

Einfluss der Wnt-Signalwege auf die konvergente Extension des Mesoderms im Verlauf der Gastrulation von *Xenopus laevis*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der

Universität Karlsruhe (TH)

vorgelegte

DISSERTATION

von

Frank Unterseher

aus Malsch

Dekan: Prof. Dr. Manfred Kappes

Referent: Prof. Dr. Doris Wedlich

Koreferent: PD. Dr. Bernd Sures

Tag der mündlichen Prüfung: 16. – 18.02.2005

Inhaltsverzeichnis

I EINLEITUNG

1	„ENTWICKLUNG“ DER ENTWICKLUNGSBIOLOGIE	1
2	<i>XENOPUS LAEVIS</i> IST EIN MODELLORGANISMUS FÜR DIE ENTWICKLUNGSBIOLOGIE	1
3	DIE EMBRYONALENTWICKLUNG VON <i>XENOPUS LAEVIS</i>	2
3.1	Die Gastrulation bei <i>Xenopus laevis</i>	3
4	KONVERGENTE AUSDEHNUNG BASIERT AUF ZELLINTERKALATION	4
5	KONVERGENTE AUSDEHNUNG WIRD ÜBER WNT-SIGNALWEGE GESTEUERT	6
5.1	Wnt-Proteine können in zwei Klassen eingeteilt werden	6
5.2	Die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege	7
5.2.1	Der Wnt/PCP Signalweg	7
5.2.2	Der Wnt/Kalzium-Signalweg	9
5.3	Der kanonische Wnt-Signalweg	9
5.3.1	Xnr-3 ist ein Zielgen des kanonischen Wnt-Signalwegs in <i>Xenopus</i>	11
5.4	Wechselwirkungen zwischen den Wnt-Wegen in <i>Xenopus</i>	12
5.4.1	Wechselwirkungen zwischen kanonischem und Wnt/Ca ²⁺ - Signalweg	13
5.4.2	Wechselwirkungen zwischen kanonischem und Wnt/PCP- Signalweg	13
5.4.3	Wechselwirkungen zwischen den nicht-kanonischen Wnt-Signalwegen	14
6	KONVERGENTE AUSDEHNUNG ERFORDERT MODULATION DER ZELLADHÄSION	15
6.1	Zell-Matrix-Adhäsion	15
6.2	Cadherine steuern Zell-Zell-Adhäsion	16
6.2.1	Protocadherine sind die größte Gruppe der Cadherin-Familie	16
6.2.2	PAPC ist wichtig für die frühe Wirbeltierentwicklung	17
6.2.3	<i>Xenopus Paraxial Protocadherin</i> (XPAPC)	18
7	KONVERGENTE AUSDEHNUNG ERFORDERT UMSTRUKTURIERUNG DES ZYTOSKELETTS	18
7.1	Modulation des Zytosketts ist eng mit Zelladhäsion verknüpft	19
8	AUSBLICK	20
9	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	21

II MATERIAL & METHODEN

1	MATERIALIEN	22
1.1	Enzyme und Chemikalien	22
1.1.1	Enzyme	22
1.1.2	Chemikalien	22
1.2	Puffer und Lösungen	23
1.3	Antikörper	26
1.4	Plasmide	26
1.5	Morpholino-Oligonukleotide	27

1.6 Geräte	27
2 METHODEN	29
2.1 Mikrobiologische Methoden	29
2.1.1 Anlegen von Flüssig- und Plattenkulturen	29
2.1.2 Anlegen von Bakteriendauerkulturen	29
2.1.3 Blau-Weiß-Selektionierung	29
2.1.4 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	29
2.1.5 Transformation von Plasmiden in chemisch kompetente <i>E.coli</i> JM 109	30
2.2 Molekularbiologische Methoden	30
2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren	30
2.2.2 Fällung und Aufreinigung von Nukleinsäuren	31
2.2.3 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	32
2.2.4 Restriktionsanalyse	32
2.2.5 Analytische Agarosegelelektrophorese	33
2.2.6 <i>in vitro</i> Transkription	33
2.2.7 Reverse Transkription	33
2.2.8 PCR	34
2.2.8.1 verwendete Primer	34
2.2.8.2 herkömmliche PCR	35
2.2.8.3 RT-PCR	35
2.2.8.4 Echtzeit-RT-PCR	35
2.2.9 substraktiver Screen	36
2.2.10 Anlegen einer cDNA-Bibliothek	36
2.2.11 radioaktive Hybridisierung	37
2.3 Entwicklungsbiologische und immunologische Methoden	39
2.3.1 Haltung von <i>Xenopus laevis</i>	39
2.3.2 Eiablage und <i>in vitro</i> Fertilisation	39
2.3.3 Entfernung der Gallerthülle und Anfärbung	39
2.3.4 Mikroinjektion und Embryonenpflege	40
2.3.5 Präparation von <i>Open Face Keller Explants</i>	40
2.3.6 Präparation von animalen Kappen	41
2.3.7 Fixierung und Lagerung der Embryonen und Explantaten	41
2.3.8 Ganzkeimfärbung - <i>whole mount in situ</i> -Hybridisierung	42
2.3.9 Immunfärbung	42
2.4 Proteinbiochemische Methoden	43
2.4.1 Proteinextraktion aus Embryonen	43
2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
2.4.3 Westernblot-Analyse	43

III ERGEBNISSE

1 DIE BEDEUTUNG DES WNT/PCP-SIGNALWEGS FÜR KONVERGENTE EXTENSION	45
1.1 Untersuchung von konvergenter Extension mittels Keller-Explantaten	45
1.2 Morpholino-Oligonukleotide hemmen die Translation	46
1.3 XWnt-11 wird durch Injektion eines spezifischen Morpholinos reprimiert	47
1.4 Überexpression von Xwnt-11 zeigt phänotypische Auswirkungen	49
1.5 Überexpression von XWnt-11 hemmt konvergente Extension	51
1.6 Sowohl Hemmung als auch Überaktivierung des Wnt/PCP-Signalwegs hemmt konvergente Extension	52
1.7 Hemmung des Wnt/PCP-Signalwegs hemmt selektiv die Konstriktion	53
2 HEMMUNG VON XPAPC VERHINDERT KONSTRIKTION	55
2.1 XPAPC ist erforderlich für koordinierte Zellpolarität	58
2.2 XPAPC ist nicht Bestandteil des Wnt/PCP-Signalwegs	59
2.3 XPAPC koordiniert Zellpolarität über RhoA und JNK	60
3 WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN WNT/PCP- UND KANONISCHEM WNT-SIGNALWEG	62
3.1 Existiert ein linearer Zusammenhang zwischen den beiden Wegen?	62
3.2 Die Expression von XWnt-11 wird durch Hemmung von X Lef-1 bzw. Xnr-3 nicht beeinflusst	62
3.2.1 RT-PCR ermöglicht Messung von Genexpression	62
3.2.2 Untersuchung der XWnt-11-Expression mittels RT-PCR	64
3.3 XWnt-11 kann Hemmung des kanonischen Wnt-Signalwegs nicht ausgleichen	65
3.4 kanonischer und Wnt/PCP-Signalweg beeinflussen sich gegenseitig	66
4 <i>XENOPUS NODAL RELATED (XNR-)</i> 3	68
4.1 Charakterisierung des Xnr-3 Morpholinos	68
4.1.1 Injektion des Xnr-3 Morpholinos führt zu charakteristischen Defekten	68
4.1.2 Das Xnr-3-Morpholino blockiert die Translation von exogenem Xnr-3	70
4.1.3 Das Xnr-3-Morpholino hemmt die Elongation von Keller-Explantaten	71
4.2 Xnr-3 wird über X Lef-1 aktiviert	72
4.3 Xnr-3, siamois und twin werden auf unterschiedliche Art reguliert	72
4.4 Identifizierung von Zielgenen von Xnr-3 mittels substraktivem Screen	74
4.4.1 Über substraktiven Screen werden Zielgene von Xnr-3 selektiv amplifiziert	74
4.4.2 Anlegen einer cDNA-Bibliothek der selektiv exprimierten Gene	77
4.4.3 Identifizierung von Klonen mittels radioaktiver Hybridisierung	78
4.4.4 Identifizierung von Klonen, die bekannte Zielgene von Xnr-3 enthielten	81
4.4.5 Identifizierung von Xnr-3-Zielgenen mittels Sequenzierung	82
4.4.6 Geminin wird über Xnr-3 aktiviert	83
4.4.7 Xnr-3 und Geminin agieren gemeinsam bei der Neuralinduktion	86
4.4.8 Überexpression von Geminin führt zu charakteristischen Defekten	87

4.4.9	Geminin kann Elongation in Explantaten nicht wieder herstellen	89
4.4.10	Geminin-Überexpression hat Explantate vom Typ 2x zur Folge	90
4.4.11	Fehlende Konvergenz geht nicht auf erhöhte Zellteilungsaktivität zurück	91
IV DISKUSSION		
1	ÜBERAKTIVIERUNG UND HEMMUNG VON WNT-11 HEMMT CE	93
2	XPAPC ALS BINDEGLIED ZWISCHEN ZELLADHÄSION UND SIGNALTRANSDUKTION	95
2.1	Einfluss von RhoA und Rac 1 auf den 2x-Phänotyp	95
2.2	In 2x-Explantaten ist selektiv die Konstriktion gehemmt	96
2.3	XPAPC wirkt antagonistisch auf Rho und Rac	97
2.4	Einfluss von XPAPC sowie der kleinen GTPasen auf zelluläre Prozesse	99
3	WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN KANONISCHEM UND WNT/PCP-SIGNALWEG	100
3.1	Xnr-3 und XWnt-11 agieren nicht in einer linearer Kaskade	100
3.2	Kanonischer und Wnt/PCP-Signalweg konkurrieren um Dishevelled	101
4	XNR-3	104
4.1	Bestätigung der essentiellen Rolle von Xnr-3 bei konvergenter Extension	104
4.2	Die Regulation von Xnr-3 im Vergleich zu Siamois und Twin	105
4.3	Suche nach Xnr-3-Zielgenen mittels substraktivem Screen	106
4.4	Geminin ist ein Zielgen von Xnr-3	109
4.5	Xnr-3 fördert über Geminin die Neuralentwicklung	110
V ZUSAMMENFASSUNG		112
VI LITERATUR		114
VII ANHANG		
1	DANKSAGUNG	127
2	PUBLIKATIONEN	128
3	LEBENS LAUF	129

