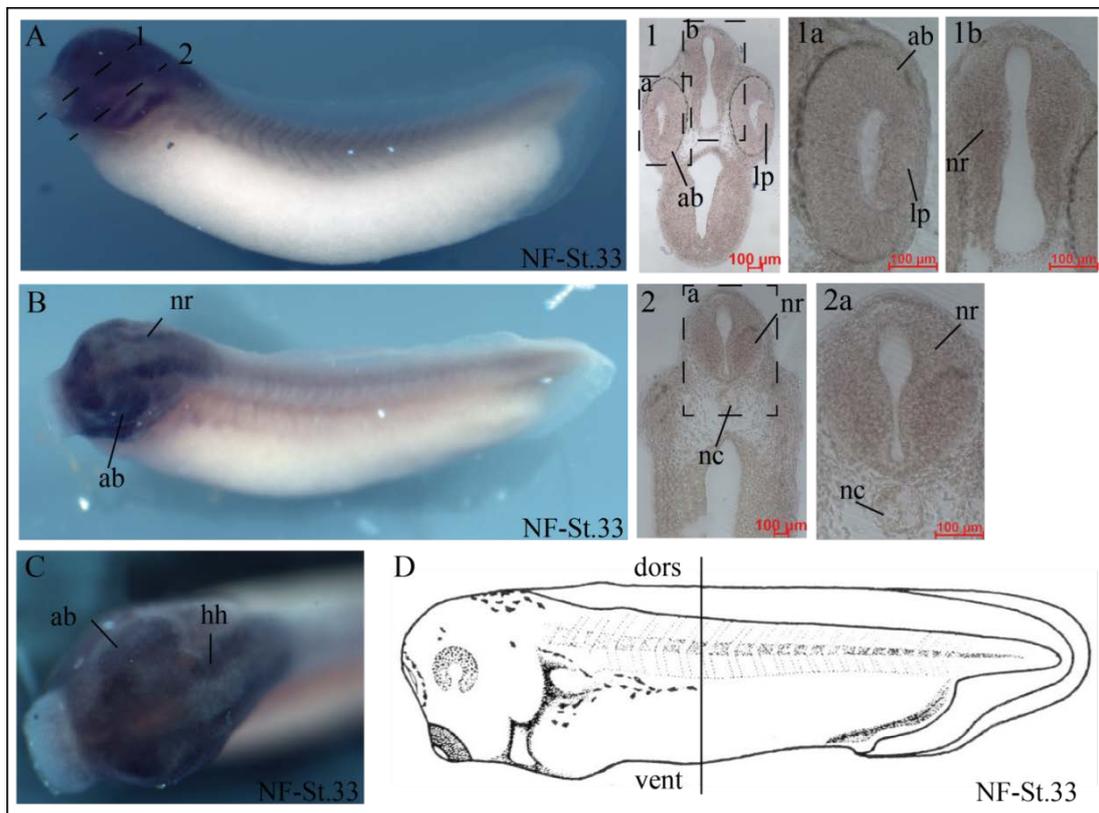


Abbildung 25 Expression Trim7 im NF Stadium 33: Nachweis der Trim7-RNA mittels Wmish und anschließender histologischer Untersuchung. Schematische Zeichnung zur Achsendarstellung (Karpinka et al., 2015). Expressionsdomänen sind verstärkt nachweisbar in den Augenbechern und den kaudalen Bereichen des Neuralrohrs. Zudem weist das Hinterhirn im Vergleich mit den anderen Hirnabschnitten eine starkte Expression auf. Die Linsenplakode erscheint und enthält wenig Transkripte. ab- Augenbecher, dors- dorsal, hh- Hinterhirn, lp- Linsenplakode, nr- Neuralrohr, so- Somiten, vent- ventral

Mit fortschreitender Entwicklung grenzt sich die Augenanlage weiter ab. Die Linsenplakode ist ab NF-Stadium 33 dargestellt (Abb. 26). Im NF-Stadium 36 zeigt sich das Linsenvesikel (Abb. 27). Im Gegensatz zu Trim23 beschränkt sich die Expressionen des Trim7 nicht nur auf die Linse, sondern ist im gesamten Augenstroma nachweisbar (Abb. 25-27).

Ergebnisse

Das stärkste Expressionssignal des Trim7 innerhalb der Branchialbögen zeigt sich im NF-Stadium 33 (Abb. 26). Mit fortschreitender Entwicklung zeigt sich auch das entsprechende Expressionssignal regredient.

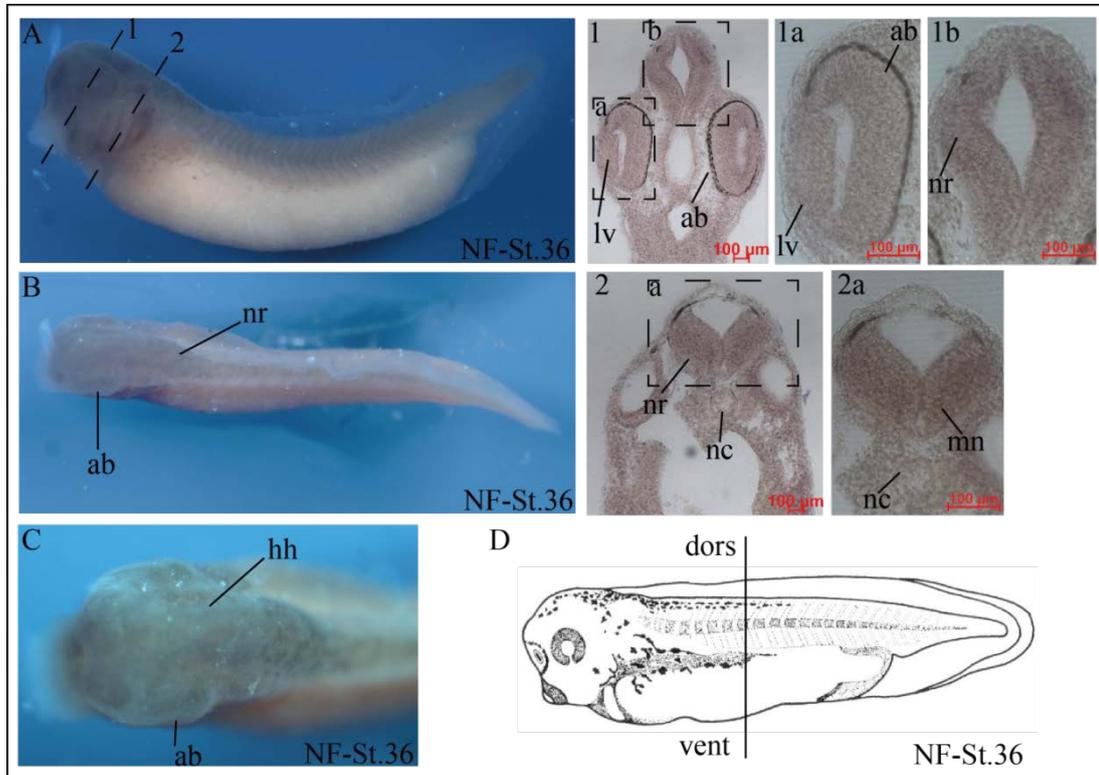


Abbildung 26 Expression Trim7 im NF Stadium 36: Nachweis der Trim7-RNA mittels Wmish und anschließender histologischer Untersuchung. Schematische Zeichnung zur Achsendarstellung (Karpinka et al., 2015). Eine Expression kann besonders innerhalb des Augenbeckers und der unteren Bereiche des Neuralrohres, welche die zukünftige Grundplatte darstellen, nachgewiesen werden. Im entstandenen Linsenvesikel sind wenig Transkripte nachweisbar. ab- Augenbecher, dors- dorsal, hh- Hinterhirn, lv- Linsenvesikel, mn- Motoneuron, nc- Notochord (Chorda dorsalis), nr-Neuralrohr, so- Somiten, vent- ventral

Insgesamt zeigen beide Trim's in den frühen Embryonalstadien (NF-Stad. 0-12) eine Expression besonders im animalen Bereich. Im Rahmen der Gastrulation kann keine weitere Expression nachgewiesen werden. Erst im späten Schwanzknospenstadium zeigen sich einzelne Expressionsdomänen. Für Trim23 kann eine Expression besonders in der Linse ab NF-Stadium 33 nachgewiesen werden (Abb. 20). Gleichzeitig besitzt das neuronale Gewebe, besonders Bereiche des Hinterhirnes einige Expressionsdomänen (Abb. 21, 22).

Für Trim7 lassen sich ebenfalls Expressionen in neuronalen Geweben (Gehirn und Augenstroma) ab dem späten Schwanzknospenstadium nachweisen (Abb. 25-27). Eine klare Abgrenzung einzelner Strukturen ist dabei jedoch nicht möglich.

Ergebnisse

Bei beiden dargestellten Trim's gibt es erhebliche Unterschiede in der Signalintensität zwischen den makroskopischen Beobachtungen und den mikroskopischen Schnitten. Mögliche schwache Expressionen können auf Grund der nicht ausreichenden Sensitivität der Wmish als Nachweisreaktion nicht detektiert werden. Um auch die schwächste Expression nachweisen zu können, wurde eine RT-PCR angefertigt.

4.4 Darstellung der zeitlichen Expression

Zur verbesserten Darstellung des zeitlichen Expressionsverhaltens des Trim7 und Trim23 in der frühen Embryonalentwicklung des *Xenopus laevis* wurde eine semiquantitative RT-PCR angefertigt.

Hierfür erfolgte eine RNA-Isolierung aus allen in der Wmish genutzten NF-Stadien. Die Konzentration wurde für alle Proben auf einen einheitlichen RNA-Gehalt von 100 ng/μl angeglichen (Abb. 28). Danach erfolgte die Umschreibung in cDNA mit Hilfe von *Reverse Transcriptase* unter Verwendung von *Random Hexamer Primern* (vgl Methoden 3.2). Als Ladekontrolle wurde Ornithin-Decarboxylase 1 (ODC 1) verwendet. Diese wird ubiquitär in *Xenopus laevis* Embryonen exprimiert (Cao et al., 2001).

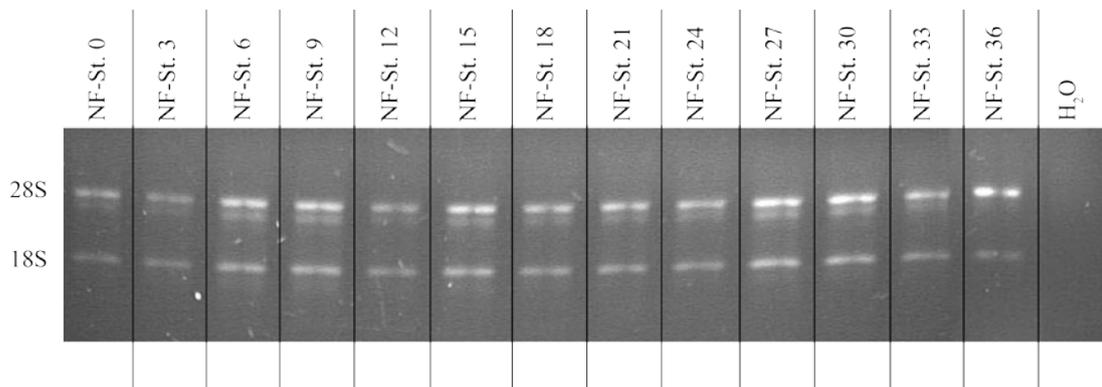


Abbildung 27 Total- RNA: Isolation der RNA aus allen NF-Stadien und Angleichung auf einen RNA-Gehalt von 100 ng/μl. Sichtbar ist die Auftrennung der rRNA in eine 28S und 18S Untereinheit. Wasser diente als Negativ Kontrolle.

Zum Nachweis einer konstanten Signalstärke innerhalb der zu untersuchenden NF-Stadien wurde jede cDNA mittels ODC Primern aufgetragen. Dadurch ist ein Vergleich der Markergene (Trim7 und 23) hinsichtlich ihrer Expressionsstärke möglich. Als Kontaminationskontrolle diente Wasser.

Ergebnisse

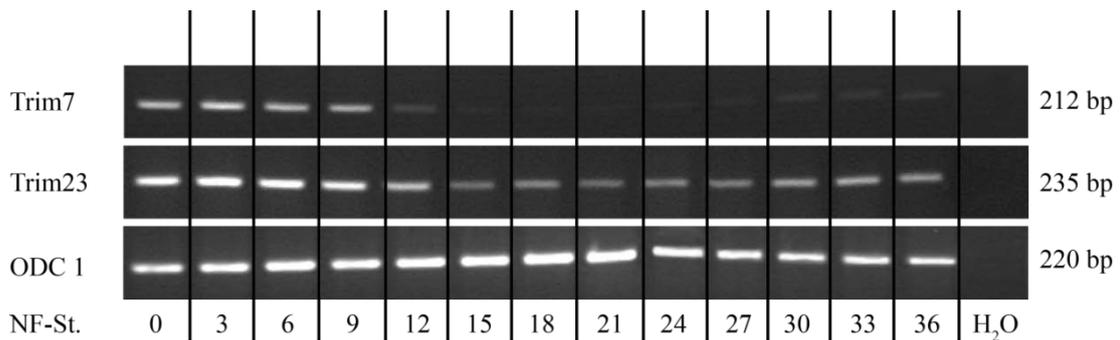


Abbildung 28 RT-PCR Trim7 und Trim23 in *Xenopus laevis* Embryonen: Semiquantitative RT-PCR mit total RNA aus den NF-Stadien 0-36. Als Standard diente ODC 1, als Kontaminationskontrolle diente Wasser. Die Produktgrößen des jeweils nachgewiesenen Fragmentes werden an der rechten Grafikseite dargestellt: Trim7: 212 bp und 28 Zyklen, Trim23: 235 bp und 30 Zyklen. Ersichtlich ist ein maternales Expressionsmuster für beide Trims. Das Signal des Trim7 verschwindet mit NF-Stadium 12 und taucht ab NF-Stadium 30 wieder auf. Trim23 weist in allen Stadien ein Signal auf, am stärksten jedoch in den NF-Stadien 0-9. Bp- Basenpaare, H₂O- Wasser, NF-St.- Nieuwkoop und Faber Stadien

Eine Expression des Trim23 kann in allen NF-Stadien nachgewiesen werden (Abb. 29). Die meisten Transkripte enthalten die maternalen NF-Stadien 0-9. Folgende Entwicklungsstadien 12-27 zeigen eine abgeschwächte Signalintensität. Ab NF-Stadium 30, innerhalb des späten Schwanzknospenstadiums, verstärkt sich die Signalintensität. Der maternale Expressionsspiegel wird jedoch nicht erreicht.

Im Gegensatz zu Trim23 kann Trim7 nicht in allen dargestellten NF-Stadien nachgewiesen werden. Das stärkste Signal lässt sich für Trim7 in den NF-Stadien 0-9 nachweisen (Abb. 29). Ab NF-Stadium 12, der Beginn der zygotischen Genexpression (sog. Midblastulatransition), befindet sich die Expression unterhalb der Nachweisgrenze. Erst im späten Schwanzknospenstadium (NF-Stadium 30) werden einzelne Transkripte ersichtlich. Die ursprüngliche Signalintensität der NF-Stadien 0-9 wird jedoch nicht erreicht.

Beide Trim's unterliegen einer maternalen Expression. Mit fortschreitenden Entwicklungsstadien sinkt die Signalintensität. Im Unterschied zu Trim23 können für Trim7 keine Signale in den NF-Stadien 15-27 nachgewiesen werden.

Zusammengefasst bestätigen die Daten der gezeigten RT-PCR sowohl für Trim7, als auch für Trim23 die Daten der Wmish.

5 Diskussion

Alle Mitglieder der TRIM (tripartite motif)-Familie, auch **RBCC** genannt, weisen einen stark konservierten molekularen Aufbau aus Ringdomäne, 1-2-Zink bindenden **B**-Boxen, einer Coiled-coil-Region sowie eines variablen **C**-Terminus auf (Meroni and Diez-Roux, 2005). Seit ihrer ersten Beschreibung (1991) als „*Xenopus nuclear factor 7 gene (Xnf7)*“ (Reddy and Etkin, 1991) wurden über 100 dieser RBCC entdeckt. Allein im Menschen sind aktuell über 68 bekannt (Napolitano et al., 2011). Die Mehrzahl von ihnen ist im Wesentlichen in der Regulation immunologischer Interaktionsprozesse beteiligt.

Bisher bekannte Studien beziehen sich meist auf Untersuchungen mit vorwiegend humanen und murinen Säugetierzellen. Die Rolle der TRIM's in der frühen embryonalen Entwicklung wurde noch nicht beleuchtet. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, einen Nachweis der Expression von Trim7 und Trim23 in der frühen Embryonalentwicklung des *Xenopus laevis* zu erstellen und erhaltene Ergebnisse im evolutionären Konsens zu betrachten.

5.1 Funktionen der TRIM-Familie

Durch Ubiquitylierung werden wichtige zelluläre Prozesse, wie Endozytose, Aktivierung/Deaktivierung von Kinasen und Transkriptionsfaktoren (Fang et al., 2003) sowie die Proteinhomöostase (Lindsten and Dantuma, 2003) reguliert. Der Ubiquitylierungsprozess wird von drei Enzymen reguliert, wovon das dritte Enzym, die E3-Ligase, die größte Diversität aufweist (vgl. Einleitung 1.3). TRIM's stellen wichtige Vertreter dieser E3-Ligasen dar und werden durch einen hochkonservierten strukturellen Aufbau aus Ring-Finger Domäne, B-Boxen, Coiled-coil-Region und dem variablen C-Terminus charakterisiert (Meroni and Diez-Roux, 2005). Dieser C-Terminus enthält mindestens ein Proteininteraktionsmolekül, wie z.B. die PRY/SPRY- bzw. B30.2-Domäne. Auf Grund der Homologie ihrer Sequenzen werden beide Domänen als Synonym in der Literatur geführt (Grütter et al.; James et al., 2007). Zudem werden beide in mehr als der Hälfte der menschlichen TRIM's exprimiert (Yudina et al., 2015).

Die B30.2-Domäne weist eine Länge von 170 Aminosäuren auf und wurde erstmals als proteincodierendes Exon im menschlichen Major Histokompatibilitäts Komplex I (MHC I) entdeckt (Henry et al., 1998). Die analoge SPRY-Domäne folgt meist einer PRY-Domäne (Grütter et al.). Zusammen umfassen beide eine Länge von ca. 200 Aminosäuren. Ihre funktionale Bedeutung ist aktuell noch unklar (Woo et al., 2006). Identifiziert wurde die SPRY-

Diskussion

Domäne in der sPLA Kinase des *Dictyostelium discoideum* sowie in den Calciumkanälen des Ryanodin-Rezeptors in Säugetieren (Grütter et al.; 2005, Woo et al., 2006). Mutationen im Bereich der PRY/SPRY-Domäne führen zu diversen schweren Systemerkrankungen. So ist eine Mutation innerhalb des TRIM20/Pyrens ursächlich für die Entstehung des familiären Mittelmeerfiebers, welches durch intermittierende Fieberschübe charakterisiert ist (James et al., 2007; Woo et al., 2006). Mutationen innerhalb des TRIM18/MID1/Midline1 führen zur Entstehung des Smith-Lemly-Opitz-Syndromes, eines autosomal rezessiv vererbten Defekt der Cholesterolsynthese, speziell der 7-Dehydrocholesterol-Reduktase (DHCR7). Die DHCR7 ist ein neunteiliges Membranprotein, welches den finalen Schritt der Cholesterolsynthese im Endoplasmatischen Retikulum reguliert, indem es 7-Dehydrocholesterol (7-DHC) zu Cholesterol reduziert (Koide et al., 2006). Erkrankte weisen daher eine reduzierte Cholesterolkonzentration bei gleichzeitig erhöhtem 7-DHC Spiegel auf (Lee et al., 2013; Meljon et al., 2013). Kennzeichen des Smith-Lemly-Opitz-Syndromes sind multiple kongenitale Abnormalitäten, wie z.B. Herzfehlbildungen, Syndaktylie, Katarakt und Nierenagenesie. Zudem weisen erkrankte Kinder typische kraniofaziale Dysmorphien, wie Hypertelorismus, einen breiten Nasenrücken, tiefstehende, posterior rotierte Ohren, auf (Cox et al., 2000). Ursache dieser pathologischen Veränderungen ist die Mutation des *Mid1*, welches besonders in den Branchialbögen des sich entwickelnden Embryonen exprimiert wird (Cox et al., 2000).

Nicht nur Stoffwechselwege werden durch Veränderungen der PRY/SPRY-Domäne beeinflusst. Auf Grund ihrer Interaktionsfähigkeit wird der PRY/SPRY-Domäne eine wesentliche Rolle innerhalb der immunologischen Antwort, speziell im Rahmen der Virusabwehr, zu teil (James et al., 2007). So verhindert z.B. TRIM5 α der Rhesusaffen das Eindringen des HIV-1, indem das virale Capsid durch die SPRY/B30.2-Domäne erkannt und abgebaut wird (Yang et al., 2012). Im Gegensatz dazu weist das humane TRIM5 α nur eine schwache Inhibition der HIV-1 Infektion auf. Ein weiterer wichtiger Faktor in der Abwehr des HIV-1 ist TRIM22. Es beeinträchtigt sowohl die virale Gentranskription als auch die Konstruktion des Virion. Durch seine Funktion als E3 Ligase erfolgt eine posttranslationale Modifizierung des Gag-Moleküls des HIV-1. Dadurch wird dessen intrazellulärer Transport zur Zellmembran verhindert (Hattlmann et al., 2012; Kajaste-Rudnitski et al., 2011). Unabhängig davon verhindert TRIM22 die Replikation der LTR's (*long terminal repeats*) des HIV-1 (Hattlmann et al., 2012; Kawai and Akira, 2011). Zudem agiert TRIM22 als transskriptionaler Suppressor und inhibiert damit die Genexpression des Hepatitis B Virus (Gao et al., 2009). Ursächlich dafür scheint die durch die SPRY-Domäne bedingte nukleäre Lokalisation des TRIMs zu sein (Gao et al., 2009).

TRIM's ohne PRY/SPRY-Domäne sind ebenfalls in der immunologischen Zellabwehr beteiligt. So ist TRIM56 in der Lage, die in die Zelle eindringende DNA und RNA zu erkennen (Liu et al., 2014; Tsuchida et al., 2010; Wang et al., 2011). TRIM23 reguliert u.a. die Aktivierung des

Diskussion

NF- κ B durch Induktion der Ubiquitylierung des NEMO (Arimoto et al., 2010; Kawai and Akira, 2011).

Durch Fehlregulation der gerichteten Immunantwort des jeweiligen Organismus wird die Entstehung diverser Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Rheumatoide Arthritis, Sjögren-Syndrom und Systemischer Lupus Erythematoses begünstigt. Zur Diagnostik als auch zur Verlaufskontrolle der jeweiligen Erkrankungen werden spezifische molekulare Marker genutzt. Als Beispiel dient Ro52, auch als TRIM21 bekannt. Auf Grund seiner Fähigkeit der simultanen Bindung von Immunglobulin G und anti- TRIM21 Autoantikörpern führt eine Überexpression des TRIM21 zur Entstehung diverser Autoimmunkrankheiten, wie rheumatoider Arthritis oder Sjögren-Syndrom (Almagro et al., 2015; Infantino et al., 2015; James et al., 2007).

Aber nicht nur in der Immunologie haben TRIM's Eingang gefunden (Kawai and Akira, 2011). Wesentliche Aufgaben werden ihnen in der Tumorgenese zu teil. In der Regel wird die tumorsuppressive Wirkung der TRIM's durch die Interaktion mit p53 bzw. anderen Protoonkogenen beschrieben. So korreliert das Auftreten gastrointestinaler Tumore direkt mit der TRIM29 Aktivität, welche ebenfalls über die Regulation des p53 Signalweges das Tumorstadium und die Zellapoptose beeinflusst (Qiu et al., 2015). In Osteosarkomzellen führt eine vermehrte Expression des TRIM66 zur Herabregulation des p53 so zur Inhibierung der Zellapoptose, weshalb die Expressionsstärke des TRIM66 als direkter Marker für das Patientenüberleben genutzt wird (Chen et al., 2015).

5.2 Phylogenetische Betrachtungen

5.2.1 Phylogenetische Betrachtungen des Trim23

Der phylogenetische Stammbaum (Abb. 10) zeigt starke verwandtschaftliche Beziehungen zwischen *Xenopus laevis* und den Vertretern der Säugetiere. Zu weiteren Vertretern der Chordaten z.B. der Vögel (Avies) bestehen entferntere Beziehungen. Die Nichtvertebraten, z.B. die stachellose Biene (*Melipona quadrifasciata*), bilden eine eigenständige Gruppe. In der Aminosäuresequenzanalyse zeigt die Sequenz der Maus (90%), gefolgt von Mensch (88%) und Beuteltier (85%) größte Übereinstimmungen (Abb. 11). Trotz phylogenetisch gesehen entfernter verwandtschaftlicher Beziehungen weisen sowohl das Haushuhn (*Gallus gallus*), als Vertreter der Avies, als auch der Zebrafisch (*Danio rerio*), als Vertreter der Fische, eine 85%ige Sequenzübereinstimmung auf (Abb. 10). Besonders im Bereich der TRIM-definierenden Motive

Diskussion

besteht eine starke Identität zwischen den einzelnen aufgeführten Vertebraten. So besteht für die Trim23 charakterisierende ARD1 Domäne eine fast 100%ige Identität innerhalb aller aufgeführter Vertebraten (Abb. 10).

Das ARD1 (ADP-ribosylation factor domain protein 1) gehört zur Familie der ARF's (ADP-ribosylation-factor) GTPasen, welche nach ihrer Fähigkeit zur Beschleunigung der Cholera toxin induzierten ADP-Ribosylierung der G_{sa} Untereinheit benannt wurden (Moss and Vaughan, 1998; Vichi et al., 2005; Vitale et al., 1996). Trim23 (ARD1) wird definiert durch die C-terminal lokalisierte, 18 kDa große ARF-Domäne (Vitale et al., 1998). In Säugetierzellen können 6 verschiedene ARF's unterschieden werden. Diese werden gemäß Sequenzhomologie in 3 Klassen unterteilt, wobei die Klasse 1 hoch konserviert in eukaryotischen Zellen ist (Donaldson and Jackson, 2011).

ARF1 besitzt als GTPase eine Vielzahl von GEF's, welche sich eine ca. 200 Aminosäuren große katalytische Domäne (Sec7) teilen. Diese ermöglicht den Austausch von GDP zu GTP und damit die simultane Bindung von Proteinen und Lipidmembranen (Béraud-Dufour et al., 1999; Mossessova et al., 2003), weshalb ARF1 eine regulierende Funktion innerhalb des zellulären Vesikeltransports zu teil wird (Colombo et al., 1995; Spang et al., 1998). Der exakte Mechanismus dieser Regulation durch ARF1 ist zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht geklärt (Donaldson and Jackson, 2011; Mossessova et al., 2003; Selyunin et al., 2014). In rekombinanten Trim23 (ARD1)-Proteinen konnte eine Interaktion zwischen zwei negativ geladenen Aminosäuren (Asp427 und Glu428) in der Effektorregion der ARF-Domäne mit zwei positiv geladenen Aminosäuren (Arg249 und Lys250) der aminoterminalen Domäne nachgewiesen werden. Durch diese Interaktion wird die Hydrolyse, des in der ARF-Domäne gebundenen GTP, stimuliert (Vitale et al., 1998, 2000). Die aminoterminal Domäne besitzt somit eine GAP-Aktivität. Entscheidend für diese Aktivität ist das Vorhandensein eines intakten Zink-Finger-Motivs sowie zweier Arginine (Vitale et al., 1998, 2000). Beides vereinen die Ring- Finger Motive der TRIM-Familie (Napolitano et al., 2011).

Zusammenfassend vereint Trim23 (ARD1) die Aktivität einer E3 Ubiquitin-Ligase mit der Funktion einer GTPase.

E3 Ligasen sind in der Lage gleichzeitig Ubiquitin und entsprechende Substrate zu binden. Die Substratbindung an Ubiquitin erfolgt über die Aminosäure Lysin, im Fall Trim23 die Aminosäure Lysin63 (K 63) (Poole et al., 2009). Dieser Signalweg wird im Vergleich zum Signalweg über Lysin48 (K48) nicht vom Proteasom erkannt. Die Ubiquitynylierung via K63 reguliert u.a. die postreplikative DNA-Reparatur (Hofmann and Pickart; 1999, Spence et al., 1995), die zelluläre Stressantwort (Arnason and Ellison, 1994) sowie die Signaltransduktion (Deng et al., 2000) und Endozytose einiger Plasmaproteine (Galan and Haguenaer-Tsapis,

Diskussion

1997). Letztere und der Nachweis einer vermehrten Expression des Trim23 am Golgi-Apparat sowie den Lysosomen (Vitale et al., 1998) bestätigt die vermutete Regulation der Proteinhomöostase der Zelle. Durch am Golgi-Netzwerk lokalisierte, γ -*ear*-Domäne enthaltende und ARF-bindende Proteine (GGA), wird Ubiquitin gebunden und damit die Proteinsortierung sowie der Transport zu den Endosomen vollendet (Kang et al., 2010; Puertollano and Bonifacino, 2004; Scott et al., 2004). In welchem Ausmaß Trim23 die Proteinhomöostase der Zelle reguliert und welches Substrat Trim23 wirklich bindet, müssten weitere Expressionsstudien zeigen.

In dieser Arbeit konnte die stärkste Expression des Trim23 in der sich entwickelnden Linse nachgewiesen werden. Die Linse ist gekennzeichnet durch eine lebenslange Zellsynthese und Differenzierung. Die Proteinhomöostase nimmt dabei eine zentrale Rolle ein. Alte oder aberrante Proteine werden via Ubiquitinylierung dem Proteasom zugeführt und abgebaut, um die Klarheit/ Durchsichtigkeit der Linse zu wahren. Bestehen Mutationen in einem dieser Stoffwechselwege, kommt es zur Anhäufung alter oder fehlgefalteter Proteine, welche zur Entstehung einer Katarakt führen (Caceres et al., 2010; Niceta et al., 2015). Es ist anzunehmen, dass Trim23 im Rahmen seiner Fähigkeit als Ubiquitinligase alte und fehlgefaltete Proteine entsorgt. Gleichzeitig ist anzunehmen, dass Trim23 regulierend in die Zellsynthese eingreift. Auf Grund von Trim23 medierter Autoubiquitinylierung von TRAF6 erfolgt eine Steigerung der *NF- κ B-Synthese* und damit eine vermehrte Virusreplikation in mit HCMV infizierten Zellen (Poole et al., 2009). Die genaue Funktion des Trim23 innerhalb der Linsenentstehung lässt sich nur vermuten. In Zukunft müssten weitere Expressionsstudien hinsichtlich Funktionsverlust oder -steigerung des Trim23 stattfinden. Hilfreich ist dabei die starke Konservierung des Trim23. Sowohl Ubiquitinylierung als auch GTPase regulierte zelluläre Transportprozesse sind evolutionär stark konserviert (Mossessova et al., 2003). Dies spiegelt sich in der Syntenieanalyse (Abb.13) wieder. Alle gezeigten Vertebraten weisen eine identische genetische Abfolge auf. Aufgrund dieser engen verwandtschaftlichen Beziehungen des Trim23 kann von einer Übertragung funktioneller Aspekte des Proteins innerhalb der gezeigten Wirbeltiere ausgegangen werden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit haben alle konservierten Proteine die gleiche Funktion inne.

5.2.2 Phylogenetische Betrachtungen des Trim7

Der Aminosäuresequenzvergleich (Abb. 12) verdeutlicht erhebliche Unterschiede innerhalb der Sequenzen der einzelnen Vertebraten. So zeigt das Haushuhn (27%) als phylogenetisch gesehen

Diskussion

nächster betrachteter Verwandter des *Xenopus laevis* die geringste Sequenzübereinstimmung. Im Gegensatz dazu weist die humane Sequenz (33%), die phylogenetisch weit entfernt zu *Xenopus laevis* ist, die meisten Übereinstimmungen in der Aminosäureabfolge auf (Abb. 11). Die größte Ähnlichkeit besteht in der Trim7 definierende SPRY/PRY-Domäne. Die SPRY/PRY-Domäne stellt ein Interaktionsmolekül dar (James et al., 2007), welches erstmalig in der splA Kinase des *Dictyostelium discoideum* sowie in den Calciumkanälen des Ryanodin-Rezeptors in Säugetieren identifiziert wurde (Grütter et al.; Woo et al., 2006). Mutationen in diesem Bereich sind assoziiert mit diversen Systemerkrankungen bzw. vermehrter Anfälligkeit für virale Infektionen (vgl. Diskussion 5.1). Die Konservierung dieser Domäne wurde anhand von Modellorganismen bewiesen (Rhodes et al., 2005). Die gleichen Beobachtungen spiegeln sich in der o.g. Sequenzanalyse wieder. In allen aufgeführten Vertebraten ist die PRY/SPRY-Domäne enthalten. Neben der SPRY/PRY gibt es ebenfalls Übereinstimmungen in den TRIM spezifischen Domänen des Ringfingers, der B-Box und der Coiled-coil-Region. Trotzdem besteht insgesamt eine geringe Sequenzidentität, weshalb für Trim7 nicht von einer Homologie gesprochen werden kann (Sander and Schneider, 1991; Yona et al., 1998).