Abkürzungen

Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APBS	<i>amphibian phosphate buffer solution</i>
APC	Adenomatous polyposis coli
AXPC	<i>axial protocadherin</i>
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
ca	<i>constitutive active</i> (konstitutiv-aktiv)
CamKII	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase II</i>
CBTF	<i>CCAAT box transcription factor</i>
CE	<i>convergent extension</i> (konvergente Extension)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMF	N,N'-dimethylformamid
DMZ	dorsale Marginalzone
dn	dominant-negativ
Dsh	Dishevelled
Dvl	Dishevelled (in Säugetieren)
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
EGTA	Ethylen-glycol-bis(2-aminoethylether)
ER	<i>enhancer of rudimentary</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
Fz	frizzled
GAM	<i>goat-anti-mouse</i>
GAP	<i>GTPase-activating proteins</i>
GAR	<i>goat-anti-rabbit</i>
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
gly	Glypican
GSK	Glycogen Synthase Kinase
HCG	<i>human chorionic gonadotropin</i>
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
hn RNP	<i>heterogenous nuclear ribonucleoprotein</i>
HSPG	<i>heparin sulphate proteoglycan</i>
Id	<i>inhibitor of differentiation</i>
IgG	Immunglobulin G
Ilf	<i>interleucin enhancer factor</i>

IMZ	<i>involuting marginal zone</i> (einwandernde Marginalzone)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
LB	Luria Bertani
LEF	<i>lymphoid enhancer factor</i>
LRP	<i>LDL related protein</i>
MAP	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MBST	<i>modified Barth's solution</i> + Tween-20
MBT	<i>midblastula transition</i>
MEMFA	<i>Modified Eagle's Medium</i> + Formaldehyd
MO	Morpholino-Oligonukleotid
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
NCAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>
Nf	<i>nuclear factor</i>
OD ₆₆₀	optische Dichte, gemessen im Photometer bei einer Wellenlänge von 660 nm
ODC	Ornithin-Decarboxylase
PAPC	<i>paraxial protocadherin</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCP	<i>planar cell polarity</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Protein Kinase C
RGC	<i>response gene to complement</i>
ROK	<i>Rho-associated kinase</i>
Rpm	<i>revolutions per minute</i>
SDS	<i>sodiumdodecylsulphate</i>
stbm	Strabismus
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	<i>Tris-buffered saline</i> + tween 20
TCF	<i>T-cell factor</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
U	<i>unit</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
wg	<i>wingless</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
Xbra	<i>Xenopus brachyury</i>
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
Xnr	<i>Xenopus nodal related</i>
zw	Zwickle

I EINLEITUNG

1 „Entwicklung“ der Entwicklungsbiologie

Komplexe Organismen wie der Mensch haben ihren Ursprung in einer einzigen Zelle, der befruchteten Eizelle. Der faszinierende Prozess der Entwicklung zum ausdifferenzierten Lebewesen wirft viele Fragen auf: Wie können aus einer einzigen Zelle die unterschiedlichen Strukturen hervorgehen? Wie wird gewährleistet, dass die unterschiedlichen Gewebe ein funktionsfähiges System bilden? Wie werden diese Prinzipien während den unterschiedlichen Phasen der Entwicklung auf genetischer Ebene gesteuert?

Bereits der griechische Philosoph Aristoteles stellte die Theorie auf, dass im Verlauf der Embryogenese ständig neue Strukturen gebildet werden. Wichtige Erkenntnisse über das Wesen der Embryonalentwicklung wurden im Laufe des 19. Jahrhunderts sowie zu Beginn des 20. Jahrhunderts gewonnen. So entwickelte Weismann das Mosaikmodell, das besagt, dass die Entwicklung unterschiedlicher Zellen aus der Zygote darauf beruht, dass sich spezielle Faktoren im Zellkern der Zygote, so genannte Determinanten, ungleich auf die Tochterzellen verteilen und somit die Entwicklung der aus diesen hervorgehenden Zellen in unterschiedliche Richtungen lenken. Den Beweis, dass Wechselwirkungen zwischen Zellen eine wichtige Rolle bei Entwicklungsvorgängen spielen, erbrachten die Transplantationsexperimente von Hans Spemann und Hilde Mangold. Dabei zeigte sich, dass Gewebe aus dem Bereich der dorsalen Urmundlippe eines Molch-Embryos in der Lage war, eine komplette Körperachse inklusive Neuralrohr und Somiten zu induzieren. Durch dieses Experiment wurde der so genannte Organisator identifiziert, der dazu in der Lage schien, die Entwicklung eines kompletten Embryos auszulösen. Den Durchbruch in der Embryologie brachte das Zusammenführen von Genetik und Entwicklungsbiologie. Die Erkenntnis, dass Gene die Proteinausstattung der Zelle bestimmen, führte schließlich zur Identifizierung von komplexen Netzwerken wie Signalkaskaden, die die Entwicklung von Zellen und Geweben steuern.

2 *Xenopus laevis* ist ein Modellorganismus für die Entwicklungsbiologie

Für die Untersuchung von Entwicklungsvorgängen bedient man sich Modellorganismen, das sind Arten, die sich aus unterschiedlichen Gründen besonders eignen. Unter den Wirbeltieren haben sich Maus, Huhn, Krallenfrosch und in jüngerer Zeit auch der Zebrafisch als Modellorganismen etabliert. Modellsysteme unter den Wirbellosen stellen die Taufliede *Drosophila melanogaster* und der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* dar.

Der glatte Krallenfrosch *Xenopus laevis* eignet sich in mehrfacher Hinsicht als Modellorganismus für die Entwicklungsbiologie. Seine Eier und heranwachsenden Embryonen sind relativ groß und robust, was experimentelle Eingriffe an ihnen vereinfacht. Die frühe Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* läuft innerhalb einer Zeitspanne von

wenigen Tagen ab. Ferner produziert der Krallenfrosch eine hohe Anzahl von Eiern, die außerdem leicht *in vitro* zu befruchten sind.

3 Die Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*

Im Anschluss an die Befruchtung der Eizelle erfolgen bis zum Erreichen des Blastulastadiums 12 mitotische Furchungsteilungen. Die Blastula besteht aus einem Hohlraum, der von einem einschichtigen Epithel umschlossen wird. Im Verlauf des nächsten Entwicklungsabschnitts, der Gastrulation, kommt es zu einer starken Umordnung der Zellen, wobei schließlich der grundlegende Bauplan der Kaulquappe festgelegt wird. Während der anschließenden Neurulation wird aus dem dorsalen Ektoderm das Neuralrohr gebildet, aus dem sich später Gehirn und Rückenmark entwickeln. Im Verlauf der Organogenese differenzieren sich die zuvor angelegten Organe und Gewebe. Nach vier bis sieben Tagen erreicht der Embryo das Kaulquappenstadium, aus dem nach erfolgter Metamorphose der adulte Frosch hervorgeht.

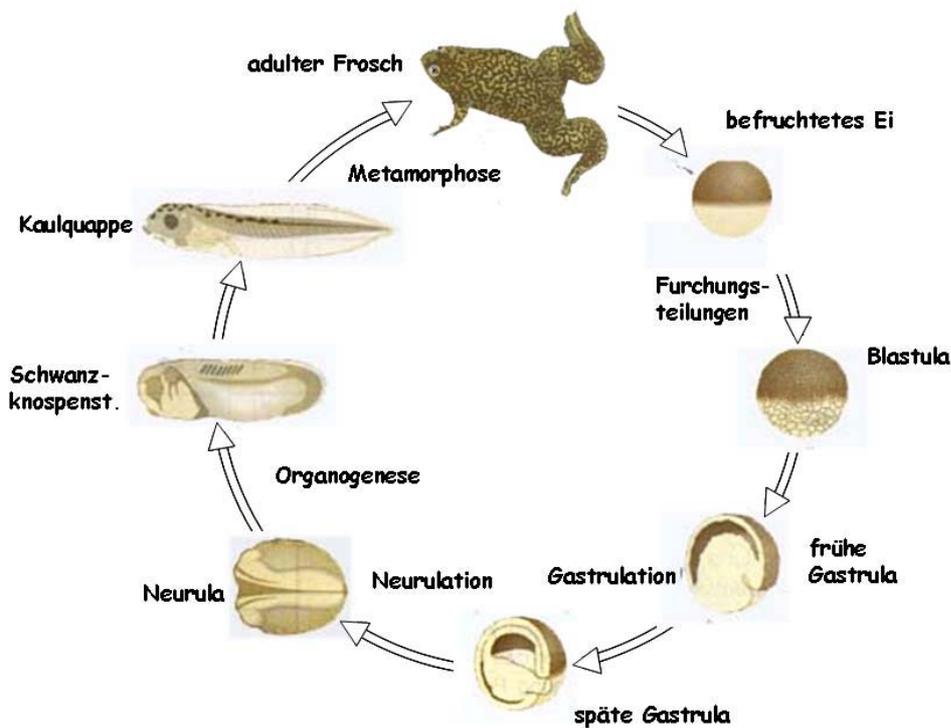


Abb. I-1: Der Ablauf der Embryonalentwicklung bei *Xenopus laevis* (Quelle: Wolpert: Entwicklungsbiologie). Dargestellt sind die charakteristischen embryonalen Stadien. Die Größenverhältnisse entsprechen allerdings nicht den natürlichen Gegebenheiten.

3.1 Die Gastrulation bei *Xenopus laevis*

Die Gastrulation ist ein essentieller Abschnitt in der Entwicklung nahezu aller mehrzelligen Organismen. Im Verlauf dieses Entwicklungsabschnitts werden die drei Keimblätter Endoderm, Mesoderm und Ektoderm angelegt. Die Gastrulation ist außerdem charakterisiert durch intensive Wanderungsbewegungen von Zellen, wodurch diese schließlich die Positionen im Embryo erreichen, die für sie im Körperbauplan vorgesehen sind. Die während der Gastrulation ablaufenden Bewegungsvorgänge sind unter den verschiedenen Spezies hoch konserviert, es existieren jedoch Unterschiede im zeitlichen und mechanischen Ablauf sowie im Ausmaß der Umstrukturierungen.

Bei der nachfolgenden Beschreibung von Gastrulationsbewegungen werden die Abläufe in *Xenopus laevis*, wo sie intensiv untersucht wurden, herangezogen. Drei unterschiedliche Wanderungsbewegungen von Zellen kennzeichnen den Ablauf der Gastrulation beim Glatten Krallenfrosch: Involution, konvergente Extension sowie Epibolie.