Zur besseren Vergleichbarkeit wurde eine Syntenieanalyse angefertigt (Abb. 14). In jedem gezeigten Organismus wird das putative Trim7 von der Raf-1-Kinase begrenzt. Eine weitere Übereinstimmung ist nicht vorhanden. Interessanterweise gleichen sich die Sequenzen von Mensch und Maus, sowie Beuteltier und Huhn in den Trim7 flankierenden Genen. Mensch und Maus werden neben Raf-1 jeweils von TRIM27 begrenzt, während Beuteltier und Haushuhn von TRIM25 flankiert werden. Beide letztgenannten TRIM's spielen eine wesentliche Rolle in der antiviralen Abwehrreaktion der Zelle (Conwell et al., 2015; Lee et al., 2015). Trim25 ist wesentlicher Bestandteil im RIGI-Signalweg (Abb. 30) und stellt damit einen wesentlichen Faktor innerhalb der viralen Immunantwort dar. Die Aktivierung des RIGI Rezeptors erfolgt durch RNA-Viren, wie z.B. dem Influenza oder dem Hepatitis C Virus. Die daraus initiierte Signalkaskade mündet in die Produktion von NF- κ B und Typ I Interferonen (IFN α/β) (Abb.30) (Davis and Gack, 2015; D'Cruz et al., 2013). Ursächlich für die Aktivierung ist die Ubiquitylierung der N-terminalen CARD's des RIGI (Gack et al., 2009; Koliopoulos et al., 2016; Lee et al., 2015). Die Substratbindung erfolgt dabei über die SPRY/PRY-Domäne. Beobachtungen im TRIM20 ergaben eine Rückfaltung dieser Domäne über die Coiled-coil-Region (Weinert et al., 2015). Für TRIM25 bedeutet diese Annäherung der RING- und substratbindenden Domänen eine Erleichterung des Ubiquitintransfers vom Enzym E2 auf das Substrat. Diese Substratbindung verstärkt gleichzeitig die RING-Dimerisation (Weinert et al., 2015). Insgesamt ermöglichen beide stereotaktische Veränderungen die antivirale Immunantwort des TRIM25 (Davis and Gack, 2015). Interessanterweise binden virale Proteine, z.B. Non-structural-1-Proteine (NS1), an die Coiled-coil-Region und verhindern dadurch die

Diskussion

intramolekulare Ringdimerisierung und Aktivierung des TRIM25 und somit die IFN1 Freisetzung (Gack et al., 2009; Rajsbaum et al., 2012).

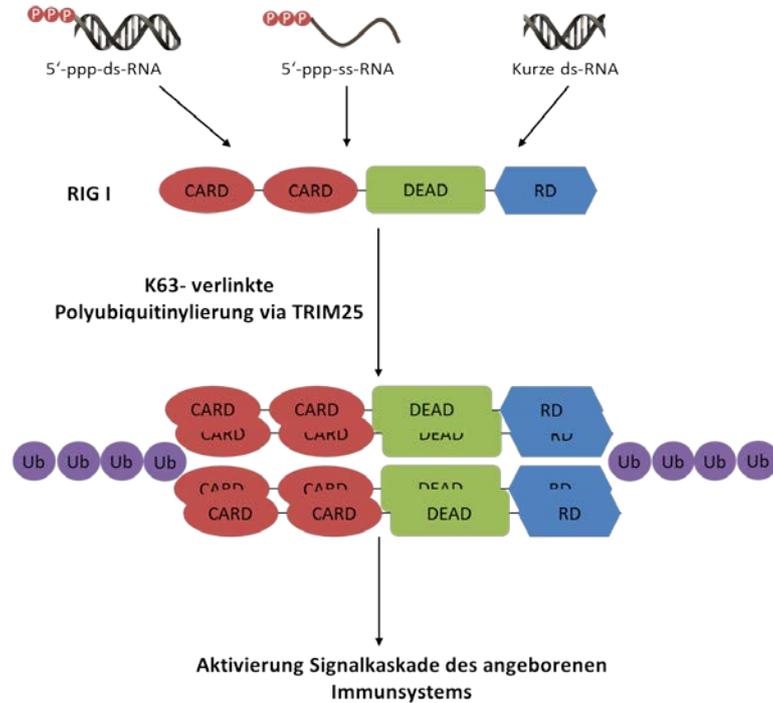


Abbildung 29 Signalkaskade RIG I (schematisch nach Loo and Gale, 2011): Die Aktivierung des RIGI erfolgt nach Virusinfektion durch Erkennung 5'triphosphorylierter oder nicht eigener RNA. Nach K63 abhängiger Polyubiquitinylierung durch TRIM25 setzt sich die Signalkaskade des angeborenen Immunsystems fort, welche in die Produktion von NF- κ B und Typ I Interferone mündet (Davis and Gack, 2015; Jiang et al., 2011; Koliopoulos et al., 2016; Lee et al., 2015). CARD- caspase activation and recruitment domain, DEAD- ATPase containing DEAD box helicase, RD- Repressor Domäne.

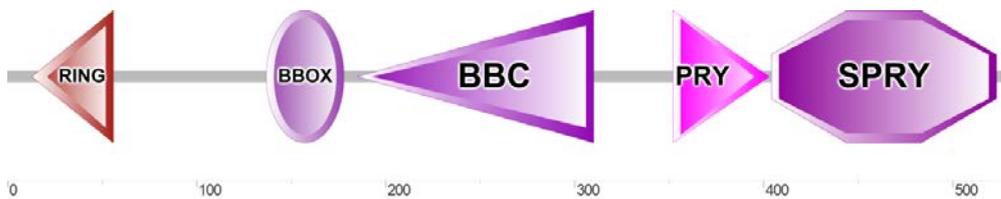


Abbildung 30 Trim25 des *Xenopus laevis*. Deutlich erkennbar ist der strukturelle Aufbau aus Ringfinger, BBox und PRY/SPRY-Domäne am C-terminalen Ende (Letunic et al., 2015; Schultz et al., 1998).

Erstmals wurde Trim25 als östrogenabhängiges Gen beschrieben und ist bekannt unter dem Namen *oestrogen-responsive finger protein* (efp) (Orimo et al., 1999). Das efp Gen besitzt an der 3' untranslatierten Region (UTR) ein Östrogen- empfindliches Element (ERE), wird vorrangig in den weiblichen Geschlechtsorganen wie Uterus, Ovar und Mamma exprimiert. Es

Diskussion

induziert in diesen Geweben östrogenabhängiges Wachstum (Ikeda et al., 2000). Diverse gynäkologische maligne Tumorerkrankungen, z.B. Ovarial- und Mammakarzinom, gehen mit einer Überproduktion an Östrogen einher. Ursächlich dafür ist eine epf abhängige, ubiquitinmedierte Proteolyse, welche Tumorsuppressorfaktoren, z.B. 14-3-3 σ , herabreguliert (Ko et al., 2014). Zusätzlich besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Überexpression des TRIM25 und verstärktem Vorkommen des Mammakarzinoms bei Frauen sowie Lymphknotenmetastasen und dadurch bedingten verschlechterten Gesamtüberleben (Zhao et al., 2011). In Ovarialtumoren konnte eine Überexpression des TRIM27 nachgewiesen werden, welche ähnlich TRIM25 mit einem verschlechterten Gesamtüberleben und vermehrten Metastasierungen korreliert (Ma et al., 2016). Die Regulation des Zellzyklusses erfolgt dabei durch Inhibierung des p38, einer mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK). Ein Ausschalten des TRIM27 führte in Ovarialtumorzellen zu vermehrter Apoptose und gleichzeitig zu einem vermehrten Vorkommen des p38 (Ma et al., 2016).

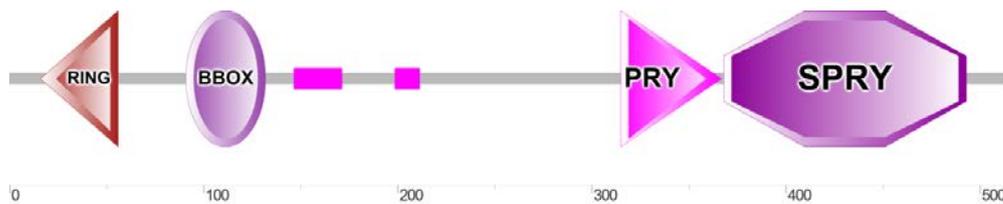


Abbildung 31 Trim27 des *Xenopus laevis*. Deutlich erkennbar ist der strukturelle Aufbau aus Ringfinger, BBox und PRY/SPRY-Domäne am C-terminalen Ende (Letunic et al., 2015; Schultz et al., 1998).

TRIM27, auch als RET finger Protein (RFP) bekannt, besitzt wie TRIM25 und Trim7 eine SPRY-Domäne (Abb. 32) (Conwell et al., 2015; Lee et al., 2015). Expressionsstudien in Hefen konnten eine Interaktion zwischen TRIM27 und TRIM23 nachweisen (Abb. 33) (Reymond et al., 2001; Szklarczyk et al., 2015). Die Funktion dieser Interaktion ist aktuell noch ungeklärt.

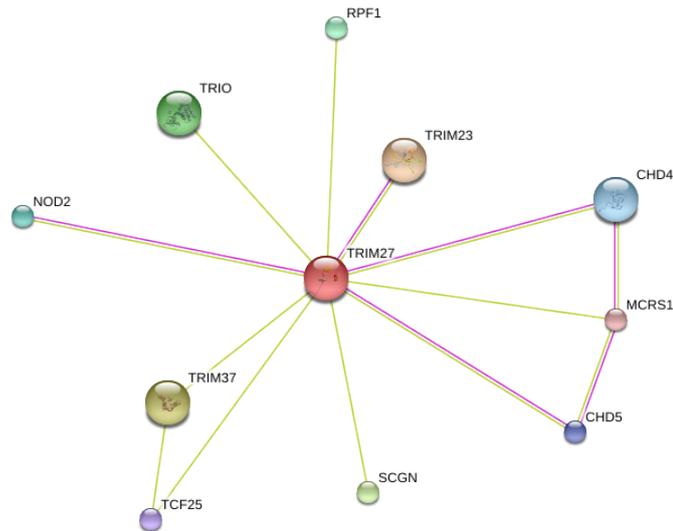


Abbildung 32 Interaktion TRIM27 des Menschen (schematisch nach Online Datenbank String; (Szkarczyk et al., 2015)): Deutlich erkennbar ist eine Interaktion des TRIM27 mit TRIM23. Die Funktion dieser Interaktion ist aktuell ungewiss.

Interessanterweise basieren die genannten Beobachtungen des TRIM27 auf Untersuchungen mit humanen und murinen Zellen. Sowohl in *Xenopus laevis* als auch *Monodelphis domestica* ist TRIM27 bisher noch nicht beschrieben. Mittels Online Datenbank BLAST[®] wurde die Sequenz des humanen TRIM27 mit dem *Xenopus*-Genom verglichen. Die meisten Sequenz-Übereinstimmungen wies Trim39 des *Xenopus laevis* auf (Abb. 34). Die strukturellen Gemeinsamkeiten beruhen dabei auf dem Vorhandensein einer PRY-Domäne (Abb. 35).

Wie TRIM27 greift auch Trim39 regulierend in den Zellzyklus ein, in dem es sowohl p53 als auch p21 destabilisiert und mittels Ubiquitinylierung für deren verstärkten Abbau sorgt (Zhang et al., 2012a, 2012b). Interessanterweise werden für Haushuhn, Maus und Mensch sowohl TRIM27 als auch Trim39 beschrieben. Daraus folgernd kann TRIM27 als Beispiel für evolutionäre Anpassung wegen gesteigerter Stoffwechsellanforderungen gesehen werden. Voraussetzung dafür ist die vollständige Sequenzierung des *Xenopus*-Genoms.

Diskussion

T27_hs	-----MASGSVAECLQOETT	CPVCLQYFAEPMMLDCGHNICACLARCWGTAETNVSCPQC	57
T39_xl	-----MAAANRNPNVTELKEEL	CPICLDHFSEFPVSIIECGHSFCRTTCINRSWRGIHSYFECPCQ	59
T39_md	MADTGLIEAGASAAATALENLQVEAS	CSVCLLEYLKEPVIIIECGHNFRCACITRWWEELERDFPCPVCI	70
T27_hs	ETFPQRHMRPNRHLANVTQLVKQLRTERPSGPG	GEMGVCEKHREPLKLYCEEDQMPICVVCDRSREHRGH	127
T39_xl	NVSRWKFRLRPNRLVENMVEITERLAASKIS--	EVSKKQCEKHQEPMKLYCQVDGREICLVCRESVEHRTH	127
T39_md	KTSRYRSLRPNRQLGNMVEIAKQLQAVKRR--	TRDESLLCPQHHEALNLFCCEDQEPVCLVCEISHAHRAH	138
T27_hs	SVLPLEAVEGFKQIQNQLDHLKRVKDLKRRRAQ	GEQARAELLSLTQMEREKIVWEFEQLYHSLKEHE	197
T39_xl	TVIVPVESTREFFVQLRDRLOTLRKEAATI	IQTKSEDKQKVEKQKEIEKKRRMLASEFEILREILNDRE	197
T39_md	TIVPLDAAQEYKFKLQKCLEPLEQLQEITQCKS	SEKKGPELKKRVETRRQIAGEFEELHRRLEEEQ	208
T27_hs	YRLLARLEELDLAIYNSINGAITQFSCNISHL	SSLIAQLEEKQQOPTRELLQDIGDTLSRAERIRIPEPW	267
T39_xl	RELKDRFEVTEKLIQRTNEKTSKLNEKLSLQKL	IMDIEQNVLPSSQIY-EEPKSAVGR-----	256
T39_md	QLLSRLEEEEQDILQRLRENAAQLGQRRLARL	AAEIEGKCLQSGFEMLKDVKSTLEKCEKVKTMEVT	278
T27_hs	ITPFDLQEKIHIFAQKCLFLTESLQFTEKMQ	SDMEKIQE--L-REAQLYSVDVTLDPDTAYPSLILSDN	334
T39_xl	-----LSQNLSDPQQKPSHGGTMPATFALKRF	TVPVTLDHKTANPNLIISGN	303
T39_md	SVSIELEKNFSSFPRQYFALRKILKQLMGDP	---LHPSHL--LPYSGFFLQRDVTLDPETAHNPVLSED	343
T27_hs	LRQVRS-YLQQDLDPNPERENLFPQVLSG	PCFIAGRHYWEVEVGDKAKWTIGVCEDSVCRKGGVTSAQ	403
T39_xl	RKIVRYEY-PKNLVNYPERFDMKPCVLSG	TGYPSGRKYWEVEVGGIYWSVGVAAHSVCRKGPFKIEPS	372
T39_md	RKSAKFVETRLRDLPTPRRETFFPCVLATEG	FTSGRHYWEVEVGDKTHWAVGVCQDSVSRKGEPLPLPE	413
T27_hs	NGFVAVSLW--YGKEYWALTSPMTALPLRTP	QLRQVGIFLDYDAGKVSFYNVTERCHTFTFSHATFCGPVR	471
T39_xl	GGIWAIGLLGMYTDRYYAFTSPDILLHPRDR	PVVVGVFLNCDEQRVSEFNADSEHLHFNVDVHSADKIF	442
T39_md	TGYWRVRLW--NGDKYAATSPFTPICIKVKP	KRVGVFLDYEAGTLSFYNVTRSHIYTFDTDF-TEKLW	480
T27_hs	PY-FSLSYSGGKSAAPLIICPMS	GIDGFSGHVGNHGHSMETSP	513
T39_xl	PFVLEQWEQNCDLISEFF	-----	461
T39_md	PLFYPGIRAGRKNAAPLTIRPPTDWE	-----	506
T27_hs	100.00 %		
T39_xl	33.85 %		
T39_md	38.57 %		

Abbildung 33 Sequenzvergleich Trim7 und Trim25 des *Xenopus laevis* (Larkin et al., 2007): Bis auf einzelne Abweichungen innerhalb der Coiled coil Region sowie fehlender SPRY-Domäne im Trim39 weisen TRIM27 und Trim39 die gleichen Domänen auf. Dennoch besteht zwischen beiden Trims eine Homologie von ca. 34%. Identische Aminosäuren sind grau unterlegt, fehlende durch Striche markiert. Gelber Kasten: Zinkfinger, roter Kasten: B-Box, grüner Kasten: Coiled-coil-Region, blauer Kasten: PRY-Domäne, lila Kasten: SPRY-Domäne, T-Trim, hs- *Homo sapiens*, xl- *Xenopus laevis*, md- *Monodelphis domestica*.

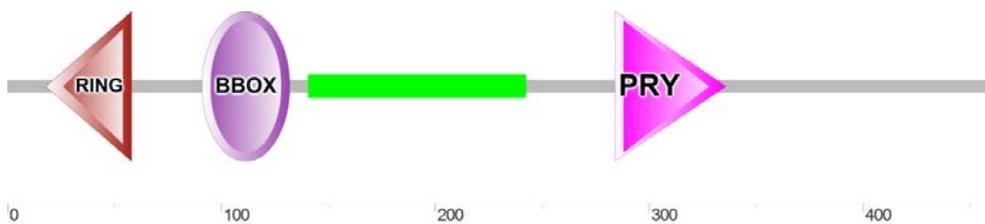


Abbildung 34 Trim39 des *Xenopus laevis*. Deutlich erkennbar ist der strukturelle Aufbau aus RING-Finger, BBox und PRY-Domäne am C-terminalen Ende. Grün dargestellt ist eine nicht näher bezeichnete Region (Letunic et al., 2015; Schultz et al., 1998).

Allen aktuell betrachteten TRIM's ist die SPRY-bzw. PRY-Domäne gemeinsam. Im *Xenopus laevis* weist Trim25 zusätzlich eine fast identische Struktur zu Trim7 auf. Lediglich auf Aminosäureebene zeigen sich entsprechende Unterschiede (Abb. 36).

Diskussion

T7	MKQEGIIQTKPSYGMASADLRDLSCSICLSIYTEPVMLPCGHNFCQGCIVKVLETQEGSGG-YTCPECF	69
T25	-----MAAADLRDELNCVCLTIYSDFVMLPCGHNFCQGCIVQVLDTQEATGGVYTCPECF	57
T7	EEYEERPALHRNWTLGNIAEKCSLAQPEPGKTEILCTYCD-SFVPAVKSLQCETSLCNGHLQKHNSVQ	138
T25	AQYMERPALQRNRTLGNIAERFFCAQPEPDGTGIFCTYCIHSFVPAKSCLLCEASLCESHVRVHSRSAE	127
T7	HTLTEPTCSFMDQKCSHSEIFRYHCCEDSVICVSCCLAGEHRGHRVELLSEASEKKKEKLGKVLKLT	208
T25	HVLTTPTAALMRKCSVHREPLKYYCYVDSSICASCCLAGQHKRHRVELLSDASEKKKEKLRKVLNLP	197
T7	LEREEAEREVQGL--QEDLKEKAAGETERVTVLFRDIRKWVDSLEKQMLDVLSRQKEKLSRDLCQVION	275
T25	LMIEEAERGGWRLQERRREVQEQAAETERVVALFVDIRERLEALEQRVLRVARQEEELSLOVSELIQQ	267
T7	LEIKQDELSGKIRHIEELCNMADPLVVLQERESHGAAFCGAEAADTKVPSVRDLDKGLISDTLVTGLAE	345
T25	LEVKKEELSRKILQTEELCNMADPLAVLQAGESDRAEDDGGREGSDPKVLTVDLDDKDLISETLHSGLDS	337
T7	IMREVR-ARVYGQEAKNVLLDIDTAGQFVSVSNKKTASE-SDIALYPDSPDRFKEYNQVLCNRSEKSGQ	413
T25	IIVTAKGWGVYKGGATHIRLDIDTASNVAVSEDRRTASWTSANQLRPTPSRFIFY-QVLSNNSETSGQ	406
T7	HYWEVEGSTLGDWDIGVAYPSIKRDGKESGIGNNMHSWSLCKCADTFYISHNF--SEIPVSPSCHKYRIS	481
T25	YFWDMEVSESGSWRVGVAYPSIGRKGQFQWIGNNIKSWCLWRWNNGYSVRHDSHGTDLPQVPSCTRIRIS	476
T7	LDYEAGLLSFYELSKPARHLYTFTASFTPEPLHPVFYVGDQEWVRICK-----	528
T25	LDYQAGRLSFYELGEPITHLHTFTASFTPEPLHAAFWWKDILRGHSLVKVIS	528
T7	100,0 %	
T25	55,4 %	

Abbildung 35 Sequenzvergleich Trim7 und Trim25 des *Xenopus laevis* (Larkin et al., 2007). Trotz Vorkommen identischer Domänen besteht zwischen beiden Trims eine Homologie von 55,4%. Identische Aminosäuren sind grau unterlegt, fehlende durch Striche markiert. Gelber Kasten: Zinkfinger, roter Kasten: B-Box, grüner Kasten: Coiled coil Region, blauer Kasten: PRY-Domäne, lila Kasten: SPRY-Domäne, T-Trim.

Auf Grund der Ähnlichkeit beider Trims können mögliche Funktionen übertragen werden. Wie Trim25 und TRIM27 könnte Trim7 regulatorisch in den Zellzyklus eingreifen. Die SPRY-Domäne dient zur Proteininteraktion (Woo et al., 2006). Im Trim7 interagiert sie mit Glukose (Zhai et al., 2004). Zumindest für Lungentumorzellen ist diese Funktion beschrieben. Ein vermehrtes Vorkommen von TRIM7 in entsprechenden Patienten geht mit einer verschlechterten Prognose einher (Chakraborty et al., 2015).

Zusammenfassend stellen alle drei Trims Tumorpromotorfaktoren dar. Diese Erkenntnisse beruhen vorwiegend auf Untersuchungen mit murinen oder humanen Zelllinien. Auf Grund erheblicher Unterschiede zwischen den Sequenzen des Menschen bzw. Maus und *Xenopus* (Abb. 13) können diese Ergebnisse nicht direkt übertragen werden. Jedoch lassen die strukturellen Gemeinsamkeiten auf ähnliche Funktionen schließen.

5.3 Expressionsanalyse des Trim23 und Trim7

Die räumliche Analyse der Expression von Trim23 und Trim7 erfolgte anhand von *in situ* Hybridisierung ganzer Embryonen („Whole-mount“ *in situ* Hybridisierung; Wmish). Zur verbesserten Darstellung der zeitlichen Expression schloss sich eine semiquantitative RT-PCR mit entsprechenden TRIM spezifischen Primerpaaren an.

5.3.1 Expressionsanalyse des Trim23

Durch die Wmish werden hohe Transkriptmengen des Trim23 im animalen Bereich der NF-Stadien 0-9 nachgewiesen (Abb. 16). Mit Beginn der Einwanderung des Ektoderms im Zuge der Mesodermbildung (NF-Stadium 12) verschwindet das Signal (Abb. 17, 28). Erst im frühen Schwanzknospenstadium (ab NF-Stadium 27) werden einzelne Expressionsorte in der Augenanlage sichtbar (Abb. 19). Anhand dieses Expressionsmusters kann für Trim23 von einer maternalen Expression ausgegangen werden. Bestätigt werden die Ergebnisse der Wmish durch die RT-PCR (Abb. 28). Die meisten Transkripte für Trim23 lassen sich in den NF-Stadien 0-9 nachweisen (Abb. 16). In den folgenden Stadien ist die Signalintensität reduziert, bleibt aber immer oberhalb der Nachweisgrenze. In diesem Fall ist davon auszugehen, dass die maternale Expression von Trim23 ununterbrochen in eine zygotische Expression übergeht. Mit fortschreitender Entwicklung (NF Stadium 33-36) kann für Trim23 mittels Wmish neben einer Expression in den Augenesikeln auch eine Expression in der Linse und den kaudalen Abschnitten des Neuralrohrs detektiert werden (Abb. 20; 21). Die Invagination des Linsenvesikels wird durch den Kontakt des Augenbeckers mit dem darüberliegenden Oberflächenektoderm induziert (Einleitung 1.2.2). Wesentliche Rollen dabei spielen Transkriptionsfaktoren wie Pax6, Sox2 (Bailey et al., 2006) aber auch BMP4 und 7 (Faure et al., 2002; Sjödal et al., 2007). Eine direkte Interaktion von Trim23 mit diesen genannten Transkriptionsfaktoren ist noch nicht bekannt. Für die Linsenentwicklung notwendig ist der durch FGF aktivierte Ras-Signalweg (Burgess et al., 2010; Carbe and Zhang, 2011). Mutationen in diesem führen zur Reduktion der Zellproliferation und Apoptose (Li et al., 2014). Interessant ist, dass die Linsenentwicklung, speziell die Linsenfaserentwicklung, durch eine Vielzahl zellulärer Migrationsprozesse gekennzeichnet wird. Diese werden im Wesentlichen durch die GTPase-Rho reguliert und spielen eine wesentliche Rolle in der Regulation des Linsenwachstums und der Differenzierung (Rao, 2008). Zu vermuten wäre ein Zusammenhang mit der potentiellen GTPasen Aktivität des Trim23/ARD1 (Diskussion 5.2.1), welches an vesikulären Transportprozessen innerhalb einer Zelle beteiligt ist. Um die Bedeutung in der

Diskussion

Linsenentwicklung beurteilen zu können, müssten sich Mutationsstudien anschließen. Sinnvoll wäre eine Mikroinjektion eines sowohl funktionslosen als auch überexprimierten Trim23 in *Xenopus laevis* Embryonen, um dessen Bedeutung innerhalb der Linsenentwicklung darzustellen. Des Weiteren wäre eine weiterführende Beobachtung der *Xenopus laevis* Embryonen hinsichtlich der Augenentwicklung bedeutsam. Eine Untersuchung adulter Gewebe wäre ebenfalls vorteilhaft, um zu klären, ob sich die Expression des Trim23 lediglich auf die Embryonalentwicklung bezieht oder Transkripte des Trim23 auch in der adulten Linse oder anderen adulten Geweben nachweisbar sind.

Ab NF-Stadium 30 lassen sich vermehrt Transkripte für Trim23 in den ventralen Abschnitten des Neuralrohres nachweisen (Abb. 19). Dieser Bereich stellt die zukünftige Grundplatte dar und enthält vornehmlich motorische Neurone bzw. Interneurone zur Regulation der Skelettmuskulatur. Die Bildung der Grundplatte wird durch die Chorda dorsalis induziert (Abb. 4). Sie sezerniert Shh, welches in absteigender Konzentration für die Ausbildung verschiedener Neuronenarten innerhalb des Neuralrohrs verantwortlich ist (vgl. Einleitung 1.2.3). Insgesamt ist die Entwicklung von Neuronen ein komplexer Prozess, welcher diverse dynamische und molekulare Mechanismen benötigt. So werden Bestandteile des Zytoskeletts, der Zellmembranen und der Signaltransduktion entlang der sich entwickelnden Neuriten transportiert. Die GTPasen der Rho- und Ras-Familie, als Regulatoren u.a. zellulärer Transportprozesse sowie der zytoskelettalen Organisation, spielen somit eine wesentliche Rolle in der neuronalen Entwicklung (Govek et al., 2005; Torii et al., 2014). Die Familie der ARF-GTPasen scheinen in der neuronalen Entwicklung ebenfalls beteiligt zu sein. Expressionsstudien an Neuronen von Maus und Mensch zeigten, dass ARF6 regulierend in den Vesikeltransport des Cytohesin-2 (GEF der ARF-Familie) entlang sich entwickelnder Neuriten eingreift (Frank et al., 1998; Torii et al., 2010, 2014). Auch zeigen sich entwickelnde ziliäre Neurone von Hühnern eine vermehrte Expression von Calciumkanälen an deren Membranoberfläche (Chae et al., 2005). Der intrazelluläre Transport dieser Kanäle zur Membran wird durch GTPasen, speziell von ARF's, reguliert. So steuert ARF1 den Transport der Calciumkanäle durch den Golgi-Apparat. ARF6 steuert hingegen die Integration der Kanäle in die Plasmamembran (Chae et al., 2005; Donaldson, 2003; Donaldson and Jackson, 2011).

Auf Grund des hohen Konservierungsgrades des Trim23 (vgl. Diskussion 5.2.1) können oben genannte Ergebnisse in Neuronen von Hühnern, Mäusen, Menschen und *Xenopus* zusammen betrachtet werden. Da Trim23 eine ARD1-Domäne enthält und funktionelle Eigenschaften einer GTPase aufweist, erscheint es denkbar, dass auch Trim23 in den genannten Transportprozessen eine Funktion ausübt. Auf Grund der Expression erscheint es sogar wahrscheinlich, dass Trim23 an der Regulation der Entwicklung von Neuronen bzw. neuronalem Gewebe beteiligt ist. Weshalb sich die Expression auf den unteren Bereich des Neuralrohres, also des Bereiches der

zukünftigen Motorneurone, beschränkt und welchen speziellen Entwicklungsschritt/ -funktion diese erfüllt, müssen zukünftige Funktionsstudien klären.

5.3.2 Expressionsanalyse des Trim7

Hohe Transkriptmengen des Trim7 werden durch die Wmish im animalen Bereich der NF-Stadien 0-9 nachgewiesen (Abb. 22). Mit Beginn der Gastrulation (NF-Stadium 12 Abb. 23) verschwindet das Signal und wird erst im frühen Schwanzknospenstadium (ab NF-Stadium 27) wieder sichtbar (Abb. 30-36). Diese Ergebnisse der Wmish werden durch die RT-PCT bestätigt (Abb. 29). Auf Grund des dargestellten Expressionsmusters stellt Trim7 ein maternal exprimiertes Protein dar.

Innerhalb der frühen Embryonalentwicklung, speziell der Furchungsteilungen, findet kaum DNA-Synthese statt (Heasman, 2006; Kai et al., 2003). Relevante biosynthetische Prozesse, mitotische Teilungen und spezifizierte Zellschicksale werden durch maternale mRNA und maternale Proteine reguliert (Benoit et al., 2009; Tadros and Lipshitz, 2009). Diese maternale mRNAs werden aktiv translatiert bei gleichzeitig reduzierter Transkription der Kerngene (Heasman, 2006; Shiokawa et al., 2008). Die Aufrechterhaltung eines stabilen Verhältnisses des Kern-/Zytoplasmavolumens ist dabei entscheidend für die weitere Embryonalentwicklung. Ein Anstieg des Verhältnisses des Kern-/ Zytoplasmavolumens führt zu einer verfrühten Aktivierung der zygotischen Gentranskription und daraus resultierend zu einem verfrühten Beginn der MBT (Jevtić and Levy, 2015). Die richtige zeitliche Abfolge der Aktivierung der zygotischen Genexpression wird im Wesentlichen durch den Methylierungsstatus der DNA reguliert. Das *Xenopus* Genom weist ursprünglich eine globale Methylierung auf (Ruzov et al., 2004; Shiokawa et al., 2008; Stancheva et al., 2002). Auf Grund dieser Methylierung wird die Transkription innerhalb der ersten 12 Teilungszyklen der Zygote gehemmt. Vor der MBT findet eine schrittweise Hypomethylierung bestimmter Gen-Promotorregionen innerhalb der Blastulaembryonen statt (Stancheva et al., 2002). Ein Verlust der Methylierung, z.B. durch Inaktivierung der DNA-Methyltransferase *xDnmt1*, ist assoziiert mit verfrühter Aktivierung entwicklungsentscheidender Gene und daraus resultierender Apoptose embrionaler Zellen (Stancheva et al., 2002). Entsprechende Signalkaskaden werden ebenfalls durch maternale mRNAs bereitgestellt.

Trim7, als **Glykogenin-Interaktions Protein 1** (GNIP 1), nimmt am Glykogenstoffwechsel teil (Skurat et al., 2002). Glykogenin besitzt eine Aktivität zur Selbstglykosylierung und verlängert die Glykogenkette durch Bindung von Glukose via Tyrosin (Alonso et al., 1995; Skurat et al., 1993). Danach wird unter Bindung der Glykogensynthase die Glykogenkette vervollständigt (Mu et al., 1997; Viskupic et al., 1992). Immunpräzipitationen in Hefezellen bestätigten eine

Diskussion

Interaktion zwischen Glykogenin und der Glykogensynthase via COOH-Terminus (Skurat et al., 2006). Weitere Expressionsstudien in Hefezellen konnten eine Interaktion des Glykogenins mit GNIP (Trim7) aufzeigen (Skurat et al., 2002). Insgesamt existieren drei verschiedene Isoformen des GNIP. GNIP 1 weist neben der längsten Aminosäurekette eine der RBCC-Familie zugehörige Sequenz bestehend aus Ringfinger-Domäne, B-Boxen sowie Coil-coiled-Region auf. Charakterisiert wird es durch die C-terminal lokalisierte B30.2-Domäne (Skurat et al., 2002). Sequenzanalysen zeigten sowohl eine identische Aminosäureabfolge des NH₂-Terminus des GNIP 1 und Trim7, als auch identische RBCC definierende Domänen (Skurat et al., 2002). GNIP 1 fungiert als Targetmolekül des Glykogenins und stellt vermutlich die Bindung zwischen Glykogenin und dem Zytoskelett her (Skurat et al., 2002). So konnten Expressionsstudien in HeLa Zellen der Ratte einerseits eine Interaktion des Glykogenins mit Aktin darstellen, andererseits ein Vorkommen des Glykogenins sowohl zytoplasmal als auch nukleär zeigen (Baque et al.; 1997, Ferrer et al., 1997). Im Weiteren wurde die Expression verschiedener GNIP-Transkripte im menschlichen Gewebe mittels Northern-Blot-Analysen untersucht. Die meisten Transkriptmengen wurden in der Skelettmuskulatur nachgewiesen, während Herz-, Gehirn- und Pankreasgewebe nur wenige Transkripte aufwiesen (Skurat et al., 2002). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte eine Expression des Trim7 in der Skelettmuskulatur der erwachsenen Maus gezeigt werden (Reymond et al., 2001). Diese Beobachtungen weichen erheblich von den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen der Expressionsanalyse in *Xenopus laevis* Embryonen ab. In vorliegender zeigt sich eine Expression des Trim7 vornehmlich im Augenstroma und im Neuralrohr (Abb. 25-27). Zu diskutieren ist, weshalb es zu einem Anstieg der Signalstärke innerhalb der Neurulation kommt. Interessanterweise beschränkt sich das Signal, laut Wmish, mit fortschreitender Entwicklung auf die ventralen Anteile des Neuralrohres. Aus ihnen wird sich das Vorderhorn bilden, welches die motorischen Neurone enthält. Besonders im NF-Stadium 36 ist eine deutliche Abgrenzung des Signales zur Umgebung sichtbar (Abb. 27). Am wahrscheinlichsten handelt es sich hierbei um motorische Neurone. Für die Entstehung des zukünftigen Rückenmarkes ist die Nähe zur Chorda dorsalis mit entsprechenden Sekretionskaskaden notwendig (vgl. Einleitung 1.2.3). Ein hoher Shh Spiegel führt zur Ausbildung von motorischen Neuronen. Es scheint, dass Trim7 durch die beginnende Signalkaskade aus der Chorda dorsalis bzw. mit Beginn der Migration der Neuralleistenzellen aktiviert wird (Abb. 3).