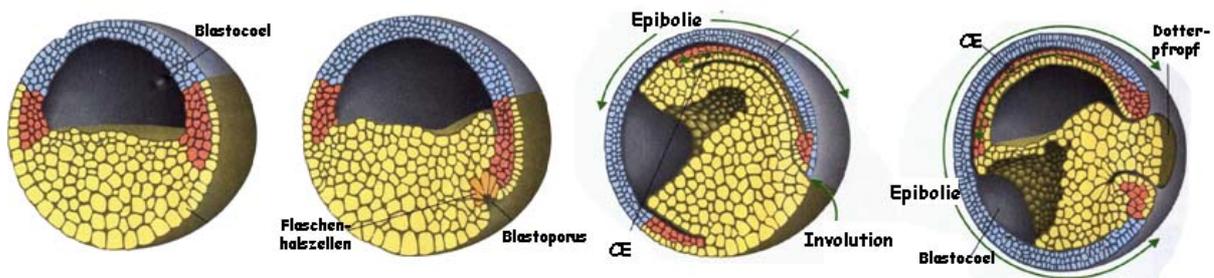


Abb. I-2: Wanderungsbewegungen während der Gastrulation von *Xenopus* (Quelle: Wolpert: Entwicklungsbiologie)
Das zukünftige Ektoderm ist blau, das Mesoderm rot und das Entoderm gelb dargestellt. Die linke Abbildung zeigt einen Embryo im späten Blastulastadium. Die Gastrulation beginnt mit der Bildung von Flaschenhalszellen in der Urmundregion (2. von links). In diesem Bereich beginnt die Einwanderung von mesendodermalen Zellen. Das eingewanderte Gewebe betreibt konvergente Extension (CE), während parallel dazu im Ektoderm Epibolie stattfindet (rechts).

Zu Beginn der Gastrulation bildet sich an einer festgelegten Stelle der Blastula der Urmund bzw. Blastoporus, der als eine Furche in der Oberfläche sichtbar wird. Im Bereich der dorsalen Urmundlippe rollen sich die Zellen des späteren Meso- sowie Endoderms ein und beginnen, ins Innere des Embryos einzuwandern. Diesen Vorgang bezeichnet man als Involution. Im weiteren Verlauf der Gastrulation tritt im mesodermalen Gewebe ein konvergente Extension genannter Vorgang auf. Dabei dehnt sich das spätere Mesoderm entlang der antero-posterioren Achse aus, während es entlang der medio-lateralen Achse schmaler wird. Parallel dazu findet im Ektoderm Epibolie statt. Hierbei vergrößert sich die Oberfläche des Ektoderms auf Kosten der Dicke des Gewebes und breitet sich über die gesamte Oberfläche des Embryos aus.

4 Konvergente Extension basiert auf Zellinterkalation

Der Begriff konvergente Extension – übernommen aus dem englischen Begriff *convergent extension* - bezeichnet eine charakteristische Wanderungsbewegung eines Gewebes während der Morphogenese. Konvergente Extension hat eine Verschmälerung einer Zellpopulation in eine Richtung zur Folge (Konvergenz), während sie sich senkrecht dazu verlängert (Extension) (zusammengefasst in Keller *et al.* 2000). Diese Bewegungen sind in der Entwicklung von Metazoen allgegenwärtig. Konvergente Extension ist beteiligt an so unterschiedlichen Prozessen wie der Regeneration von Körperteilen in Hydra (Bode & Bode 1984) oder der Extension des Keimbands in *Drosophila* (Irvine & Wieschaus 1994).

In sämtlichen Chordatengruppen findet während der Gastrulation und Neurulation konvergente Extension im dorsalen Mesoderm sowie im darüber liegenden Neuroektoderm statt. Dies führt dazu, dass sich die medio-laterale Körperachse verschmälert, während sich der Embryo entlang der antero-posterioren Achse verlängert (Keller 2002).

Um konvergente Extension zu ermöglichen, müssen die einzelnen Zellen innerhalb des Gewebeverbandes wandern. Untersuchungen in Fischen (Glickman *et al.* 2003), Vögeln (Sausedo & Schoenwolf 1993) und Säugern (Sausedo & Schoenwolf 1994) lassen vermuten, dass das Prinzip, nach dem Zellen des Meso- und Neuroektoderms während der frühen Embryonalentwicklung konvergente Extensionsbewegungen erfahren, innerhalb der Vertebraten konserviert ist. Konvergente Extension erfolgt mittels Zellinterkalation, das heißt, Zellen schieben sich zwischeneinander. Erkenntnisse über den Ablauf dieser Wanderungsbewegungen sind vor allem Untersuchungen an *Xenopus laevis* zu verdanken.

Konvergente Extension im dorsalen Mesoderm des Glatten Krallenfrosches erfolgt in zwei Stufen: Während der ersten Hälfte der Gastrulation findet in tiefen Schichten des späteren Mesoderms sowie im späteren Neuralgewebe radiale Zellinterkalation statt. Dabei interkalieren die Zellen senkrecht zur Oberfläche des Embryos. Das Gewebe wird dünner und entlang der späteren antero-posterioren Körperachse verlängert. Im weiteren Verlauf der Gastrulation erfährt das in den Embryo eingewanderte zukünftige Mesoderm mediolaterale Interkalation.

Um den Ablauf der mediolateralen Interkalation auf zellulärer Ebene zu beschreiben wird nach Keller (2002) folgendes Modell herangezogen, das in Abb. I-3 dargestellt ist:

Die ursprünglich multipolaren Zellen besitzen lange Lamellipodien, die zunächst gleichmäßig über die Oberfläche verteilt sind. Vor Beginn der Zellinterkalation werden diese Zellfortsätze in medio-lateraler Richtung ausgerichtet. Sie heften sich an die Oberflächen der benachbarten Zellen und üben eine Zugkraft auf diese aus, was dazu führt, dass sich die Zellen in mediolateraler Richtung ausdehnen. Entlang der verlängerten anterioren und posterioren Zelloberfläche befinden sich zahlreiche fadenartige Fortsätze, so genannte Filopodien, die dem Gewebe zusätzlich Halt geben und dazu dienen, dass es einen steifen Rahmen bildet, der das Substrat für die wandernden Zellen darstellt. Diese Filopodien bilden sich immer wieder neu und besitzen die Fähigkeit, an der Oberfläche der benachbarten Zellen entlang zu gleiten,

was den Zellen ermöglicht, sich entlang ihrer Längsachse ineinander zu schieben. An der Grenze zwischen Notochord und dem somitischen Mesoderm bilden sich die Fortsätze zurück und die Zellen hören auf zu wandern, während im Inneren des Gewebes weiterhin Zellinterkalation stattfindet. Konvergente Extension kommt schließlich zum Stillstand, wenn die Breite des Notochords, in dem diese Zellbewegung stattfindet, weniger als zwei Zellen beträgt.

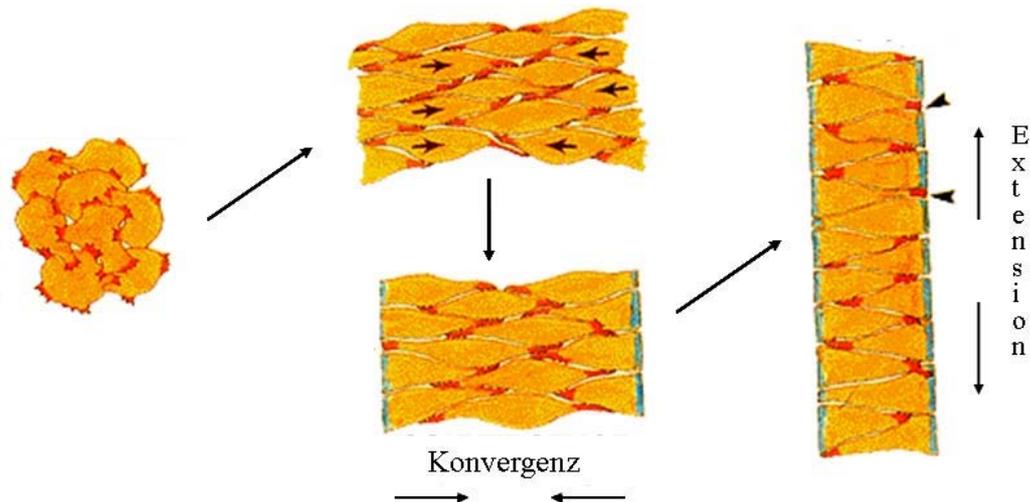


Abb. I.3: Zellverhalten während mediolateraler Zellinterkalation (Quelle: Keller *et al.* 2000).

Die ursprünglich zufällig angeordneten Zellfortsätze (rot dargestellt) in multipolaren Zellen orientieren sich entlang der medio-lateralen Körperachse. Durch die daraus entstehenden Zugkräfte verlängern sich die Zellen in dieser Richtung und schieben sich zwischeneinander. An der Grenze zwischen Notochord und dem somitischen Mesoderm (blau gefärbt) bilden sich die Fortsätze zurück und die Zellen flachen ab. Zellinterkalation kommt schließlich zum Stillstand.

R. Keller postulierte, dass Konvergenz und Extension im Verlauf der konvergenten Extensionsbewegung des einwandernden Mesoderms gekoppelt sind und nicht unabhängig voneinander ablaufen können (Keller *et al.* 2000). Allerdings beobachtete man in Zebrafischmutanten, in denen der Transkriptionsfaktor *no tail* funktionslos war, dass Konvergenz beeinträchtigt war, Extension jedoch in vollem Ausmaß stattfand. Dies legte die Vermutung nahe, dass zumindest bei den Gastrulationsbewegungen in diesem Organismus Konvergenz und Extension nicht zwangsläufig miteinander verbunden sind (Myers *et al.* 2002b).

5 Konvergente Extension wird über Wnt-Signalwege gesteuert

Die Steuerung der konvergenten Extension auf molekularer Ebene erfolgt über Wnt-Signalwege. Wnt-Proteine sind sekretierte, cysteinreiche Glykoproteine, die auf ihre Zielzellen wirken, indem sie dort intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren.

Das erste Gen dieser Gruppe – Wnt-1 - wurde 1982 in der Maus identifiziert, wo es als Protoonkogen die Entstehung von Tumoren fördert (Nusse & Varmus 1982). In der Zwischenzeit sind mehr als 100 Wnt-Gene in den unterschiedlichen Metazoengruppen identifiziert worden. In der Gruppe der Vertebraten sind bislang 21 Wnt-Gene bekannt. Im Menschen sind 19 dieser Gene vorhanden, im Genom von *Xenopus laevis* wurden bislang 16 verschiedene Wnt-Gene identifiziert (<http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>).

Zunächst wurde der Gruppe der Wnts und den Komponenten der durch sie induzierten Signalwege aufgrund ihrer Rolle bei der Tumorbildung großes Interesse entgegengebracht. Dabei wird neben Wnt-1 auch β -Catenin, das über Wnt-1 aktiviert wird, onkogene Wirkung zugesprochen. Dies basiert auf der Beobachtung, dass Mutationen im Gen, die einen Abbau des Proteins verhindern, die Entstehung von Dickdarmkrebs beim Menschen fördern (Morin 1997). Anderen Bestandteilen der Wnt-1-abhängigen Signalkaskade wie APC (Polakis 1997) und Tcf-1 (Roose *et al.* 1999) wird hingegen tumorhemmende Wirkung zugeschrieben.

Auch im Verlauf der frühen Embryonalentwicklung kommt den Mitgliedern der Wnt-Familie entscheidende Bedeutung zu. So spielen sie neben der Steuerung der konvergenten Extensionsbewegung während der Gastrulation auch eine Rolle bei der Festlegung der Körperachsen sowie der Neuro- und Organogenese.

5.1 Wnt-Proteine können in zwei Klassen eingeteilt werden

Injektion von mRNA unterschiedlicher Wnts in die ventralen Blastomeren von *Xenopus*-Embryonen ergab, dass XWnt-1 (Du *et al.* 1989), XWnt-3A (Wolda *et al.* 1993) sowie XWnt-8 (Du *et al.* 1995) die Bildung einer sekundären Körperachse induzierten, während XWnt-4, XWnt-5A sowie XWnt-11 dazu nicht in der Lage waren. Dies führte zu einer Einteilung der Wnts in *Xenopus* in zwei Klassen: die XWnt-8-Klasse, der XWnt-1, XWnt-3A und XWnt-8 angehören sowie die XWnt-5A-Klasse mit XWnt-5A, XWnt-4 sowie XWnt-11. Die Mitglieder der XWnt-8-Klasse sind in der Lage, bei Überexpression in durch UV-Behandlung ventralisierten Embryonen dorsale Strukturen wieder herzustellen. (Torres *et al.* 1996). Sie steigern Zelladhäsion, während die Mitglieder der XWnt-5A-Klasse das Vermögen zur Zelladhäsion senken. XWnt-5A und andere Mitglieder der XWnt-5A-Klasse interagieren außerdem mit der XWnt-8-Klasse in antagonistischer Weise. So fördert die XWnt-8-Klasse konvergente Extension, während diese Wanderungsbewegung durch XWnt-5A in negativer Weise beeinflusst wird (Du *et al.* 1995, Torres *et al.* 1996, Slusarski *et al.* 1997).

Auf der Basis dieser Erkenntnisse ging man davon aus, dass die unterschiedlichen Wnts zwei verschiedene Arten von intrazellulären Signalkaskaden aktivieren. Der Wnt/ β -Catenin- bzw. kanonische Wnt-Signalweg wird über Mitglieder der Wnt-1-Klasse aktiviert. Dagegen werden

der Wnt/PCP- sowie der Wnt/Ca²⁺-Signalweg, die als nicht-kanonische Wnt-Signalwege zusammengefasst werden, über Wnts der 5A-Klasse reguliert.

5.2 Die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege

5.2.1 Der Wnt/PCP Signalweg

In *Drosophila* aktivieren Homologe zu den Wnt-Proteinen der Vertebraten einen *planar cell polarity* oder PCP genannten Signalweg, der dafür verantwortlich ist, dass die Zellen des Flügeleithels entlang der proximal-distalen Achse polarisiert sind, was für die korrekte Ausrichtung der Flügelhaare unerlässlich ist (Adler 1992, Krasnow *et al.* 1995). Auf die gleiche Art, wenngleich komplexer und mit vielfältigen genetischen Regulationsmechanismen, wird die korrekte Anordnung der Photorezeptoren in den Ommatidien des Fliegenauges gewährleistet (zusammengefasst in Fanto & McNeill 2004).

Polarität von Zellen und Geweben ist für viele Prozesse und Funktionen innerhalb der Lebewesen von Bakterien bis zu den Wirbeltieren unerlässlich. Dabei kommt gerade der planaren Zellpolarität große Bedeutung zu. So ist sie zum Beispiel für die korrekte Anordnung der Vogelfedern und Fischeschuppen und für die Organisation der Stereocilien im Innenohr von Vertebraten verantwortlich. Ebenso kommt ihr während der konvergenten Extensionsbewegung im Verlauf der Vertebratengastrulation große Bedeutung zu.

Erste Hinweise, dass der für diese Prozesse verantwortliche Signalweg homolog zum PCP-Weg in *Drosophila* ist, gingen auf Beobachtungen zurück, wonach Komponenten des PCP-Wegs wie Frizzled-Rezeptoren (Djiane *et al.* 2000), Dishevelled (Heisenberg *et al.* 2000, Wallingford *et al.* 2000) sowie kleine GTPasen der Rho-Familie (zusammengefasst in Kaibuchi *et al.* 1999) auch in Vertebraten essentiell für die Ausbildung von Zellpolarität sind. Daher wurde dieser Signalweg in Vertebraten ebenfalls als (Wnt-)PCP-Signalweg bezeichnet. Die Aktivierung des Wnt/PCP-Wegs erfolgt durch die Bindung von Wnt-Proteinen der Wnt-5A-Klasse an den Rezeptor Frizzled (Fz) 7. Die Mitglieder der Frizzled-Familie sind durch den Besitz von sieben Transmembrandurchgängen gekennzeichnet. Die Signalweiterleitung in der Zelle erfolgt über das multifunktionelle zytoplasmatische Protein Dishevelled und von dort über kleine GTPasen der Rho-Familie. Diese Proteine treten in der Zelle in zwei Zuständen auf, in GDP-gebundener, inaktiver sowie in GTP-gebundener, aktiver Form. Sie wirken als molekulare Schalter, die durch Aktivierung spezifischer Gene Auswirkungen auf die Struktur des Zytoskeletts sowie auf die Zelladhäsion haben (zusammengefasst in Kaibuchi *et al.* 1999). Involviert in den Wnt/PCP Signalweg in Vertebraten sind Rho, Rac sowie Cdc 42 (Veeman *et al.* 2003).

Intensive Untersuchungen wurden angestellt, um den Ablauf dieses Signalwegs während der Gastrulation und seine Auswirkungen auf die konvergente Extensionsbewegung in Vertebraten aufzuklären. Obwohl unstrittig ist, dass der Wnt/PCP-Signalweg essentiell ist für konvergente Extension in Wirbeltieren, wie Untersuchungen in *Xenopus* (Tada & Smith 2000) und Zebrafisch (Heisenberg *et al.* 2000) gezeigt haben, ist der genaue Ablauf noch

nicht geklärt. Einige Erkenntnisse (Habas *et al.* 2001, Habas *et al.* 2003) sprechen dafür, dass sich der Signalweg auf der Ebene von Dishevelled verzweigt und über verschiedene Domänen von Dishevelled unterschiedliche Wege eingeschlagen werden.

Daam 1, ein Mitglied der Familie der Formin-Homologen, die in sämtlichen Organismengruppen von Hefe bis zu Säugetieren Zellpolarität steuern, lagert sich an die PDZ-Domäne von Dishevelled an. RhoA kann an diesen Komplex binden und wird hierdurch aktiviert (Habas *et al.* 2001). RhoA aktiviert ROK, was für die Etablierung planarer Zellpolarität und auch für konvergente Extension von Bedeutung ist. Über die DEP-Domäne von Dishevelled wird ein weiteres Protein aus der Gruppe der kleinen GTPasen, Rac 1, aktiviert, welches für die Aktivierung der c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK) zuständig ist. Auch diese Kaskade ist essentiell für konvergente Extensionsbewegungen. Untersuchungen in *Xenopus* (Djiane *et al.* 2000, Torres *et al.* 1996) und Zebrafisch (Myers *et al.* 2002a) deuten darauf hin, dass sich eine Überaktivierung dieses Signalwegs ebenfalls negativ auf diese Zellbewegungen auswirkt.

Eine schematische Darstellung der Steuerung von konvergenter Extensionsbewegung während der Gastrulation von *Xenopus laevis* über den Wnt/PCP-Signalweg zeigt Abb. I-4.

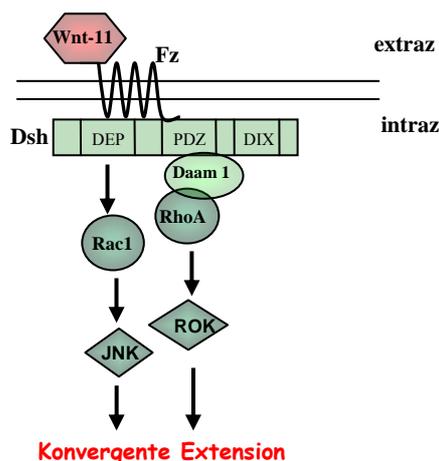


Abb. I-4: Die für konvergente Extension in *Xenopus* wichtigen Komponenten des Wnt/PCP-Signalwegs (nach Habas *et al.* 2003).

Zusätzlich zu den oben erwähnten Komponenten dieses Signalwegs existieren weitere Faktoren, die für die Funktion der Kaskade essentiell sind. Aus Untersuchungen in *Drosophila* ging hervor, dass das Transmembranprotein Strabismus (stbm)/van Gogh mit Frizzled sowie Dishevelled in Interaktion tritt und hierdurch Aktivierung von JNK gewährleistet (Adler *et al.* 2000). Auch in Wirbeltieren scheint Strabismus eng mit dem Wnt/PCP-Signalweg in Zusammenhang zu stehen. In Zebrafisch aktiviert stbm ebenfalls JNK, indem es mit Frizzled sowie Dishevelled interagiert (Park & Moon 2002). Beobachtungen in *Xenopus* und Zebrafisch, wonach sowohl Überexpression als auch Inhibierung von stbm negative Auswirkung auf konvergente Extensionsbewegung hat (Darken *et al.* 2002, Park & Moon 2002), unterstützen die Annahme einer Beteiligung dieses Proteins am Wnt/PCP-Signalweg.

Das intrazelluläre Protein Prickle stellt eine weitere wichtige Komponente für den Wnt/PCP-Signalweg in *Drosophila* (Gubb *et al.* 1999, Tree *et al.* 2002) sowie in Vertebraten (Carreira-

Barbosa *et al.* 2003) dar. Prickle agiert höchstwahrscheinlich nicht in einer linearen Kaskade mit Frizzled und Dishevelled, es wird jedoch offensichtlich benötigt, um die Lokalisierung von Dishevelled an der Zellmembran, eine Voraussetzung für Signalweiterleitung innerhalb des Wnt/PCP-Wegs, zu gewährleisten (Tree *et al.* 2002, Carreira-Barbosa *et al.* 2003).