Fraglich bleibt die Funktion des Trim7. Eine Interaktion innerhalb des Glykogenstoffwechsels scheint möglich. Besonders in den frühen embryonalen Phasen benötigt die Zelle sehr schnell viel Energie zur Durchführung diverser Furchungsteilungen. Genau in diesen Phasen zeigt sich eine starke Expression des Trim7 (Abb. 22). Die Furchungsteilungen sind gekennzeichnet durch eine erhebliche Zellzunahme. Lediglich die erste Furchungsteilung in fertilisierten *Xenopus*

Diskussion

Xenopus laevis Oozyten durchläuft die G1 und G2 Phase. Ab dem zweiten Zellzyklus bis zum Erreichen der zwölften Teilung werden nur Synthese- und Mitosephasen durchlaufen (Murphy and Michael, 2013; Shiokawa et al., 2008). Zudem werden die Furchungsteilungen zunehmend asynchron und die Zellen weisen insbesondere in der zukünftigen animalen Region eine gesteigerte Motilität auf (Shiokawa et al., 2008). Erst in der MBT erfolgt eine erneute G1 Phase, in welcher die entstandenen Zellen einer „Fehlerkontrolle“ unterzogen werden. Kontrollmechanismen sind DNA-Struktur, DNA-Replikation, DNA-Methylierung sowie RNA-Transkription und –Translation (Kai et al., 2003). Weisen Zellen zu viele Defekte auf, erfolgt die Apoptose mit anschließendem Zelltod. Das bei Fertilisation vorliegende Apoptoseprogramm wird maternal vererbt und mit Beginn der Gastrulation aktiviert. Weisen lediglich eine bestimmte Anzahl Zellen Defekte auf, erfolgt eine Apoptose der entsprechenden Zellen in das Blastocoel. Die Embryonalentwicklung schreitet weiter voran. Am Ende weisen die entstandenen Organismen jedoch entsprechende Defizite, z.B. Azephalie oder eine gedrungene Körperachse, auf (Kai et al., 2003).

Alle Zellen der Blastula sind pluripotent. Durch entsprechende Mutationen kann ein Eintritt in die G1-Phase verhindert werden. Dies hätte eine unkontrollierte Zellteilung zur Folge. In Lungenkarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass Trim7 durch Ubiquitylierung des AP-1 Co- Aktivators RACO1 die Transkription des c-Jun vorantreibt und so die Zellproliferation und die Apoptose verhindert (Chakraborty et al., 2015). C-Jun, als Mitglied der AP-1 Familie, kontrolliert die Transkription der Zellzyklus Regulatorgene cyclinD1 und cdc2 (Chakraborty et al., 2015). Ein *Knockdown* des TRIM7 führte zur Reduktion der Tumorzellproliferation und des Tumorwachstums. TRIM7 greift somit regulierend in den Zellzyklus ein. Um eine unkontrollierte Zellteilung zu verhindern, muss eine TRIM7-Expression inhibiert werden. Im Rahmen der Embryonalentwicklung geschieht dies durch Micro-RNAs, die mit Beginn der zygotischen Transkription gebildet werden und für einen schnellen Abbau maternaler Proteine und mRNA sorgen (Tadros and Lipshitz, 2009). Entscheidend ist dabei das richtige „Timing“ der zygotischen Transkription, die u.a. vom Methylierungsgrad der DNA abhängig ist.

Das *Xenopus laevis* Genom weist eine globale Methylierung auf, wodurch die Transkription innerhalb der ersten 12 Teilungszyklen der Zygote gehemmt wird (Ruzov et al., 2004; Shiokawa et al., 2008; Stancheva et al., 2002). Vor der MBT findet eine schrittweise Hypomethylierung bestimmter Gen-Promoterregionen innerhalb der Blastulaembryonen statt (Stancheva et al., 2002). Ein Verlust der Methylierung, z.B. durch Inaktivierung der DNA-Methyltransferase *xDnmt1*, ist assoziiert mit verfrühter Aktivierung entwicklungsentscheidender Gene und daraus resultierender Apoptose embryonaler Zellen (Stancheva et al., 2002). Die Apoptose verläuft dabei schrittweise und geht nicht mit einem massenhaften Zellzerfall einher (Stancheva et al., 2001). Die höchste Anzahl Hypomethylierungen tritt im NF-Stadium 9 auf (Stancheva and

Diskussion

Meehan, 2000). Bis dahin konnte eine starke Expression des Trim7 besonders im animalen Pol der Embryonen nachgewiesen werden (Abb. 22). Im animalen Pol befindliche DNA weist ein bis dreimal stärkere Methylierung als DNA der vegetalen Zellen auf (Stancheva and Meehan, 2000). Wahrscheinlich greift Trim7 regulierend in die Methylierung der DNA ein. So könnte eine Hypomethylierung entsprechender Promotoren durch Bindung via Zinkfingermotiv erzielt werden (Ruzov et al., 2004). Durch Hypomethylierung innerhalb der Furchungsteilungen scheint der Tumorsuppressor p53 stabilisiert zu werden, wodurch eine Apoptose entsprechender Zellen eingeleitet werden kann (Stancheva et al., 2001). Im Hinblick auf die Kanzerogenese ist eine Stabilisierung des p53 und damit eine Kontrolle der Zellsynthese kontraproduktiv. In wie weit Trim7 die Regulation des p53 beeinflusst, müssten weitere Studien zeigen. Zudem müssten diverse Gewebearten auf in die Analyse einbezogen werden. Neben TRIM7 zeigen Nichtkleinzellige Bronchialkarzinome eine Überexpression des TRIM59 (Zhan et al., 2015). In den Bronchialepithelzellen konnte jedoch kein Einfluss des TRIM59 auf p53 festgestellt werden, während intestinale Zellen mit Überexpression des TRIM59 eine vermehrte Inaktivität des p53 aufwiesen (Valiyeva et al., 2011).

Zusammenfassend scheint Trim7 wesentlich am Voranschreiten der Zellproliferation verantwortlich zu sein, in dem es regulierend in die Zellsynthese und –proliferation eingreift. Dies beschränkt sich jedoch nur auf die Furchungsteilungen, da keine Expression des Trim7 nach der MBT nachgewiesen werden kann (Abb. 23, 24, 29) Welche Prozesse durch Trim7 im Einzelnen beeinflusst werden, müssten weitere Expressionsstudien zeigen.

Alle aufgeführten Studien des Trim7 beschränken sich auf Untersuchungen in Säugetierzellen. Anhand der Phylogenie sowie des Aminosäuresequenzvergleiches werden die erheblichen Unterschiede zwischen Amphibien und Mammalia deutlich (vgl. Diskussion 4.2.2). Selbst in der Syntenieanalyse können kaum Gemeinsamkeiten zwischen *Xenopus laevis* und den Mammalia dargestellt werden. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass das Trim7 des *Xenopus laevis* eine andere Funktion erfüllt als das TRIM7 der Mammalia. Zudem beziehen sich die Ergebnisse dieser Studien meist auf Embryonen in fortgeschrittener Entwicklung, während sich die in dieser Arbeit geschilderten Ergebnisse auf die frühe Embryonalentwicklung beziehen.

Durch Mikroinjektionen in *Xenopus* Embryonen könnte ein Funktionsverlust oder -steigerung des Trim7 erzielt werden. Auf Grund des maternalen Expressionsmusters könnten mögliche zugeführte Schäden auch einen Stop der Embryonalentwicklung bedeuten. Zur besseren Vergleichbarkeit bzw. zur Einordnung gemachter Ergebnisse in den aktuellen Forschungshintergrund sollte sich eine Expressionsanalyse des Trim7 in Geweben des adulten *Xenopus laevis* als auch eine Darstellung der zellulären Lokalisation des Trim7 anschließen.

Bis zur Darstellung dieser Expressionen kann die Funktion des Trim7 nur vermutet werden.

6 Zusammenfassung

TRIM's gehören zur RBCC-Familie und sind gekennzeichnet durch einen stark konservierten Aufbau. Als potentielle E3 Ligasen sind sie wesentlich im Zellstoffwechsel involviert, indem sie die Initiation des Proteinabbaus im Proteasom durch Ubiquitin koordinieren. Hier sind besonders die immunologische Zellabwehr und die Kanzerogenese zu nennen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Modellorganismus *Xenopus laevis* ausgewählt, um die Expression von Trim23 und Trim7 während der Embryonalentwicklung zu charakterisieren. Zeitliche Expressionsanalysen zeigten für beide Trims eine maternale Expression. Im Gegensatz zu Trim7 wurden für Trim23 Transkripte in dem frühen Schwanzknospenstadium (ab NF-Stadium 27) nachgewiesen. In der räumlichen Expressionsanalyse zeigten beide Trims eine Expression im animalen Pol innerhalb der Blastula-Stadien. Mit fortschreitender Entwicklung wurde für beide Trims eine Expression in den Augenvesikeln und in den kaudalen Abschnitten des Neuralrohres nachgewiesen.

Für Trim23 konnte in der phylogenetischen Analyse eine starke Homologie zwischen den dargestellten Organismen gezeigt werden. Besonders starke Übereinstimmung bestand in der für Trim23 charakteristischen ARD1-(ADP- ribosylation factor domain protein 1) Domäne mit putativer GTPase Funktion. In Mausembryonen wurde eine Expression des Trim23 an Lysosomen bzw. Golgi-Apparat nachgewiesen. Eine Beteiligung des Trim23 an zellulären Transportprozessen zur Regulation der Proteinhomöostase ist deshalb wahrscheinlich.

Der Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen *Xenopus* Trim7 und TRIM7 vom Menschen und der Maus ergab eine Übereinstimmung von nur 33% (Identität) während die genomische Organisation deutliche Unterschiede zeigte. Einzig die SPRY/PRY-Domäne zeigte in allen dargestellten Organismen hohe Übereinstimmungen. Als Interaktionsmodul vermittelt diese Domäne allgemein die Substratbindung an Ubiquitin. Für Trim7, auch als GNIP (Glykogenin Interaktions Protein 1) bekannt, vermittelt sie auch die Interaktion mit Glykogenin innerhalb der Glykogensynthese.

Abschließend betrachtet sind sowohl für Trim23 als auch für Trim7 die eigentlichen Funktionen noch weitestgehend unklar. Die vorliegende Expressionsanalyse des Trim23 und Trim7 bildet lediglich den Beginn einer notwendigen Forschungsreihe zur Analyse der Funktion beider TRIM's innerhalb der Embryonalentwicklung.

7 Literaturverzeichnis

- Akitaya, T., and Bronner-Fraser, M. (1992). Expression of cell adhesion molecules during initiation and cessation of neural crest cell migration. *Dev. Dyn.* *194*, 12–20.
- Almagro, R.M., Roger, A.J., Gutiérrez, F.J.R., Díaz, R.S., Cardiel, M.H., and Maestrojuan, J.J.S. (2015). Association of anti-Ro52, anti-Ro60 and anti-La antibodies with diagnostic, clinical and laboratory features in a referral hospital in Jerez, Spain. *Reumatol. Clin.*
- Alonso, M.D., Lomako, J., Lomako, W.M., and Whelan, W.J. (1995). A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J.* *9*, 1126–1137.
- Arata, Y., Takagi, H., Sako, Y., and Sawa, H. (2014). Power law relationship between cell cycle duration and cell volume in the early embryonic development of *Caenorhabditis elegans*. *Front. Physiol.* *5*, 529.
- Ardley, H.C., Hung, C.-C., and Robinson, P.A. (2005). The aggravating role of the ubiquitin–proteasome system in neurodegeneration. *FEBS Lett.* *579*, 571–576.
- Arimoto, K., Funami, K., Saeki, Y., Tanaka, K., Okawa, K., Takeuchi, O., Akira, S., Murakami, Y., and Shimotohno, K. (2010). Polyubiquitin conjugation to NEMO by tripartite motif protein 23 (TRIM23) is critical in antiviral defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 15856–15861.
- Arnason, T., and Ellison, M.J. (1994). Stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* is strongly correlated with assembly of a novel type of multiubiquitin chain. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 7876–7883.
- Bailey, A.P., Bhattacharyya, S., Bronner-Fraser, M., and Streit, A. Lens Specification Is the Ground State of All Sensory Placodes, from which FGF Promotes Olfactory Identity. *Dev. Cell* *11*, 505–517.
- Baqué, S., Guinovart, J.J., and Ferrer, J.C. Glycogenin, the primer of glycogen synthesis, binds to actin. *FEBS Lett.* *417*, 355–359.
- Beckhelling, C., Penny, C., Clyde, S., and Ford, C. (1999). Timing of calcium and protein synthesis requirements for the first mitotic cell cycle in fertilised *Xenopus* eggs. *J. Cell Sci.* *112*, 3975–3984.
- Benoit, B., He, C.H., Zhang, F., Votruba, S.M., Tadros, W., Westwood, J.T., Smibert, C.A., Lipshitz, H.D., and Theurkauf, W.E. (2009). An essential role for the RNA-binding protein Smaug during the *Drosophila* maternal-to-zygotic transition. *Development* *136*, 923–932.
- Béraud-Dufour, S., Paris, S., Chabre, M., and Antonny, B. (1999). Dual Interaction of ADP Ribosylation Factor 1 with Sec7 Domain and with Lipid Membranes during Catalysis of Guanine Nucleotide Exchange. *J. Biol. Chem.* *274*, 37629–37636.
- Bielskienė, K., Bagdonienė, L., Mozūraitienė, J., Kazbarienė, B., and Janulionis, E. (2015). E3 ubiquitin ligases as drug targets and prognostic biomarkers in melanoma. *Medicina (Mex.)* *51*, 1–9.
- Bumcrot, D.A., and McMahon, A.P. Somite Differentiation: Sonic signals somites. *Curr. Biol.* *5*, 612–614.
- Burgess, D., Zhang, Y., Siefker, E., Vaca, R., Kuracha, M.R., Reneker, L., Overbeek, P.A., and Govindarajan, V. (2010). Activated Ras alters lens and corneal development through induction of distinct downstream targets. *BMC Dev. Biol.* *10*, 13–13.
- Caceres, A., Shang, F., Wawrousek, E., Liu, Q., Avidan, O., Cvekl, A., Yang, Y., Haririnia, A., Storaska, A., Fushman, D., et al. (2010). Perturbing the Ubiquitin Pathway Reveals How Mitosis Is

Literaturverzeichnis

- Hijacked to Denucleate and Regulate Cell Proliferation and Differentiation In Vivo. *PLoS ONE* 5, e13331.
- Cai, L., and Brown, D.D. (2004). Expression of type II iodothyronine deiodinase marks the time that a tissue responds to thyroid hormone-induced metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 266, 87–95.
- Cao, Y., Skurat, A.V., DePaoli-Roach, A.A., and Roach, P.J. (1993). Initiation of glycogen synthesis. Control of glycogenin by glycogen phosphorylase. *J. Biol. Chem.* 268, 21717–21721.
- Cao, Y., Zhao, H., Hollemann, T., Chen, Y., and Grunz, H. (2001). Tissue-specific expression of an Ornithine decarboxylase paralogue, XODC2, in *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* 102, 243–246.
- Capdevila, J., Tabin, C., and Johnson, R.L. (1998). Control of Dorsal-Ventral Somite Patterning by Wnt-1 and β -Catenin. *Dev. Biol.* 193, 182–194.
- Carbe, C., and Zhang, X. (2011). Lens induction requires attenuation of ERK signaling by Nf1. *Hum. Mol. Genet.* 20, 1315–1323.
- Chae, K.-S., Oh, K.-S., and Dryer, S.E. (2005). Growth Factors Mobilize Multiple Pools of K_{Ca} Channels in Developing Parasympathetic Neurons: Role of ADP-Ribosylation Factors and Related Proteins. *J. Neurophysiol.* 94, 1597–1605.
- Chakraborty, A., Diefenbacher, M.E., Mylona, A., Kassel, O., and Behrens, A. (2015). The E3 ubiquitin ligase Trim7 mediates c-Jun/AP-1 activation by Ras signalling. *Nat Commun* 6.
- Chen, Y., Guo, Y., Yang, H., Shi, G., Xu, G., Na, Y., Shi, J., and Chen, D. (2015). TRIM66 overexpression contributes to osteosarcoma carcinogenesis and indicates poor survival outcome. *Oncotarget Adv. Online Publ.* Page 9.
- Chesnel, F., Vignaux, F., Richard-Parpaillon, L., Huguet, A., and Kubiak, J.Z. (2005). Differences in regulation of the first two M-phases in *Xenopus laevis* embryo cell-free extracts. *Dev. Biol.* 285, 358–375.
- Chow, R.L., and Lang, R.A. (2001). EARLY EYE DEVELOPMENT IN VERTEBRATES. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 255–296.
- Colombo, M.I., Inglese, J., D'Souza-Schorey, C., Beron, W., and Stahl, P.D. (1995). Heterotrimeric G Proteins Interact with the Small GTPase ARF: POSSIBILITIES FOR THE REGULATION OF VESICULAR TRAFFIC. *J. Biol. Chem.* 270, 24564–24571.
- Conwell, S.E., White, A.E., Harper, J.W., and Knipe, D.M. (2015). Identification of TRIM27 as a Novel Degradation Target of Herpes Simplex Virus 1 ICP0. *J. Virol.* 89, 220–229.
- Cox, T.C., Allen, L.R., Cox, L.L., Hopwood, B., Goodwin, B., Haan, E., and Suthers, G.K. (2000). New mutations in MID1 provide support for loss of function as the cause of X-linked Opitz syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2553–2562.
- Crump, D., Werry, K., Veldhoen, N., Van Aggelen, G., and Helbing, C.C. (2002). Exposure to the herbicide acetochlor alters thyroid hormone-dependent gene expression and metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Environ. Health Perspect.* 110, 1199–1205.
- Davis, M.E., and Gack, M.U. (2015). Ubiquitination in the Antiviral Immune Response. *Virology* 0, 52–65.
- D'Cruz, A.A., Kershaw, N.J., Chiang, J.J., Wang, M.K., Nicola, N.A., Babon, J.J., Gack, M.U., and Nicholson, S.E. (2013). Crystal structure of the TRIM25 B30.2 (PRYSPRY) domain: a key component of antiviral signalling. *Biochem. J.* 456, 231–240.