5.2.2 Der Wnt/Kalzium-Signalweg

Wnt-Moleküle der Wnt-5A-Klasse aktivieren außerdem einen weiteren Signalweg, der zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration führt. Hierdurch werden Kalzium-sensitive Proteine wie Protein Kinase C (Sheldahl *et al.* 1999) sowie *calcium/calmodulin-dependent kinase* (CamK) II (Kühl *et al.* 2000) aktiviert. Saneyoshi *et al.* (2002) identifizierten den Transkriptionsfaktor NF-AT als ein weiteres Zielgen dieses Signalwegs. Allerdings spricht einiges dafür, dass NF-AT und Wnt-5A in parallelen Signalwegen agieren (Topol *et al.* 2003). Obwohl die Mechanismen dieses Signalwegs noch weitgehend unerforscht sind, gibt es Hinweise darauf, dass heterotrimere G-Proteine für die Aktivierung der Zielgene des Wnt/Ca²⁺-Signalwegs bedeutend sind, zumindest für PKC wird eine G-Protein-abhängige Aktivierung vorgeschlagen (Winklbauer *et al.* 2001, Penzo-Mendèz *et al.* 2003).

Der Wnt/Ca²⁺-Signalweg ist erforderlich für die Abtrennung des Ektoderms vom anterioren Mesoderm, ein Vorgang, der sich im Verlauf der Gastrulation vollzieht (Winklbauer *et al.* 2001). Er spielt allerdings auch eine Rolle bei der konvergenten Extensionsbewegung während der Vertebratengastrulation. Bislang wurde dem Wnt/Ca²⁺-Signalweg vor allem inhibitorische Wirkung zugeschrieben (Torres *et al.* 1996, Kühl *et al.* 2001). Allerdings führt Inaktivierung von Wnt-5A im Zebrafisch zu gestörter konvergenter Extension, was darauf schließen lässt, dass dieser Signalweg durchaus für den korrekten Ablauf von Gastrulationsbewegungen in Vertebraten erforderlich ist (Killian *et al.* 2002).

5.3 Der kanonische Wnt-Signalweg

Der kanonische Wnt-Signalweg, der aufgrund von β -Catenin als zentraler Komponente auch als Wnt- β -Catenin-Signalweg bezeichnet wird, ist der klassische Wnt-Signalweg.

Ist der kanonische Wnt-Signalweg inaktiv, so liegt die Glycogen-Synthase-Kinase (GSK) 3 β in ihrer dephosphorylierten aktiven Form vor. GSK 3 β phosphoryliert APC sowie Axin. Somit sind die Voraussetzungen für die Bindung von β -Catenin geschaffen. β -Catenin wird an seiner N-terminalen Region an den β -Catenin-Degradationskomplex, einen aus mindestens sechs verschiedenen Komponenten bestehenden Multienzymkomplex, gebunden und durch GSK 3 β phosphoryliert. Hierdurch wird β -Catenin für die spätere Degradation durch die Proteosomen markiert (zusammengefasst in Polakis 2000, Schwarz-Romond *et al.* 2002).

Die Aktivierung dieses Signalwegs erfolgt durch die Bindung von Wnt-Proteinen der Wnt-1-Klasse an Frizzled-Rezeptoren (Bhanot *et al.* 1996, Yang-Snyder *et al.* 1996). Für die Übertragung des Signals in die Zelle ist außerdem ein weiteres Transmembranprotein der *LDL receptor related protein* (LRP-) Familie erforderlich (Tamai *et al.* 2000).

Für die Vorgänge nach Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs wird folgender Mechanismus vorgeschlagen (beschrieben in Polakis 2000): Das zytoplasmatische Protein Dishevelled wird durch Casein Kinase ϵ phosphoryliert. Dies ermöglicht Interaktion von Dishevelled mit Frat-1. Frat-1 bindet GSK 3β , wodurch verhindert wird, dass GSK 3β den β -Catenin-Degradationskomplex aktivieren kann. Der genaue Mechanismus, nach dem die Aktivierung sowie die Deaktivierung des β -Catenin-Degradationskomplexes ablaufen, ist allerdings noch nicht abschließend geklärt. Nach neuesten Erkenntnissen geht man jedoch davon aus, dass die Bildung eines Komplexes aus dem Wnt-Liganden sowie den beiden Transmembranproteinen die Phosphorylierung des LRP-Proteins an dessen intrazellulärer Domäne ermöglicht, wodurch Axin an den Corezeptor gebunden und somit vom Degradationskomplex fern gehalten wird (Tamai *et al.* 2004). Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs führt zur Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma. Es gelangt in den Zellkern, wo es an Transkriptionsfaktoren der Lef/TCF-Familie bindet. Dies führt zur Aktivierung der Transkription von Zielgenen des Signalwegs (Kühl & Wedlich 1997).

Aus Untersuchungen in *Drosophila* (Tolwinski *et al.* 2003) existieren jedoch Hinweise, dass der zum kanonischen Wnt-Weg homologe Wg/Wnt-Signalweg und damit verbunden die Akkumulation von β -Catenin/Armadillo auch über einen Mechanismus unabhängig von GSK 3 bzw. Zw 3, dessen Homolog in *Drosophila*, ablaufen kann.

Im Verlauf der frühen Embryonalentwicklung in *Xenopus* werden über den kanonischen Wnt-Signalweg die Gene Xnr-3 (McKendry *et al.* 1997), Siamois (Brannon & Kimelman 1998) und Twin (Laurent *et al.* 1997) aktiviert, wobei einzig Xnr-3 essentiell für konvergente Extensionsbewegung zu sein scheint (Kühl *et al.* 2001).

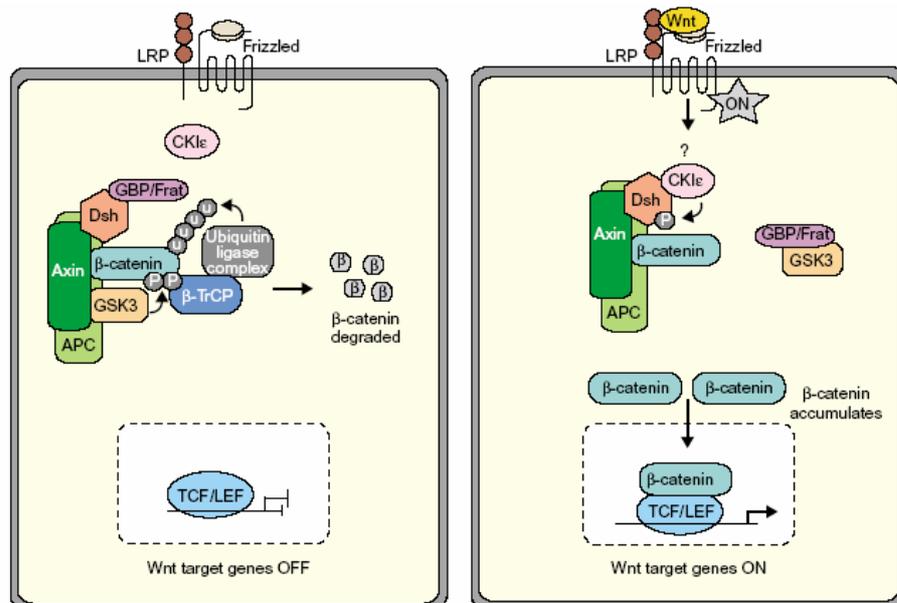


Abb. I-5: Situation bei Aktivierung bzw. Inaktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in Vertebraten (nach Miller 2001). Links ist die Situation im inaktiven Signalweg dargestellt. β -Catenin wird über den β -Catenin-Degradationskomplex abgebaut. Bei Aktivierung des Signalwegs wird der β -Catenin-Degradationskomplex inhibiert. Dies führt zur Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma und zur Wanderung in den Zellkern, wo Expression von Zielgenen des Signalwegs erfolgt.

5.3.1 Xnr-3 ist ein Zielgen des kanonischen Wnt-Signalwegs in *Xenopus*

Vor 11 Jahren wurde in der Maus ein sekretiertes, der *transforming growth factor* (TGF) β – Superfamilie zugehöriges Protein identifiziert, das essentiell für die Induktion des Mesoderms und die Organisation von axialen Strukturen im Verlauf der frühen Embryonalentwicklung in der Maus ist (Zhou *et al.* 1993). Das Gen wurde aufgrund seines Vorkommens im so genannten ‚node‘, einem Organisationszentrum im frühen Maus-Embryo, dem eine dem Spemann-Organisator in Amphibien vergleichbare Bedeutung zukommt, *nodal* genannt. Nodal-ähnliche Gene wurden bislang ausschließlich in Vertebraten identifiziert (Schier 2003), wo sie als Mesoderminduktoren wirken. Im Gegensatz zur Maus, wo lediglich ein Nodal-Gen bekannt ist, existieren im Zebrafisch mit Cyclops, Squint sowie Southpaw drei Nodal-ähnliche Gene, *Xenopus* besitzt mit Xnr 1-6 sogar 6 Nodal-Homologe (Schier 2003).

Unter den *Xenopus nodal related proteins* weist Xnr-3 Besonderheiten auf, die es von allen anderen Xnrs unterscheidet. Im Gegensatz zu den übrigen Xnrs, die sieben konservierte Cysteinreste aufweisen, welche alle essentiell für die Funktionsfähigkeit des Proteins sind, fehlt Xnr-3 das dem C-Terminus nächstgelegene Cystein. Darüber hinaus scheint die Eliminierung von Cysteinresten bei Xnr-3 keine negativen Auswirkungen auf die Funktion des Proteins zu haben (Hansen *et al.* 1997).

Während Xnr-1, -2 (Jones *et al.* 1995), -4 (Joseph & Melton 1997) -5 und -6 (Takahashi *et al.* 2000) die für Nodal-ähnliche charakteristische Fähigkeit zur Induktion von Mesoderm haben, fehlt Xnr-3 diese Funktion. Stattdessen agiert Xnr-3 als Neuralinduktor (Hansen *et al.* 1997). Außerdem wurde festgestellt, dass dieses Protein konvergente Extension fördert, was ebenfalls einzigartig unter den Xnrs ist (Kühl *et al.* 2001, Yokota *et al.* 2003).

Hansen *et al.* (2000) stellten Untersuchungen zu den strukturellen Voraussetzungen an, die der Fähigkeit von Xnr-3 zur Neuralinduktion zugrunde liegen. Dabei wurde festgestellt, dass die Prodomäne, die mit 270 Aminosäuren mehr als zwei Drittel der 397 Aminosäuren umfassenden Proteinsequenz einnimmt, notwendig für die biologische Funktion des Proteins ist. Dies unterscheidet Xnr-3 ebenfalls von Maus-Nodal sowie sämtlichen übrigen Xnrs, wo lediglich das prozessierte Protein für die Aktivität erforderlich ist. Ein struktureller Vergleich zwischen Xnr-2 sowie Xnr-3 ergab, dass für die Fähigkeit zur Mesoderminduktion bei Xnr-2 der C-Terminus und die zentrale Domäne des reifen Proteins erforderlich sind, während im Fall von Xnr-3 die C-terminale und die N-terminale Domäne die Voraussetzung für Neuralinduktion darstellen.

Die Funktion von Xnr-3 spiegelt sich ebenfalls in seinem Expressionsmuster im frühen *Xenopus*-Embryo wider. Es wird lediglich in einem schmalen Zeitfenster vom späten Blastulastadium bis zum Ende der Gastrulation exprimiert. In der zweiten Hälfte der Gastrulation ab Stadium 11,5 nimmt die Xnr-3-Expression jedoch stark ab. Xnr-3-Transkripte wurden ausschließlich auf der dorsalen Seite detektiert. Xnr-3 wird von der äußeren Schicht des Spemann-Organisators sekretiert und findet sich während der Gastrulation in der dorsalen Marginalzone im Bereich der dorsalen Urmundlippe (Smith *et al.* 1995).

Obwohl Aktivierung, Funktion sowie die strukturellen Voraussetzungen für die Sonderstellung von Xnr-3 recht gut erforscht sind, ist relativ wenig über seine Wirkungsweise

bekannt. Ebenso wenig wurden bislang direkte Zielgene von Xnr-3 identifiziert. Es gilt jedoch als sicher, dass Xnr-3 nicht über einen klassischen Nodal-Signalweg wirkt, bei dem die Transkription von Zielgenen durch Phosphorylierung des intrazellulären Effektors Smad 2 aktiviert wird (zusammengefasst in Schier 2003).

Um für die Neuralentwicklung erforderliche Gene zu induzieren, wird nach Hansen *et al.* (1997) folgende Wirkungsweise vorgeschlagen: Aus epithelialen Vorläuferzellen kann Epidermis oder Neuralgewebe entstehen. Xnr-3 fördert die Entstehung von Neuralgewebe auf Kosten des epidermalen Gewebes. Dabei wirkt Xnr-3 antagonistisch zu den Epidermis-induzierenden Faktoren *bone morphogenetic protein* (BMP) 4 und 7. Allerdings ist bislang unklar, ob diese Effekte tatsächlich auf eine direkte Wechselwirkung zwischen Xnr-3 und BMP zurückzuführen sind oder aber durch eine über Xnr-3 aktivierte Signalkaskade ausgelöst werden, die unabhängig von BMP agiert.

Auch hinsichtlich des Mechanismus, über den die Weiterleitung des von Xnr-3 ausgehenden Signals zur Neuralinduktion erfolgt, besteht Unklarheit. Normalerweise erfolgt die Weiterleitung von Signalen für die Entwicklung der Neuralplatte durch mesodermales Gewebe, das als Folge von konvergenter Extension ins Innere des Embryos eingewandert ist (Hemmati-Brivanlou *et al.* 1990). Die Expression von Xnr-3 stoppt jedoch, sobald die Zellen mit der Involution beginnen (Smith *et al.* 1995), so dass Xnr-3 diesen vertikalen Signalweg – senkrecht zur Oberfläche - nicht beschreiten kann. Allerdings wurde beobachtet, dass sich die Neuralplatte in *Xenopus* auch bilden kann, wenn keinerlei Involution stattfindet (Doniach *et al.* 1992). Dies würde bedeuten, dass das Signal vom Spemann-Organisator durch ein planares Signal (parallel zur Oberfläche) zum Ektoderm gelangen müsste.

Kühl *et al.* (2001) wiesen nach, dass Xnr-3 für die konvergente Extension während der Gastrulation erforderlich ist. Es wird vorgeschlagen, dass Xnr-3 über den maternalen FGF-Rezeptor FGFR 1 die Expression des Transkriptionsfaktors *Xenopus* Brachyury (Xbra) aktiviert, was konvergente Extension fördert. Aufgrund der Beobachtung, dass durch Hemmung von FGFR 1 zwar konvergente Extension blockiert wurde, jedoch nicht die Expression von neuralen Markergenen wie NCAM, wird angenommen, dass die beiden Funktionen durch Xnr-3 unabhängig voneinander reguliert werden (Yokota *et al.* 2003).

5.4 Wechselwirkungen zwischen den Wnt-Wegen in *Xenopus*

Die drei oben beschriebenen Wnt-Signalwege wirken keinesfalls isoliert voneinander. Vielmehr stehen sie miteinander in Verbindung und beeinflussen sich gegenseitig.

In allen Wnt-Signalwegen erfolgt die Signalübertragung in die Zelle mittels Frizzled-Rezeptoren. Obwohl die einzelnen Wnts Präferenzen für bestimmte Frizzleds aufweisen, können sie mit mehreren Frizzled-Rezeptoren in Wechselwirkungen treten. In *Drosophila* wurde beobachtet, dass zwar Fz 1 spezifisch den PCP-Signalweg aktiviert, der kanonische Wnt-Signalweg jedoch sowohl über Fz 1 als auch über Fz 2 aktiviert werden kann (Wu *et al.* 2004). Auch in der frühen Embryonalentwicklung von *Xenopus* wird Xfz 7 sowohl für den kanonischen als auch für nicht-kanonische Wnt-Signalwege (Medina *et al.* 2000) genutzt, wobei

Xfz 7 den Wnt/Ca²⁺- sowie den Wnt/PCP-Weg aktivieren kann (Djiane *et al.* 2000). Eine Erklärung, wie selektive Aktivierung eines Signalwegs möglich ist, bieten Carron *et al.* (2003), nach deren Erkenntnissen der Rezeptor den Wnt/PCP-Signalweg aktiviert, wenn er als Monomer vorliegt, während Xfz 7-Dimere den kanonischen Wnt-Signalweg aktivieren.

5.4.1 Wechselwirkungen zwischen kanonischem und Wnt/Ca²⁺- Signalweg

Die Entdeckung, dass eine Überexpression von XWnt-5A den kanonischen Wnt-Signalweg und damit auch konvergente Extensionsbewegungen in *Xenopus* negativ beeinflusst (Du *et al.* 1995, Torres *et al.* 1996), warf die Frage auf, nach welchem Mechanismus diese Hemmung von statten geht. Die Ergebnisse von Kühl *et al.* (2001) legen die Vermutung nahe, dass der Wnt/Ca²⁺-Signalweg auf mindestens zwei Ebenen hemmend in den kanonischen Wnt-Signalweg eingreift. Es wird angenommen, dass PKC mit Dishevelled interagiert und außerdem CamKII auf der Ebene der Lef/TCF-Transkriptionsfaktoren wirkt. Dabei werden Dishevelled sowie die Lef/TCF-Transkriptionsfaktoren über die Kinasen phosphoryliert, was zur Deaktivierung der Proteine und somit des kanonischen Wnt-Signalwegs führt.

Daneben scheint das Wnt/Ca²⁺-Zielgen NF-AT ebenfalls eine hemmende Wirkung auf den kanonischen Wnt-Signalweg auszuüben, indem es unterhalb von Dishevelled, aber oberhalb von β -Catenin, in diesen Signalweg eingreift (Saneyoshi *et al.* 2002).

In Zellkulturen von humanen embryonalen Zellen wurde nachgewiesen, dass Wnt-5A zur Degradierung von β -Catenin beitragen kann, ohne die Aktivität von GSK 3 zu verändern. Es wird angenommen, dass Wnt-5A einen alternativen β -Catenin-Degradationskomplex aktiviert, der auch in der Lage ist, unphosphoryliertes β -Catenin abzubauen (Topol *et al.* 2003).

5.4.2 Wechselwirkungen zwischen kanonischem und Wnt/PCP- Signalweg

Auch zwischen Wnt- β -Catenin- und Wnt/PCP-Weg existieren Überschneidungen. Ein Schlüsselprotein in beiden Signalwegen ist das Protein Dishevelled (Dsh bzw. Dvl). Es wurde bislang in sämtlichen Organismen gefunden, in denen Wnt-Signalwege nachgewiesen wurden. Bei der Erforschung dieses Proteins sind vor allem die Antworten auf folgende Fragen von Interesse: Wie wird entschieden, welcher Signalweg aktiviert wird? Wie steuert Dishevelled die Vielzahl an unterschiedlichen Signalantworten?

Für die Entscheidung, welcher Signalweg von Dishevelled aktiviert wird, scheint die subzelluläre Lokalisation des Proteins eine Rolle zu spielen. In *Drosophila* wurde beobachtet, dass der Rezeptor Dfz 1, der selektiv den PCP-Signalweg aktiviert, für die Anreicherung von Dishevelled an der Membran verantwortlich ist, während Dfz 2, das neben dem PCP-Weg auch den Wntless-Signalweg aktivieren kann, dazu nicht in der Lage ist (Axelrod *et al.* 1998). Dieser Mechanismus scheint auch in Vertebraten der Unterscheidung zugrunde zu liegen, ob Wnt/PCP oder Wnt- β -Catenin-Signalweg aktiviert wird (Wallingford *et al.* 2000). Dishevelled besitzt drei konservierte Domänen, DIX, PDZ und DEP, die mit einer Vielzahl von Effektoren spezifisch interagieren, wodurch festgelegt wird, welche Signalantwort ausgeführt wird.

Die N-terminal gelegene DIX-Domäne interagiert mit Axin (Itoh *et al.* 2000). Ferner ergaben Analysen mit Deletionskonstrukten, dass bei Entfernung der DIX-Domäne der kanonische Wnt-Signalweg selektiv gehemmt wird. Auf den Wnt/PCP-Signalweg wirkt dieses Konstrukt eher aktivierend. In Zebrafisch (Heisenberg *et al.* 2000) und in *Xenopus* (Tada & Smith 2000) ist Dsh Δ DIX in der Lage, das Fehlen von Wnt-11 zu kompensieren. Im Gegensatz dazu ist die C-terminale DEP-Domäne essentiell für den Wnt/PCP-Signalweg, ohne einen Einfluss auf den kanonischen Wnt-Signalweg zu haben, wie aus Analysen mit Mutationen in dieser Domäne in *Drosophila* (Axelrod *et al.* 1998) sowie *Xenopus* (Wallingford *et al.* 2000) hervorging. Es gibt jedoch Hinweise, dass die DEP-Domäne, zumindest in *Drosophila*, auch eine Bedeutung im kanonischen Wnt-Signalweg besitzt (Penton *et al.* 2002). Aus Beobachtungen in unterschiedlichen Systemen, bei denen Mutationen in der PDZ-Domäne sowohl den Wnt/PCP- als auch den kanonischen Wnt-Signalweg beeinträchtigten, wurde geschlossen, dass dieser Domäne eine regulatorische Funktion für die Stabilität bzw. für die Lokalisation des Proteins zukommt (zusammengefasst in Wharton 2003).