Literaturverzeichnis

- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., and Chen, Z.J. Activation of the I κ B Kinase Complex by TRAF6 Requires a Dimeric Ubiquitin-Conjugating Enzyme Complex and a Unique Polyubiquitin Chain. *Cell* 103, 351–361.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., et al. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 36, W465–W469.
- Dereeper, A., Audic, S., Claverie, J.-M., and Blanc, G. (2010). BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC Evol. Biol.* 10, 8–8.
- Díaz, D., Esteban, F.J., Hernández, P., Caballero, J.A., Guevara, A., Dorado, G., and Gálvez, S. (2014). MC64-ClustalWP2: A Highly-Parallel Hybrid Strategy to Align Multiple Sequences in Many-Core Architectures. *PLoS ONE* 9, e94044.
- Dietrich, S., and Gruss, P. (1995). undulated Phenotypes Suggest a Role of Pax-1 for the Development of Vertebral and Extravertebral Structures. *Dev. Biol.* 167, 529–548.
- Donaldson, J.G. (2003). Multiple Roles for Arf6: Sorting, Structuring, and Signaling at the Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* 278, 41573–41576.
- Donaldson, J.G., and Jackson, C.L. (2011). Arf Family G Proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 362–375.
- Fang, S., Lorick, K.L., Jensen, J.P., and Weissman, A.M. (2003). RING finger ubiquitin protein ligases: implications for tumorigenesis, metastasis and for molecular targets in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 13, 5–14.
- Faure, S., de Santa Barbara, P., Roberts, D.J., and Whitman, M. (2002). Endogenous Patterns of BMP Signaling during Early Chick Development. *Dev. Biol.* 244, 44–65.
- Ferrer, J.C., Baqué, S., and Guinovart, J.J. (1997). Muscle glycogen synthase translocates from the cell nucleus to the cytosol in response to glucose. *FEBS Lett.* 415, 249–252.
- Frank, S., Upender, S., Hansen, S.H., and Casanova, J.E. (1998). ARNO Is a Guanine Nucleotide Exchange Factor for ADP-ribosylation Factor 6. *J. Biol. Chem.* 273, 23–27.
- Freemont, P.S. (2000). RING for destruction? *Curr Biol* 10, R84-7.
- Gack, M.U., Albrecht, R.A., Urano, T., Inn, K.-S., Huang, I.-C., Carnero, E., Farzan, M., Inoue, S., Jung, J.U., and García-Sastre, A. (2009). Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by RIG-I. *Cell Host Microbe* 5, 439–449.
- Galan, J.M., and Hagenauer-Tsapis, R. (1997). Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J.* 16, 5847–5854.
- Gao, B., Duan, Z., Xu, W., and Xiong, S. (2009). Tripartite motif-containing 22 inhibits the activity of hepatitis B virus core promoter, which is dependent on nuclear-located RING domain. *Hepatology* 50, 424–433.
- Gerhart, J., Scheinfeld, V.L., Milito, T., Pfautz, J., Neely, C., Fisher-Vance, D., Sutter, K., Crawford, M., Knudsen, K., and George-Weinstein, M. (2011). Myo/Nog cell regulation of bone morphogenetic protein signaling in the blastocyst is essential for normal morphogenesis and striated muscle lineage specification. *Dev. Biol.* 359, 12–25.
- Gilbert, S.F. (2006). *Developmental biology* (Sunderland, Mass: Sinauer Associates, Inc. Publishers).

Literaturverzeichnis

Gilbert, S.F. (2010). *Developmental biology*.

Glickman, M.H., and Ciechanover, A. (2002). The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiol. Rev.* 82, 373–428.

Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J., and Lopez, R. (2010). A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL–EBI. *Nucleic Acids Res.* 38, W695–W699.

Govek, E.-E., Newey, S.E., and Van Aelst, L. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev.* 19, 1–49.

Grütter, C., Briand, C., Capitani, G., Mittl, P.R.E., Papin, S., Tschopp, J., and Grütter, M.G. Structure of the PRYSPRY-domain: Implications for autoinflammatory diseases. *FEBS Lett.* 580, 99–106.

Haigo, S.L., Hildebrand, J.D., Harland, R.M., and Wallingford, J.B. Shroom Induces Apical Constriction and Is Required for Hinge-point Formation during Neural Tube Closure. *Curr. Biol.* 13, 2125–2137.

Harmon Lewis, W. (1906). Experimental studies on the development of the eye in amphibia. III. On the origin and differentiation of the lens. *Am. J. Anat.* 6, 473–509.

Hartley, R.S., Rempel, R.E., and Maller, J.L. (1996). In Vivo Regulation of the Early Embryonic Cell Cycle in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 173, 408–419.

Hartley, R.S., Sible, J.C., Lewellyn, A.L., and Maller, J.L. (1997). A Role for Cyclin E/Cdk2 in the Timing of the Midblastula Transition in *Xenopus* Embryos. *Dev. Biol.* 188, 312–321.

Hattmann, C.J., Kelly, J.N., and Barr, S.D. (2012). TRIM22: A Diverse and Dynamic Antiviral Protein. *Mol. Biol. Int.* 2012, 153415.

Heasman, J. (2006). Patterning the early *Xenopus* embryo. *Development* 133, 1205–1217.

Heggen, M.A., and Bradley, R.S. The Cytoplasmic Domain of *Xenopus* NF-Protocadherin Interacts with TAF1/Set. *Dev. Cell* 4, 419–429.

Henry, J., Mather, I.H., McDermott, M.F., and Pontarotti, P. (1998). B30.2-like domain proteins: update and new insights into a rapidly expanding family of proteins. *Mol. Biol. Evol.* 15, 1696–1705.

Hirano, S., Suzuki, S.T., and Redies, C. (2003). The cadherin superfamily in neural development: diversity, function and interaction with other molecules. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 8, d306-55.

Hofmann, R.M., and Pickart, C.M. Noncanonical MMS2-Encoded Ubiquitin-Conjugating Enzyme Functions in Assembly of Novel Polyubiquitin Chains for DNA Repair. *Cell* 96, 645–653.

Hu, W., Haamedi, N., Lee, J., Kinoshita, T., and Ohnuma, S. (2013). The structure and development of *Xenopus laevis* cornea. *Exp. Eye Res.* 116, 109–128.

Hubrecht-Laboratorium (Embryologisch Instituut), Nieuwkoop, P.D., and Faber, J. (1967). *Normal Tables of Xenopus Laevis: (Daudin) a Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg Till the End of the Metamorphosis (North-Holland)*.

Hyer, J., Mima, T., and Mikawa, T. (1998). FGF1 patterns the optic vesicle by directing the placement of the neural retina domain. *Development* 125, 869–877.

Hyer, J., Kuhlman, J., Afif, E., and Mikawa, T. (2003). Optic cup morphogenesis requires pre-lens ectoderm but not lens differentiation. *Dev. Biol.* 259, 351–363.

Literaturverzeichnis

- Ikedo, K., Orimo, A., Higashi, Y., Muramatsu, M., and Inoue, S. (2000). Efp as a primary estrogen-responsive gene in human breast cancer. *FEBS Lett* 472, 9–13.
- Infantino, M., Meacci, F., Grossi, V., Benucci, M., Morozzi, G., Tonutti, E., Tampoia, M., Ott, A., Meyer, W., Atzeni, F., et al. (2015). Serological epitope profile of anti-Ro52-positive patients with systemic autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.* 17, 365.
- James, L.C., Keeble, A.H., Khan, Z., Rhodes, D.A., and Trowsdale, J. (2007). Structural basis for PRYSPRY-mediated tripartite motif (TRIM) protein function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6200–6205.
- Jevtić, P., and Levy, D.L. (2015). Nuclear size scaling during *Xenopus* early development contributes to the regulation of midblastula transition timing. *Curr. Biol. CB* 25, 45–52.
- Jiang, F., Ramanathan, A., Miller, M.T., Tang, G.-Q., Gale, M., Patel, S.S., and Marcotrigiano, J. (2011). Structural Basis of RNA Recognition and Activation by Innate Immune Receptor RIG-I. *Nature* 479, 423–427.
- Joazeiro, C.A., and Weissman, A.M. (2000). RING Finger Proteins: Mediators of Ubiquitin Ligase Activity. *Cell* 102, 549–552.
- KAI, M., KAITO, C., FUKAMACHI, H., HIGO, T., TA-KAYAMA, E., HARA, H., OHYA, Y., IGARASHI, K., and SHIOKAWA, K. (2003). Overexpression of S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) in *Xenopus* embryos activates maternal program of apoptosis as a [ldquo]fail-safe[rdquo] mechanism of early embryogenesis. *Cell Res* 13, 147–158.
- Kai, M., Ueno, N., and Kinoshita, N. (2015). Phosphorylation-Dependent Ubiquitination of Paraxial Protocadherin (PAPC) Controls Gastrulation Cell Movements. *PLoS ONE* 10, e0115111.
- Kajaste-Rudnitski, A., Marelli, S.S., Pultrone, C., Pertel, T., Uchil, P.D., Mechti, N., Mothes, W., Poli, G., Luban, J., and Vicenzi, E. (2011). TRIM22 Inhibits HIV-1 Transcription Independently of Its E3 Ubiquitin Ligase Activity, Tat, and NF- κ B-Responsive Long Terminal Repeat Elements. *J. Virol.* 85, 5183–5196.
- Kanamarlapudi, V., and Wilson, L.-M. (2011). ADP-ribosylation factor domain protein 1. UCSD-Nat. Mol. Pages UCSD-Nat. Signal. Gatew. [Www Signal-Gatew. Org.](http://www.Signal-Gatew.Org)
- Kang, E.L., Cameron, A.N., Piazza, F., Walker, K.R., and Tesco, G. (2010). Ubiquitin Regulates GGA3-mediated Degradation of BACE1. *J. Biol. Chem.* 285, 24108–24119.
- Karpinka, J.B., Fortriede, J.D., Burns, K.A., James-Zorn, C., Ponferrada, V.G., Lee, J., Karimi, K., Zorn, A.M., and Vize, P.D. (2015). Xenbase, the *Xenopus* model organism database; new virtualized system, data types and genomes. *Nucleic Acids Res.* 43, D756–D763.
- Kawai, T., and Akira, S. (2011). Regulation of innate immune signalling pathways by the tripartite motif (TRIM) family proteins. *EMBO Mol. Med.* 3, 513–527.
- Keller, R., Davidson, L.A., and Shook, D.R. (2003). How we are shaped: The biomechanics of gastrulation. *Differentiation* 71, 171–205.
- Kerosuo, L., and Bronner-Fraser, M. (2012). What's bad in cancer is good in the embryo: Importance of EMT in neural crest development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 320–332.
- Kim, T., and Joo, H. (2010). ClustalXeed: a GUI-based grid computation version for high performance and terabyte size multiple sequence alignment. *BMC Bioinformatics* 11, 467–467.

Literaturverzeichnis

- Kim, S.H., Yamamoto, A., Bouwmeester, T., Agius, E., and Robertis, E.M. (1998). The role of paraxial protocadherin in selective adhesion and cell movements of the mesoderm during *Xenopus* gastrulation. *Development* *125*, 4681–4690.
- Ko, S., Kim, J.Y., Jeong, J., Lee, J.E., Yang, W.I., and Jung, W.H. (2014). The Role and Regulatory Mechanism of 14-3-3 Sigma in Human Breast Cancer. *J. Breast Cancer* *17*, 207–218.
- Koide, T., Hayata, T., and Cho, K.W.Y. (2006). Negative regulation of Hedgehog signaling by the cholesterogenic enzyme 7-dehydrocholesterol reductase. *Development* *133*, 2395–2405.
- Koliopoulos, M.G., Esposito, D., Christodoulou, E., Taylor, I.A., and Rittinger, K. (2016). Functional role of TRIM E3 ligase oligomerization and regulation of catalytic activity. *EMBO J.* e201593741.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* *23*, 2947–2948.
- Lee, J., Platt, K.A., Censullo, P., and Ruiz i Altaba, A. (1997). Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* *124*, 2537–2552.
- Lee, N., Kim, H., Choi, M., Yi, C., and Inn, K. (2015). Regulation of MDA5-MAVS Antiviral Signaling Axis by TRIM25 through TRAF6-mediated NF- κ B Activation. *Mol. Cells*.
- Lee, R.W., Conley, S.K., Gropman, A., Porter, F.D., and Baker, E.H. (2013). Brain Magnetic Resonance Imaging Findings in Smith-Lemli-Opitz Syndrome. *Am. J. Med. Genet. A.* *161*, 2407–2419.
- Letunic, I., Doerks, T., and Bork, P. (2015). SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res.* *43*, D257–D260.
- Li, H., Tao, C., Cai, Z., Hertzler-Schaefer, K., Collins, T.N., Wang, F., Feng, G.-S., Gotoh, N., and Zhang, X. (2014). *Frs2 α* and *Shp2* signal independently of *Gab* to mediate FGF signaling in lens development. *J. Cell Sci.* *127*, 571–582.
- Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., and Lopez, R. (2015). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res.* *43*, W580–W584.
- Lindsten, K., and Dantuma, N.P. (2003). Monitoring the ubiquitin/proteasome system in conformational diseases. *Proteolysis Ageing Age Relat. Dis.* *2*, 433–449.
- Liu, B., Li, N.L., Wang, J., Shi, P.-Y., Wang, T., Miller, M.A., and Li, K. (2014). Overlapping and Distinct Molecular Determinants Dictating the Antiviral Activities of TRIM56 against Flaviviruses and Coronavirus. *J. Virol.* *88*, 13821–13835.
- Liu, W., Lagutin, O.V., Mende, M., Streit, A., and Oliver, G. (2006). Six3 activation of Pax6 expression is essential for mammalian lens induction and specification. *EMBO J.* *25*, 5383–5395.
- Loo, Y.-M., and Gale, M. (2011). Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* *34*, 680–692.
- Luu, O., Damm, E.W., Parent, S.E., Barua, D., Smith, T.H.L., Wen, J.W.H., Lepage, S.E., Nagel, M., Ibrahim-Gawel, H., Huang, Y., et al. (2015). PAPC mediates self/non-self-distinction during Snail1-dependent tissue separation. *J. Cell Biol.* *208*, 839–856.