Somit stellt Dishevelled eine Schnittstelle zwischen kanonischem und Wnt/PCP-Signalweg dar, wobei durch die Lokalisation des Proteins in der Zelle sowie durch die Interaktionen mit für den einen bzw. den anderen Signalweg spezifischen Komponenten entschieden wird, auf welche Art die Signalweiterleitung erfolgt.

Eine andere Art der Interaktion zwischen den beiden Signalwegen lassen die Erkenntnisse von Tada & Smith (2000) sowie Yokota *et al.* (2003) vermuten. Yokota *et al.* zeigten, dass Xnr-3, ein Zielgen des kanonischen Wnt-Signalwegs in *Xenopus*, konvergente Extension steuert, indem es über einen FGF-Rezeptor den Transkriptionsfaktor Xbra aktiviert. Tada & Smith wiesen nach, dass XWnt-11, der Ligand für den Wnt/PCP-Signalweg in *Xenopus*, ein direktes Zielgen von Xbra ist. Fasst man die Ergebnisse aus diesen beiden Publikationen zusammen, so ist anzunehmen, dass Xnr-3 über Xbra das Signalmolekül XWnt-11 innerhalb einer linearen Kaskade aktiviert, was dafür sprechen würde, dass der Wnt/PCP-Weg unterhalb des kanonischen Wnt-Signalwegs liegt und durch diesen aktiviert wird.

5.4.3 Wechselwirkungen zwischen den nicht-kanonischen Wnt-Signalwegen

Am wenigsten ist bislang über Wechselwirkungen zwischen dem Wnt/PCP- und dem Wnt/Ca²⁺-Signalweg bekannt. Obwohl das Modell der drei Wnt-Signalwege (Huelsenken & Behrens 2002) allgemein anerkannt ist, spricht einiges dafür, dass es sich bei den beiden nicht-kanonischen Wnt-Signalwegen um verschiedene Verzweigungen derselben Signalkaskade handelt.

Hinweise für diese Vermutungen ergeben sich aus Erkenntnissen, dass dieselben Liganden - Wnt-5A sowie Wnt-11 - in der Lage sind, sowohl den Wnt/PCP- als auch den Wnt/Ca²⁺-Signalweg zu aktivieren (Kühl *et al.* 2000, Killian *et al.* 2003). Außerdem scheint Dishevelled auch im Wnt/Ca²⁺-Signalweg von Bedeutung zu sein, wobei gezeigt wurde, dass Dsh Δ DIX, welches ausreichend für die Aktivierung des Wnt/PCP-Signalwegs ist (Heisenberg *et al.* 2000, Tada & Smith 2000), zu Kalziumeinstrom sowie zur Aktivierung von PKC und CamKII, Zielgenen des Wnt/Ca²⁺-Signalwegs, führt (Sheldahl *et al.* 2003).

6 Konvergente Extension erfordert Modulation der Zelladhäsion

Um Zellbewegungen zu ermöglichen, ist es nicht nur notwendig, über die Steuerung der beteiligten Signalkaskaden den Ablauf des zur Einleitung und Aufrechterhaltung der Zellbewegungen genetischen Programms zu gewährleisten. Eine weitere Voraussetzung besteht in der Modulation der Adhäsion der beteiligten Zellen. Die mechanische Verbindung einer Zelle mit ihrer Umgebung erfolgt auf zwei Arten. Zum einen haften Zellen an ihre Nachbarzellen, zum anderen sind sie mit der extrazellulären Matrix verbunden.

6.1 Zell-Matrix-Adhäsion

Die Verbindung der Zelle mit der extrazellulären Matrix erfolgt über Fokaladhäsionen, wobei Integrine, eine Gruppe von transmembranen Adhäsionsproteinen, eine zentrale Rolle spielen. Integrine sind Heterodimere aus einer α - sowie einer β -Untereinheit. Beim Menschen existieren 9 unterschiedliche β - und 24 verschiedene α -Untereinheiten. Durch vielfältige Kombination der Untereinheiten lassen sich eine Vielzahl verschiedener Integrinmoleküle bilden, die mit spezifischen Partnern interagieren. Intrazellulär sind die Integrine mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Der Kontakt mit der extrazellulären Matrix wird über Kollagene, Laminine oder Fibronectin, ein bei sämtlichen Wirbeltieren vorhandenes Glykoprotein, hergestellt.

Fibronectin kommt dabei während der frühen Embryonalentwicklung in Vertebraten besondere Bedeutung zu. Bei Mäusen (George *et al.* 1993) und Hühnern (Harrison *et al.* 1994) führt das Fehlen von Fibronectin zu schweren Störungen von mesodermalen Strukturen bzw. zu Defekten bei Zellbewegungen im einwandernden Mesoderm.

Auch in Amphibien ist Fibronectin essentiell für die Involution und spätere Wanderung des Mesoderms, wie Untersuchungen an Salamandern zeigten (Darribere *et al.* 1988). In *Xenopus* besteht bislang noch Unklarheit über die Bedeutung von Fibronectin im Verlauf von Gastrulationsbewegungen. Während unstrittig ist, dass Fibronectin *in vitro* Wanderungsbewegungen im Mesoderm fördert, so bestehen nach wie vor gegensätzliche Auffassungen, ob diese Komponente der Zellmatrix essentiell für Gastrulationsbewegungen *in vivo* ist (zusammengefasst in Marsden & DeSimone 2001).

Die Untersuchungen von Marsden und DeSimone (2001) lieferten erste Hinweise, auf welche Weise Interaktion von Integrinen und Fibronectin bedeutend für Gastrulationsbewegungen in *Xenopus* sein könnte. Mutation der β_1 -Untereinheit von $\alpha_5 \beta_1$ -Integrin, dem ubiquitär vorkommenden Fibronectin-Rezeptor, hatte eine Reduzierung der Fibronectinmatrix zur Folge. Das Fehlen dieser Matrix führte dazu, dass im ektodermalen Blastocoeldach keine radiale Interkalation stattfinden konnte. Zum einen ist dies Voraussetzung für Epibolie im Ektoderm, zum anderen dient das Blastocoeldach als Matrix für das mesodermale Gewebe während der konvergenten Extension.

Ob eine Störung der radialen Interkalation im Blastocoeldach die Ursache für Defekte in konvergenter Extensionsbewegung darstellt, ist unklar. Allerdings deutet die Beobachtung,

dass eine dynamische Neuordnung der Fibronectinmatrix im Verlauf der Gastrulation und Neurulation ebenfalls an der Grenze zwischen dem Notochord und dem somitischen Mesoderm, einer für konvergente Extension wichtigen Stelle, gefunden wird (Davidson *et al.* 2004), darauf hin, dass Integrin-Fibronectin-Interaktion in mehrfacher Hinsicht wichtig für diese Zellbewegung ist.

6.2 Cadherine steuern Zell-Zell-Adhäsion

Ein wichtiger Bestandteil der Adhäsionsverbindungen, die Zell-Zell-Kontakte steuern, sind die Cadherine, eine Gruppe von kalziumabhängigen transmembranen Adhäsionsmolekülen. Das am besten untersuchte Cadherin ist E-Cadherin, das während der gesamten Embryonalentwicklung in Wirbeltieren exprimiert wird und im adulten Tier verantwortlich für den Zusammenhalt der Zellen im epithelialen Gewebe ist. E-Cadherin sowie weitere klassische Cadherine wie das im Neuralgewebe vorhandene N-Cadherin gewährleisten Zelladhäsion, indem sie sich zunächst zu Dimeren zusammenlagern. Die intrazellulären Bereiche der Cadherine sind über die Ankerproteine α -, β - und γ -catenin/vinculin mit dem Aktinzytoskelett der Zelle verbunden. Dieser Komplex wird als *adherens junction* bezeichnet. Um zwei Zellen miteinander zu verbinden, gehen die Cadherine homophile Bindungen an ihren extrazellulären Domänen ein (Kemler 1992).

Die Gruppe der klassischen Cadherine zeigt starke strukturelle Gemeinsamkeiten. So besitzen sie fünf extrazelluläre Domänen, eine kurze Transmembrandomäne sowie eine konservierte intrazelluläre Domäne, die eine β -Catenin-Bindestelle trägt (Angst *et al.* 2001).

6.2.1 Protocadherine sind die größte Gruppe der Cadherin-Familie

Die größte Gruppe innerhalb der Cadherine stellen die Protocadherine mit bislang mehr als 60 charakterisierten Mitgliedern in Säugetieren dar (Frank & Kemler 2002). In der Embryonalentwicklung von Wirbeltieren üben sie eine Rolle in der Differenzierung von Geweben aus. Im adulten Organismus sind sie an der Bildung von spezifischen Strukturen beteiligt. So ist Protocadherin 8 beispielsweise in die Bildung von Synapsen involviert.

Im Gegensatz zu den klassischen Cadherinen handelt es sich bei den Protocadherinen um eine sehr heterogene Gruppe. So differiert die Anzahl der extrazellulären Cadherindomänen zwischen vier bei μ -Protocadherin und elf bei Protocadherin 15. Die zytoplasmatischen Domänen der verschiedenen Protocadherine sind sehr heterogen, allerdings wurde im Gegensatz zu den klassischen Cadherinen bisher in keinem Fall eine β -Catenin-Bindestelle nachgewiesen. Eine weitere Besonderheit der Protocadherine ist die Tatsache, dass nur ein Exon für das gesamte Gen codiert (Übersicht in Frank & Kemler 2002).

Aufgrund der großen Vielfalt ist wahrscheinlich, dass Protocadherine zur Interaktion mit einer Vielzahl von verschiedenen Partnern befähigt sind. So wird angenommen, dass Protocadherine neben homophilen auch heterophile Interaktionen eingehen können (Übersicht in Frank & Kemler 2002).