Literaturverzeichnis

- Ma, Y., Wei, Z., Bast, R.C., Wang, Z., Li, Y., Gao, M., Liu, Y., Wang, X., Guo, C., Zhang, L., et al. (2016). Downregulation of TRIM27 expression inhibits the proliferation of ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *Lab Invest* 96, 37–48.
- Marín, I. (2012). Origin and Diversification of TRIM Ubiquitin Ligases. *PLoS ONE* 7, e50030.
- Martínez-Morales, J.R., Dolez, V., Rodrigo, I., Zaccarini, R., Leconte, L., Bovolenta, P., and Saule, S. (2003). OTX2 Activates the Molecular Network Underlying Retina Pigment Epithelium Differentiation. *J. Biol. Chem.* 278, 21721–21731.
- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Cowley, A.P., and Lopez, R. (2013). Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* 41, W597–W600.
- Meljon, A., Watson, G.L., Wang, Y., Shackleton, C.H., and Griffiths, W.J. (2013). Analysis by liquid chromatography–mass spectrometry of sterols and oxysterols in brain of the newborn Dhcr7(Δ 3-5/T93M) mouse: A model of Smith–Lemli–Opitz syndrome. *Biochem. Pharmacol.* 86, 43–55.
- Meroni, G., and Diez-Roux, G. (2005). TRIM/RBCC, a novel class of “single protein RING finger” E3 ubiquitin ligases. *Bioessays* 27, 1147–1157.
- Moss, J., and Vaughan, M. (1995). Structure and Function of ARF Proteins: Activators of Cholera Toxin and Critical Components of Intracellular Vesicular Transport Processes. *J. Biol. Chem.* 270, 12327–12330.
- Moss, J., and Vaughan, M. (1998). Molecules in the ARF Orbit. *J. Biol. Chem.* 273, 21431–21434.
- Mossessova, E., Corpina, R.A., and Goldberg, J. (2003). Crystal Structure of ARF1•Sec7 Complexed with Brefeldin A and Its Implications for the Guanine Nucleotide Exchange Mechanism. *Mol. Cell* 12, 1403–1411.
- Mu, J., Skurat, A.V., and Roach, P.J. (1997). Glycogenin-2, a Novel Self-glucosylating Protein Involved in Liver Glycogen Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 272, 27589–27597.
- Münsterberg, A.E., Kitajewski, J., Bumcrot, D.A., McMahon, A.P., and Lassar, A.B. (1995). Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. *Genes Dev.* 9, 2911–2922.
- Murphy, C.M., and Michael, W.M. (2013). Control of DNA Replication by the Nucleus/Cytoplasm Ratio in *Xenopus*. *J. Biol. Chem.* 288, 29382–29393.
- Nakagawa, S., and Takeichi, M. (1998). Neural crest emigration from the neural tube depends on regulated cadherin expression. *Development* 125, 2963–2971.
- Napolitano, L.M., and Meroni, G. (2012). TRIM family: Pleiotropy and diversification through homomultimer and heteromultimer formation. *IUBMB Life* 64, 64–71.
- Napolitano, L., Jaffray, E., Hay, R., and Meroni, G. (2011). Functional interactions between ubiquitin E2 enzymes and TRIM proteins. *Biochem J* 434, 309–319.
- Niceta, M., Stellacci, E., Gripp, K.W., Zampino, G., Kousi, M., Anselmi, M., Traversa, A., Ciolfi, A., Stabley, D., Bruselles, A., et al. (2015). Mutations Impairing GSK3-Mediated MAF Phosphorylation Cause Cataract, Deafness, Intellectual Disability, Seizures, and a Down Syndrome-like Facies. *Am. J. Hum. Genet.* 96, 816–825.
- Onai, T., Yu, J.-K., Blitz, I.L., Cho, K.W.Y., and Holland, L.Z. (2010). Opposing Nodal/Vg1 and BMP signals mediate axial patterning in embryos of the basal chordate amphioxus. *Dev. Biol.* 344, 377–389.

Literaturverzeichnis

- Park, K.-S., and Gumbiner, B.M. (2010). Cadherin 6B induces BMP signaling and de-epithelialization during the epithelial mesenchymal transition of the neural crest. *Dev. Camb. Engl.* *137*, 2691–2701.
- Park, K.-S., and Gumbiner, B.M. (2012). Cadherin-6B stimulates an epithelial mesenchymal transition and the delamination of cells from the neural ectoderm via LIMK/cofilin mediated non-canonical BMP receptor signaling. *Dev. Biol.* *366*, 232–243.
- Park, B.-Y., Hong, C.-S., Weaver, J.R., Rosocha, E.M., and Saint-Jeannet, J.-P. (2012). Xaml1/Runx1 is required for the specification of Rohon-Beard sensory neurons in *Xenopus*. *Dev. Biol.* *362*, 65–75.
- Patten, I., and Placzek, M. Opponent Activities of Shh and BMP Signaling during Floor Plate Induction In Vivo. *Curr. Biol.* *12*, 47–52.
- Pickart, C.M. (2001). MECHANISMS UNDERLYING UBIQUITINATION. *Annu. Rev. Biochem.* *70*, 503–533.
- Pomerening, J.R., Kim, S.Y., and Ferrell Jr., J.E. (2005). Systems-Level Dissection of the Cell-Cycle Oscillator: Bypassing Positive Feedback Produces Damped Oscillations. *Cell* *122*, 565–578.
- Poole, E., Groves, I., Macdonald, A., Pang, Y., Alcami, A., and Sinclair, J. (2009). Identification of TRIM23 as a Cofactor Involved in the Regulation of NF- κ B by Human Cytomegalovirus. *J. Virol.* *83*, 3581–3590.
- Pruitt, K.D., Brown, G.R., Hiatt, S.M., Thibaud-Nissen, F., Astashyn, A., Ermolaeva, O., Farrell, C.M., Hart, J., Landrum, M.J., McGarvey, K.M., et al. (2014). RefSeq: an update on mammalian reference sequences. *Nucleic Acids Res.* *42*, D756–D763.
- Puertollano, R., and Bonifacino, J.S. (2004). Interactions of GGA3 with the ubiquitin sorting machinery. *Nat Cell Biol* *6*, 244–251.
- Qiu, F., Xiong, J.-P., Deng, J., and Xiang, X.-J. (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., Albrecht, R.A., Wang, M.K., Maharaj, N.P., Versteeg, G.A., Nistal-Villán, E., García-Sastre, A., and Gack, M.U. (2012). Species-Specific Inhibition of RIG-I Ubiquitination and IFN Induction by the Influenza A Virus NS1 Protein. *PLoS Pathog.* *8*, e1003059.
- Rankin, S., and Kirschner, M.W. (1997). The surface contraction waves of *Xenopus* eggs reflect the metachronous cell-cycle state of the cytoplasm. *Curr. Biol.* *7*, 451–454.
- Rao, P.V. (2008). The pulling, pushing and fusing of lens fibers: A role for Rho GTPases. *Cell Adhes. Migr.* *2*, 170–173.
- Rashid, D., Newell, K., Shama, L., and Bradley, R. (2006). A requirement for NF-protocadherin and TAF1/Set in cell adhesion and neural tube formation. *Dev. Biol.* *291*, 170–181.
- Reddy, B.A., and Etkin, L.D. (1991). A unique bipartite cysteine-histidine motif defines a subfamily of potential zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Res.* *19*, 6330.
- Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzi, L., Riganelli, D., Zanaria, E., Messali, S., Cainarca, S., et al. (2001). The tripartite motif family identifies cell compartments. *Embo J* *20*, 2140–2151.
- Rhodes, D.A., de Bono, B., and Trowsdale, J. (2005). Relationship between SPRY and B30.2 protein domains. Evolution of a component of immune defence? *Immunology* *116*, 411–417.

Literaturverzeichnis

- Ribes, V., Balaskas, N., Sasai, N., Cruz, C., Dessaud, E., Cayuso, J., Tozer, S., Yang, L.L., Novitch, B., Marti, E., et al. (2010). Distinct Sonic Hedgehog signaling dynamics specify floor plate and ventral neuronal progenitors in the vertebrate neural tube. *Genes Dev.* *24*, 1186–1200.
- Robinson, P.A., and Ardley, H.C. (2004). Ubiquitin-protein ligases. *J. Cell Sci.* *117*, 5191.
- Roelink, H., Porter, J., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D., Beachy, P., and Jessell, T. Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* *81*, 445–455.
- Rogers, C.D., Saxena, A., and Bronner, M.E. (2013). Sip1 mediates an E-cadherin-to-N-cadherin switch during cranial neural crest EMT. *J. Cell Biol.* *203*, 835–847.
- Rossi, C.C., Hernandez-Lagunas, L., Zhang, C., Choi, I.F., Kwok, L., Klymkowsky, M., and Artinger, K.B. (2008). Rohon-Beard sensory neurons are induced by BMP4 expressing non-neural ectoderm in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* *314*, 351–361.
- Rossi, C.C., Kaji, T., and Artinger, K.B. (2009). Transcriptional control of Rohon-Beard sensory neuron development at the neural plate border. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *238*, 931–943.
- Ruzov, A., Dunican, D.S., Prokhortchouk, A., Pennings, S., Stancheva, I., Prokhortchouk, E., and Meehan, R.R. (2004). Kaiso is a genome-wide repressor of transcription that is essential for amphibian development. *Development* *131*, 6185–6194.
- Saha, M.S., Miles, R.R., and Grainger, R.M. (1997). Dorsal-Ventral Patterning during Neural Induction in *Xenopus*: Assessment of Spinal Cord Regionalization with *HB9*, a Marker for the Motor Neuron Region. *Dev. Biol.* *187*, 209–223.
- Saint-Jeannet, J.-P., He, X., Varmus, H.E., and Dawid, I.B. (1997). Regulation of dorsal fate in the neuraxis by Wnt-1 and Wnt-3a. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 13713–13718.
- Sander, C., and Schneider, R. (1991). Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins* *9*, 56–68.
- Sardiello, M., Cairo, S., Fontanella, B., Ballabio, A., and Meroni, G. (2008). Genomic analysis of the TRIM family reveals two groups of genes with distinct evolutionary properties. *BMC Evol. Biol.* *8*, 225.
- Satterwhite, L.L., Lohka, M.J., Wilson, K.L., Scherson, T.Y., Cisek, L.J., Corden, J.L., and Pollard, T.D. (1992). Phosphorylation of myosin-II regulatory light chain by cyclin-p34cdc2: a mechanism for the timing of cytokinesis. *J. Cell Biol.* *118*, 595–605.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., and Ponting, C.P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 5857–5864.
- Scott, P.M., Bilodeau, P.S., Zhdankina, O., Winistorfer, S.C., Hauglund, M.J., Allaman, M.M., Kearney, W.R., Robertson, A.D., Boman, A.L., and Piper, R.C. (2004). GGA proteins bind ubiquitin to facilitate sorting at the trans-Golgi network. *Nat Cell Biol* *6*, 252–259.
- Segerdell, E., Ponferrada, V.G., James-Zorn, C., Burns, K.A., Fortriede, J.D., Dahdul, W.M., Vize, P.D., and Zorn, A.M. (2013). Enhanced XAO: the ontology of *Xenopus* anatomy and development underpins more accurate annotation of gene expression and queries on Xenbase. *J. Biomed. Semant.* *4*, 31–31.
- Selyunin, A.S., Reddick, L.E., Weigele, B.A., and Alto, N.M. (2014). Selective Protection of an ARF1-GTP Signaling Axis by a Bacterial Scaffold Induces Bidirectional Trafficking Arrest. *Cell Rep.* *6*, 878–891.

Literaturverzeichnis

- Shiokawa, K., Aso, M., Kondo, T., Uchiyama, H., Kuroyanagi, S., Takai, J.-I., Takahashi, S., Kajitani, M., Kaito, C., Sekimizu, K., et al. (2008). Gene Expression in Pre-MBT Embryos and Activation of Maternally-Inherited Program of Apoptosis to be Executed at around MBT as a Fail-Safe Mechanism in *Xenopus* Early Embryogenesis. *Gene Regul. Syst. Biol.* *2*, 213–231.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., et al. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* *7*, 539–539.
- Sive, H.L., Grainger, R.M., and Harland, R.M. (2000). Early development of *Xenopus laevis*: a laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, NY:).
- Sjödäl, M., Edlund, T., and Gunhaga, L. Time of Exposure to BMP Signals Plays a Key Role in the Specification of the Olfactory and Lens Placodes Ex Vivo. *Dev. Cell* *13*, 141–149.
- Skurat, A.V., Cao, Y., and Roach, P.J. (1993). Glucose control of rabbit skeletal muscle glycogenin expressed in COS cells. *J. Biol. Chem.* *268*, 14701–14707.
- Skurat, A.V., Dietrich, A.D., Zhai, L., and Roach, P.J. (2002). GNIP, a Novel Protein That Binds and Activates Glycogenin, the Self-glycosylating Initiator of Glycogen Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* *277*, 19331–19338.
- Skurat, A.V., Dietrich, A.D., and Roach, P.J. (2006). INTERACTION BETWEEN GLYCOGENIN AND GLYCOGEN SYNTHASE. *Arch. Biochem. Biophys.* *456*, 93–97.
- Spang, A., Matsuoka, K., Hamamoto, S., Schekman, R., and Orci, L. (1998). Coatamer, Arf1p, and nucleotide are required to bud coat protein complex I-coated vesicles from large synthetic liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 11199–11204.
- Spence, J., Sadis, S., Haas, A.L., and Finley, D. (1995). A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 1265–1273.
- Stancheva, I., and Meehan, R.R. (2000). Transient depletion of xDnmt1 leads to premature gene activation in *Xenopus* embryos. *Genes Dev.* *14*, 313–327.
- Stancheva, I., Hensey, C., and Meehan, R.R. (2001). Loss of the maintenance methyltransferase, xDnmt1, induces apoptosis in *Xenopus* embryos. *EMBO J.* *20*, 1963–1973.
- Stancheva, I., El-Maarri, O., Walter, J., Niveleau, A., and Meehan, R.R. (2002). DNA Methylation at Promoter Regions Regulates the Timing of Gene Activation in *Xenopus laevis* Embryos. *Dev. Biol.* *243*, 155–165.
- Sun, L., and Chen, Z.J. (2004). The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* *16*, 119–126.
- Swapna, I., and Borodinsky, L.N. (2012). Interplay between electrical activity and bone morphogenetic protein signaling regulates spinal neuron differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 16336–16341.
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Roth, A., Santos, A., Tsafou, K.P., et al. (2015). STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* *43*, D447–D452.
- Tadros, W., and Lipshitz, H.D. (2009). The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development* *136*, 3033–3042.
- Thomas, M.C., and Chiang, C.-M. (2006). The general transcription machinery and general cofactors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *41*, 105–178.

Literaturverzeichnis

- Tora, L. (2002). A unified nomenclature for TATA box binding protein (TBP)-associated factors (TAFs) involved in RNA polymerase II transcription. *Genes Dev.* *16*, 673–675.
- Torii, T., Miyamoto, Y., Sanbe, A., Nishimura, K., Yamauchi, J., and Tanoue, A. (2010). Cytohesin-2/ARNO, through Its Interaction with Focal Adhesion Adaptor Protein Paxillin, Regulates Preadipocyte Migration via the Downstream Activation of Arf6. *J. Biol. Chem.* *285*, 24270–24281.
- Torii, T., Miyamoto, Y., Tago, K., Sango, K., Nakamura, K., Sanbe, A., Tanoue, A., and Yamauchi, J. (2014). Arf6 Guanine Nucleotide Exchange Factor Cytohesin-2 Binds to CCDC120 and Is Transported Along Neurites to Mediate Neurite Growth. *J. Biol. Chem.* *289*, 33887–33903.
- Torok, M., and Etkin, L.D. (2001). Two B or not two B? Overview of the rapidly expanding B-box family of proteins. *Differentiation* *67*, 63–71.
- Tsuchida, T., Zou, J., Saitoh, T., Kumar, H., Abe, T., Matsuura, Y., Kawai, T., and Akira, S. The Ubiquitin Ligase TRIM56 Regulates Innate Immune Responses to Intracellular Double-Stranded DNA. *Immunity* *33*, 765–776.
- Valiyeva, F., Jiang, F., Elmaadawi, A., Moussa, M., Yee, S.-P., Raptis, L., Izawa, J.I., Yang, B.B., Greenberg, N.M., Wang, F., et al. (2011). Characterization of the Oncogenic Activity of the Novel TRIM59 Gene in Mouse Cancer Models. *Am. Assoc. Cancer Res.* *10*, 1229–1240.
- Vichi, A., Payne, D.M., Pacheco-Rodriguez, G., Moss, J., and Vaughan, M. (2005). E3 ubiquitin ligase activity of the trifunctional ARD1 (ADP-ribosylation factor domain protein 1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 1945–1950.
- Viskupic, E., Cao, Y., Zhang, W., Cheng, C., DePaoli-Roach, A.A., and Roach, P.J. (1992). Rabbit skeletal muscle glycogenin. Molecular cloning and production of fully functional protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *267*, 25759–25763.
- Vitale, N., Moss, J., and Vaughan, M. (1996). ARD1, a 64-kDa bifunctional protein containing an 18-kDa GTP-binding ADP-ribosylation factor domain and a 46-kDa GTPase-activating domain. *Proc Natl Acad Sci U A* *93*, 1941–1944.
- Vitale, N., Moss, J., and Vaughan, M. (1998). Molecular Characterization of the GTPase-activating Domain of ADP-ribosylation Factor Domain Protein 1 (ARD1). *J. Biol. Chem.* *273*, 2553–2560.
- Vitale, N., Ferrans, V.J., Moss, J., and Vaughan, M. (2000). Identification of Lysosomal and Golgi Localization Signals in GAP and ARF Domains of ARF Domain Protein 1. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 7342–7352.
- Wang, J., Liu, B., Wang, N., Lee, Y.-M., Liu, C., and Li, K. (2011). TRIM56 Is a Virus- and Interferon-Inducible E3 Ubiquitin Ligase That Restricts Pestivirus Infection. *J. Virol.* *85*, 3733–3745.
- Weinert, C., Morger, D., Djekic, A., Grütter, M.G., and Mittl, P.R.E. (2015). Crystal structure of TRIM20 C-terminal coiled-coil/B30.2 fragment: implications for the recognition of higher order oligomers. *Sci. Rep.* *5*, 10819.
- Winklbauer, R., and Keller, R.E. (1996). Fibronectin, Mesoderm Migration, and Gastrulation in *Xenopus*. *Dev. Biol.* *177*, 413–426.
- Woo, J.S., Imm, J.H., Min, C.K., Kim, K.J., Cha, S.S., and Oh, B.H. (2006). Structural and functional insights into the B30.2/SPRY domain. *Embo J* *25*, 1353–1363.
- Xu, P., Duong, D.M., Seyfried, N.T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D., and Peng, J. (2009). Quantitative Proteomics Reveals the Function of Unconventional Ubiquitin Chains in Proteasomal Degradation. *Cell* *137*, 133–145.

Literaturverzeichnis

- Yajima, H., Suzuki, M., Ochi, H., Ikeda, K., Sato, S., Yamamura, K., Ogino, H., Ueno, N., and Kawakami, K. (2014). Six1 is a key regulator of the developmental and evolutionary architecture of sensory neurons in craniates. *BMC Biol.* *12*, 40–40.
- Yang, H., Ji, X., Zhao, G., Ning, J., Zhao, Q., Aiken, C., Gronenborn, A.M., Zhang, P., and Xiong, Y. (2012). Structural insight into HIV-1 capsid recognition by rhesus TRIM5 α . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 18372–18377.
- Yona, G., Linial, N., Tishby, N., and Linial, M. (1998). A Map of the Protein Space: An Automatic Hierarchical Classification of all Protein Sequences. pp. 212–221.
- Yudina, Z., Roa, A., Johnson, R., Biris, N., de Souza Aranha Vieira, D.A., Tshiperson, V., Reszka, N., Taylor, A.B., Hart, P.J., Demeler, B., et al. (2015). RING dimerization links higher-order assembly of TRIM5 α to synthesis of K63-linked polyubiquitin. *Cell Rep.* *12*, 788–797.
- Zhai, L., Dietrich, A., Skurat, A.V., and Roach, P.J. (2004). Structure–function analysis of GNIP, the glycogenin-interacting protein. *Arch. Biochem. Biophys.* *421*, 236–242.
- Zhan, W., Han, T., Zhang, C., Xie, C., Gan, M., Deng, K., Fu, M., and Wang, J.-B. (2015). TRIM59 Promotes the Proliferation and Migration of Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Upregulating Cell Cycle Related Proteins. *PLoS ONE* *10*, e0142596.
- Zhang, L., Mei, Y., Fu, N., Guan, L., Xie, W., Liu, H., Yu, C., Yin, Z., Yu, V.C., and You, H. (2012a). TRIM39 regulates cell cycle progression and DNA damage responses via stabilizing p21. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 20937–20942.
- Zhang, L., Huang, N.-J., Chen, C., Tang, W., and Kornbluth, S. (2012b). Ubiquitylation of p53 by the APC/C inhibitor Trim39. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 20931–20936.
- Zhao, K.-W., Sikriwal, D., Dong, X., Guo, P., Sun, X., and Dong, J.-T. (2011). Estrogen causes degradation of KLF5 by inducing the E3 ubiquitin ligase EFP in ER-positive breast cancer cells. *Biochem. J.* *437*, 323–333.
- Zimmerman, L.B., De Jesús-Escobar, J.M., and Harland, R.M. The Spemann Organizer Signal noggin Binds and Inactivates Bone Morphogenetic Protein 4. *Cell* *86*, 599–606.
- Zygar, C.A., Cook, T.L., and Grainger, R.M. (1998). Gene activation during early stages of lens induction in *Xenopus*. *Development* *125*, 3509–3519.
- [Xenopus laevis stage series: complete - Xenbase | A Xenopus laevis and Xenopus tropicalis resource.](#)

8 Thesen

1. Trim23 wird sowohl maternal als auch ab dem späten Schwanzknospenstadium (ab NF-Stadium 27) exprimiert.
2. Trim23 wird in der sich entwickelnden Linse sowie in kaudalen Abschnitten des Neuralrohrs exprimiert.
3. Trim23 ist evolutionär stark konserviert. Dies zeigt sich anhand der großen Identität von 93% zwischen der menschlichen und der *Xenopus laevis* Trim23 Aminosäuresequenz.
4. Trim23 besitzt eine ARD1 Domäne mit putativer GTPase- Funktion. Eine Beteiligung des Trim23 an zellulären Transportprozessen zur Regulation der Proteinhomöostase ist deshalb wahrscheinlich.
5. Trim7 wird ausschließlich maternal exprimiert.
6. Die Expression des Trim7 beschränkt sich auf den animalen Pol innerhalb der Blastula Stadien. Mit fortschreitender Entwicklung wird Trim7 in den kaudalen Abschnitten des Neuralrohres und in den Augenvesikeln exprimiert.
7. Auf Grund geringer Identität von 33% zwischen der menschlichen und der *Xenopus laevis* Trim7 Aminosäuresequenz kann nicht von einer Konservierung gesprochen werden.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Entwicklungszyklus des <i>Xenopus laevis</i>	2
Abbildung 2 Gastrulation.....	4
Abbildung 3 Neurulation	5
Abbildung 4 Polarisierung des Neuralrohres	8
Abbildung 5 Somitenbildung	10
Abbildung 6 Augenentwicklung	11
Abbildung 7 Ubiquitinylierung	13
Abbildung 8 Schematische Darstellung des Aufbaus der Proteine der TRIM Familie.....	14
Abbildung 9 schematische Darstellung des pCMV-Sport6 Vektors.....	19
Abbildung 10 Phylogenetischer Stammbaum Trim23	27
Abbildung 11 Sequenzvergleiche des Trim23	28
Abbildung 12 phylogenetischer Stammbaum Trim7	29
Abbildung 13 Sequenzvergleich Trim7	30
Abbildung 14 Syntenie für Trim23	31
Abbildung 15 Syntenie für Trim7	32
Abbildung 16 Expression Trim23 in NF-Stadien 0-6	33
Abbildung 17 Expression Trim23 im NF-Stadium 12	33
Abbildung 18 Expression Trim23 im NF Stadium 21	34
Abbildung 19 Expression Trim23 im NF Stadium 30	35
Abbildung 20 Expression Trim23 im NF Stadium 33	36
Abbildung 21 Expression Trim23 im NF Stadium 36	37
Abbildung 22 Expression Trim7 in NF-Stadien 0-6	38
Abbildung 23 Expression Trim7 im NF-Stadium 12	38
Abbildung 24 Expression Trim7 im NF Stadium 21	39
Abbildung 25 Expression Trim7 im NF Stadium 30	39
Abbildung 26 Expression Trim7 im NF Stadium 33	40
Abbildung 27 Expression Trim7 im NF Stadium 36	41
Abbildung 28 RNA Einstellung mittels RT-PCR	42
Abbildung 29 RT-PCR Trim7 und Trim23 in <i>Xenopus laevis</i> Embryonen.....	43
Abbildung 30 Signalkaskade RIG I	50
Abbildung 31 Trim25 des <i>Xenopus laevis</i>	50
Abbildung 32 Trim27 des <i>Xenopus laevis</i>	51
Abbildung 33 Interaktion Trim27 des Menschen	52
Abbildung 34 Sequenzvergleich Trim7 und Trim25 des <i>Xenopus laevis</i>	53
Abbildung 35 Trim39 des <i>Xenopus laevis</i>	53
Abbildung 36 Sequenzvergleich Trim7 und Trim25 des <i>Xenopus laevis</i>	54

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Rehydrierungsschritte	22
Tabelle 3 Acetylierung der Embryonen	22
Tabelle 4 Refixierung der Embryonen	23
Tabelle 5 Reinigung der Embryonen	23
Tabelle 6 Antikörperinkubation	23
Tabelle 7 Färbung der Embryonen.....	24
Tabelle 8 Abstoppen der Färbung	24

Anhang A

A.1 Material

A.1.1 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma
Agarose NEEO Ultra- Qualität	Roth
Albumin	Roth
Anti- Digoxigenin-AP Fab-fragments	Roche
Blockierungsreagenz (<i>Blocking Reagent</i>)	Roche
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP)	Roche
CHAPS	Roth
L-Cystein-Hydrochlorid-Monohydrat	Appli Chem
dNTP mix 10mM	New England Biolabs
DIG RNA Labeling Mix	Roche
DNA Ladder, O'GeneRuler™ 1kb, 500bp	Fermentas
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	Q Biogene
Formaldehyd (säurefrei 37%)	Roth
Formamid	Roth
Gelatin	Roth
Glutardialdehyd-Lösung	Sigma
Glukose	Merck
Glycerol	Roth
HCG (humanes Choriongonadotropin)	PROSPEC GIBLO
Heparin	Sigma
Horse Serum	GIBCO-Lifetechnologies
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumhydrogenphosphat	Roth
Calcium Chlorid Dihydrat	Sigma
Ladepuffer	New England Biolabs
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Sigma
Maleinsäure	Roth
Methanol	Roth
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Roth
Mowiol® 4-88 Reagent	Calbiochem
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Alkalische Phosphat Substrat Lösung (NBT)	Roche
Paraformaldehyd	Roth
Salzsäure (36 %)	Roth
Triethanolamin	Sigma
Tris- Hydrochlorid	Roth

A.1.2 Puffer und Lösungen

APB (1x) (pH 9,5): 100mM Tris/HCl (1M, pH9,5); 50mM MgCl₂ (1M); 100mM NaCl (5M); 0,1% Tween-20 (20%)

APB Färbelösung: 1x APB; 150mg/ml NBT; 50mg/ml BCIP

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

Denhart's (100 x): 2% BSA; 2% PVP; 2% Ficoll 400

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

HCG: 10.000U/Glasröhrchen HCG (Sigma) wurden in 10ml ddH₂O für eine Stocklösung von 1000 U/ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Hybridisierungslösung: 50% Formamid (deionisiert); 5x SSC (20x); 1mg/ml Torula RNA (50mg/ml); 100µg/ml Heparin (10mg/ml); 1x Denhart's (100 x); 0,1% Tween-20 (20%); 0,1% CHAPS (10%); 10mM EDTA (0,5M)

MAB (2 x) (pH7,5): 200mM Maleinsäure; 300mM NaCl

MBS (5x): 50mM HEPES, pH7,4; 440mM NaCl; 5mM KCl; 12mM NaHCO₃; 4,1mM MgSO₄; 2,05mM CaCl₂; 3,3mM KNO₃; pH7,4; steril filtrieren.

MEM (10x) (pH 7,4): 1M MOPS; 20mM EGTA; 10mM MgSO₄

MEMFA: 1x MEM (10x), 3,7% Formaldehyd (37%)

Mowiol-Lösung: 9,6g Mowiol in 19,35ml 100% Glycerin lösen; 1Std rühren. Zugabe von 24ml dH₂O, 2 Std. rühren. Zugabe von 48ml 0,2M Tris-HCl (pH8,5); 10 min erhitzen auf 50°C; 15min bei 5000 U/min abzentrifugieren. Überstand aliquotieren und bei -20°C lagern.

Paraformaldehyd: 8% Paraformaldehyd; 1x PBS (10x)

PBS (10x): 0,1M NaH₂PO₄ x 12H₂O; 20mM KH₂PO₄; 1,4M NaCl; 28mM KCl

PTw (1x): 1x PBS (10x); 0,1% Tween- 20

SSC (20x) (pH7,0): 0,3M NaCitrat x 2H₂O; 3M NaCl

Triethanolamin (pH7,5): 0,1M Triethanolamin x HCl

A.1.3 Kits

Bezeichnung
QIAquick PCR Purification Kit
RNeasy Mini Kit
SuperScript[™]II RT

Hersteller
QIAGEN
QIAGEN
Fermentas

Anhang A

A.1.4 Enzyme

Für die jeweiligen Enzyme wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet.

Bezeichnung	Hersteller
Deoxyribonuklease (DNaseI RNase free)	Fermentas
Proteinase K	Merck
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
RNase A	Fermentas
RNase T ₁	Roche
RNase OUT	Invitrogen
Superscript II Tm RT	Fermentas
Taq-Polymerase	New England Biolabs
T7 RNA- Polymerase	Roche

A.1.5 verwendete Konstrukte für whole mount *in situ* Hybridisierung

Trim7: BioScience LifeSciences; Nottingham/UK; Vektor: pCMV-SPORT6 (Abb.9)

Trim23 BioScience LifeSciences, Nottingham/ UK; Vektor: pCMV-SPORT6 (Abb.9)

A.1.6 PCR-Primer

Name	Sequenz	Temperatur
x1_trim7_F	5' ATGGGCAGGAGGCTAAAAAT3'	58°C
x1_trim7_R	5' ATATCCCAATCCCCCAATGT3'	58°C
x1_trim-23_F	5' CCATCCCAACAATTGGTTTG3'	64°C
x1_trim-23_R	5' CATCACGCAGTTCCTTCTCA3'	64°C
x1_ODC_F	5' GCCATTGTGAAGACTCTCTCCATTC3'	
x1_ODC_R	5' TTCGGGTGATTCCTT3'	

A.1.7 Geräte, Zubehör, Mikroskope

Bezeichnung	Hersteller
Bio-Rad Gel Doc 2000	Bio-Rad Laboratorien, USA
Inkubator WB 22K	Mytron
Nanodrop®Spektrophotometer ND-1000	PeqLab Biotechnologie GmbH
Kunststoffform zum Einbetten	(Peel-A-Way®) Polysciences Inc.
Kühlzentrifuge 2K15	Sigma
Microtom Leica VT 100 Vibratom	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Mikroskop	Schott
Mikroskop Stemi 2000	Zeiss
Mikrowelle	Panasonic
Olympus SZX12	Olympus Microscopy, Japan
PCR Tubes Cycler Mini star silverline	VWR

Anhang A

PCR Maschine Biometra Tpersonal	Biometra
PCR Maschine Biometra Tgradient	Biometra
Spannungsgerät Biometra Power Pack P25	Biometra
Rotor	Kamag RET
Waage	Kern
Wasserbad	Memmert
Zentrifuge 5415	Eppendorf
Zeiss Stemi 2000	Carl Zeiss, Deutschland

A.1.8 Versuchstiere

Verwendet wurden pigmentierte *Xenopus laevis* Froschstämme der Firma NASCO, Wisconsin, USA.

A.1.9 Software

BLAST	Datenbanken-Suchsystem (Altschul <i>et al.</i> , 1997) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
Clustal omega multiple alignment	EMBL-European Bioinformatics Institute http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
Metazome	Dient zur Erleichterung von vergleichenden genomischen Studien der Metazoa, herausgegeben vom <i>Joint Genome Institut Energy</i> und dem <i>Center for Integrative Genomics</i> http://metazome.com/search.php 13.03.2014
Phylogenie.fr	http://www.phylogeny.fr/ 08.10.2015
Primer3	Whitehead Institute for Biomedical Research, USA (Steve Rozen and Helen J. Skaletsky, 2000)
Xenbase	Stellt als Datenbank genomische und biologische Daten von <i>X. tropicalis</i> und <i>X. laevis</i> bereit. http://www.xenbase.org/entry/

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die eingereichte schriftliche Fassung der Arbeit entspricht der auf dem Speichermedium. Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit noch nicht als Abschlussarbeit an anderer Stelle eingereicht wurde.

Halle, den 21.11.2016

Cilli Dana Buberl

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich versichere, dass von mir, Dana Buberl, keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation erfolgt sind. Es wurde nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht.

Halle, den 21.11.2016

Cilli Dana Buberl

Lebenslauf

Name: Buberl, geb. Manteuffel

Vorname: Cilli Dana

Geburtsdatum: 09.12.1989

Geburtsort: Oschatz

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

seit 02/2015 Assistenzärztin in der Weiterbildung für Allgemeinmedizin

Diakoniewerk Halle

seit 09/2011 Doktorandin

Martin-Luther-Universität Halle, Institut für physiologische Chemie in der AG Molekulare Entwicklungsbiologie von Prof. Hollemann, Titel: „Expressionsanalyse der putativen E3 Ligasen Trim7 und Trim23 in der frühen Neuralentwicklung von *Xenopus laevis*“

10/2008-12/2014 Studiengang Humanmedizin mit Approbation

Martin-Luther-Universität Halle

08/2000-07/2008 Abschluss Allgemeine Hochschulreife

Thomas-Mann-Gymnasium Oschatz

Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bei allen Personen bedanken, die am Entstehen dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Besonderer Dank geht an Prof. Dr. Thomas Hollemann für die Vergabe des Themas und für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können.

Ich möchte mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Hollemann für die erhaltene Unterstützung danken. Besonders hervorheben möchte ich Ashwin Lokapally und Rebecca Wagner, die mich in das wissenschaftliche Arbeiten einführten und mir mit rettenden Ideen immer zur Seite standen, sowie Dr. Enrico Jandt für das Korrekturlesen. Danken möchte ich unseren technische Mitarbeiterinnen Juliane Herfurth und Undine Ziese, für wertvolle Ratschläge und erhaltene Unterstützung während der experimentellen Arbeit.

Insbesondere möchte ich bei meinen Eltern, meinen Freunden für die erhaltene Unterstützung bedanken. Vor allem meinem Ehemann Norbert möchte ich für seine uneingeschränkte Geduld während der Promotionszeit danken.