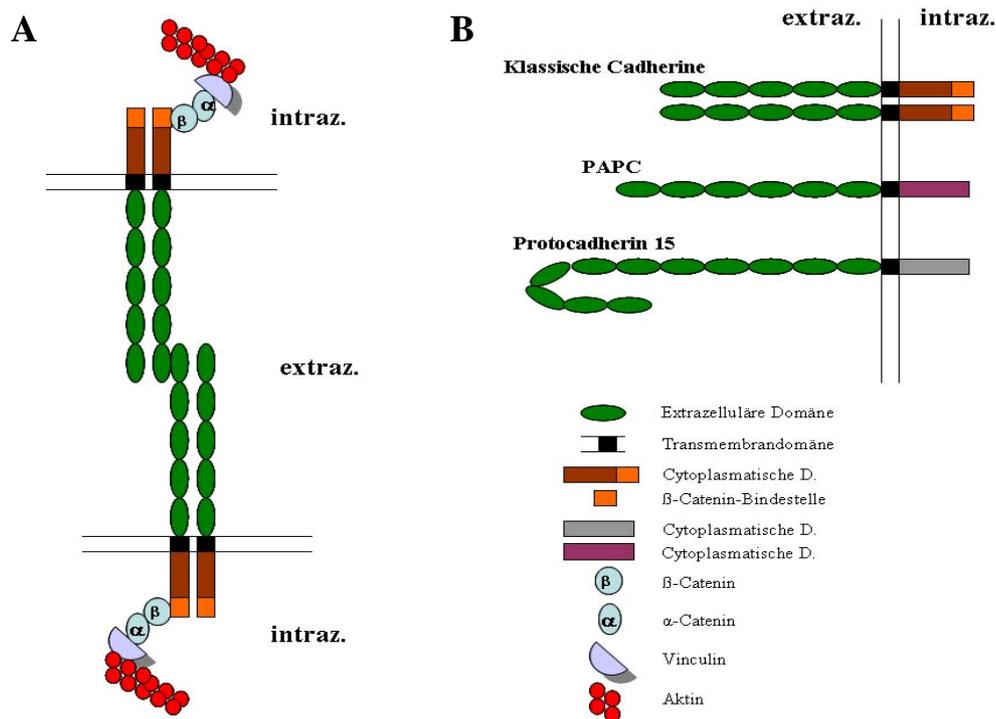


Abb. I-6: Vergleich verschiedener Cadherine

A: klassische Cadherine dimerisieren und gehen homophile Bindungen ein, um Zell-Zell-Adhäsion zu gewährleisten. Die Zytoplasmatische Domäne bindet an β -Catenin. Über α -Catenin und Vinculin wird eine Verbindung zum Zytoskelett hergestellt. B: Die Struktur von verschiedenen Cadherinen im Vergleich. Den klassischen Cadherinen sind PASC sowie Protocadherin 15 als Vertreter der Protocadherine gegenüber gestellt.

6.2.2 PASC ist wichtig für die frühe Wirbeltierentwicklung

Neben dem axialen Protocadherin AXPC sowie *neural fold* Protocadherin NFPC ist das paraxiale Protocadherin PASC wichtig für die frühe Wirbeltierentwicklung. Untersuchungen zur Funktion von PASC existieren in Mäusen, Zebrafisch sowie *Xenopus*. In Mäusen spielt PASC eine Rolle bei der Somitenbildung, indem es möglicherweise die korrekte Organisation des Epithels an den Segmentgrenzen gewährleistet (Rhee *et al.* 2003). Allerdings hat das Fehlen von PASC keine sichtbaren Auswirkungen auf den Phänotyp der Tiere (Yamamoto *et al.* 2000). Auch in *Xenopus* ist PASC an der Bildung der Grenzen zwischen den Segmenten während der Somitogenese beteiligt (Kim *et al.* 2000). Daneben besitzt es im Krallenfrosch auch eine Funktion zu einem früheren Zeitpunkt der Entwicklung, indem es für konvergente Extensionsbewegungen des Mesoderms während der Gastrulation benötigt wird (Kim *et al.* 1998). Auch im Zebrafisch ist PASC für die konvergente Extension während der Gastrulation erforderlich (Yamamoto *et al.* 1998).

Über die Aktivierung und Regulation von PASC ist bislang relativ wenig bekannt. Untersuchungen in Mäusen sowie in *Xenopus* lassen jedoch vermuten, dass Lim-1, ein Protein, das im Spemann-Organisator exprimiert wird und dem in *Xenopus* die Fähigkeit zur Mesoderminduktion zugeschrieben wird, für die Aktivierung von PASC von Bedeutung ist (Hukriede *et al.* 2003).

6.2.3 *Xenopus Paraxial Protocadherin (XPAPC)*

1998 wurde eine Arbeit veröffentlicht, die umfassende Studien zur Struktur, Expression sowie Funktionsweise von XPAPC vorstellte (Kim *et al.* 1998):

Das Protein umfasst 979 Aminosäuren. Es besitzt ein N-terminales, 18 Aminosäuren langes Signalpeptid sowie sechs extrazelluläre Cadherindomänen, die mit einer Gesamtlänge von fast 700 Aminosäuren den größten Teil des Proteins ausmachen. Die Transmembrandomäne ist mit 22 Aminosäuren recht kurz. Daran schließt sich C-terminal die intrazelluläre Domäne an. XPAPC tritt im Froschemryo erstmals im späten Blastulastadium in der dorsalen Marginalzone auf. Im Verlauf der Gastrulation dehnt sich der Bereich der XPAPC-Expression über das mesodermale Gewebe im gesamten posterioren Bereich des Embryos aus. Lediglich entlang der dorsalen Mittellinie, wo sich später das Notochord bildet, ist keine XPAPC-mRNA vorhanden. Ausschließlich in diesem Bereich tritt am Ende der Gastrulation das Protocadherin AXPC auf. So wird das Mesoderm durch die spezifische Expression der beiden Protocadherine in zwei komplementäre Regionen unterteilt, was möglicherweise wichtig ist für die Differenzierung in axiales Mesoderm, woraus sich später das Notochord bildet und paraxiales Mesoderm, aus dem die Somiten entstehen.

Der Einfluss von XPAPC auf die konvergente Extension des Mesoderms im Verlauf der Gastrulation wurde anhand von zwei Deletionskonstrukten untersucht. In M-XPAPC fehlt die intrazelluläre Domäne, das sekretierte und dominant-negative S- bzw. DN-XPAPC enthält lediglich die extrazellulären Domänen. Im *animal cap assay*, wo Gastrulationsbewegungen des Mesoderms anhand von animalen Kappen aus Blastulastadien simuliert werden, wurde nachgewiesen, dass beide Deletionskonstrukte die Elongation der animalen Kappen hemmen. Der Grund hierfür lag nicht in einer Störung der Adhäsionsfähigkeit begründet, da M-XPAPC eher eine Verstärkung der Adhäsion bewirkt. So wurde vermutet, dass es sich bei XPAPC nicht nur um ein Adhäsionsmolekül sondern um „einen Bestandteil der Maschinerie, die Gastrulationsbewegungen in *Xenopus* steuert“ (Kim *et al.* 1998), handelt.

7 Konvergente Extension erfordert Umstrukturierung des Zytoskeletts

Eine weitere Voraussetzung für Zellbewegungen wie konvergente Extension ist eine Modulation des Zytoskeletts, so dass Veränderungen der inneren Struktur der Zelle sowie dynamische Kontakte zu benachbarten Zellen ermöglicht werden.

Eine wichtige Funktion hierbei nehmen kleine GTPasen der Rho-Familie ein. Kleine GTPasen sind molekulare Schalter, die in zwei Zuständen auftreten: in inaktiver GDP-gebundener Form sowie in aktiver GTP-gebundener Form. Die Aktivierung erfolgt über GEFs, die den Austausch von GDP gegen GTP fördern. Für die Inaktivierung der kleinen GTPasen sind GAPs zuständig, die mittels Abspaltung eines Phosphats die GTP-gebundene in die GDP-gebundene Form überführen.

Die Funktion der kleinen GTPasen wurde bislang hauptsächlich in Säugern untersucht. Allerdings ist davon auszugehen, dass die der Wirkungsweise dieser Moleküle zugrunde

liegenden Mechanismen innerhalb der Wirbeltiere konserviert sind. In Säugern sind mittlerweile mehr als zehn Rho-GTPasen bekannt. Am besten untersucht sind Rho A-C, Rac 1 und 2 sowie Cdc 42. Die Aktivierung der Rho-GTPasen kann über verschiedene Tyrosinkinase-, Zytokin- oder Adhäsionsrezeptoren erfolgen. Ähnlich vielfältig wie die Art ihrer Aktivierung ist auch das Spektrum ihrer Funktionen. So sind sie neben der Umstrukturierung des Zytoskeletts auch an der Steuerung der Transkriptionsaktivität, des Zellzyklus sowie von Transportvorgängen an der Zellmembran beteiligt (zusammengefasst in Kaibuchi *et al.* 1999).

Aktivierung von Rho, Rac sowie Cdc 42 hat eine Polymerisierung des Aktinzytoskeletts zur Folge, wobei sich allerdings die hierdurch gebildeten Strukturen unterscheiden. So induziert Rho eine Ansammlung von kontraktile Aktin-Myosin-Filamenten, so genannten *stress fibers*, die die Zelle durchziehen. Rac bewirkt die Anordnung von Aktinnetzwerken in der Peripherie der Zelle, die Lamellipodien sowie Membranfaltungen bilden, während Cdc 42 die Ausbildung von aktinreichen, fadenartigen Fortsätzen an der Oberfläche der Zelle, so genannte Filopodien, fördert.

7.1 Modulation des Zytoskeletts ist eng mit Zelladhäsion verknüpft

Die Fähigkeit der Modulation des Zytoskeletts ist eng verbunden mit der Regulation der Zelladhäsion. So induziert Rho die Bildung von Fokaladhäsionen, an denen die *stress fibers* über Integrine in der Fibronektin-Matrix eingebunden und somit für die Verankerung der Zelle in der extrazellulären Matrix verantwortlich sind. Rac und Cdc 42 hingegen fördern Zell-Zell-Adhäsion an den *adherens junctions*, indem sie das Protein IQGAP 1 binden. Liegt die GTPase in inaktiver Form vor, so interagiert IQGAP 1 mit dem Cadherin-Catenin-Aktin-Komplex, was zur Abspaltung von α -Catenin und Aktin führt. Die Funktionen der einzelnen GTPasen sind jedoch vielfältig und oft sehr ähnlich. So besitzt Rac bei der Steuerung der Zell-Matrix-Adhäsion eine mit Rho vergleichbare Funktion. Es wurde außerdem beobachtet, dass ein Wechselspiel zwischen Aktin-Polymerisierung und -Depolymerisierung, das für die Veränderung der Zellform und den dynamischen Kontakt der Zelle mit ihrer Umgebung während der Wanderung erforderlich ist, auf ein koordiniertes Zusammenspiel von Rho und Rac zurückzuführen ist (zusammengefasst in Kaibuchi *et al.* 1999).

8 Ausblick

Die drei Wnt-Signalwege sind die wichtigsten Steuerungsmechanismen, um die molekularen und strukturellen Grundlagen für konvergente Extension auf zellulärer Ebene umzusetzen. In Zusammenarbeit mit einer Anzahl weiterer Komponenten sorgen sie für folgende Prozesse auf zellulärer Ebene, die konvergente Extension ermöglichen:

- Umwandlung der multipolaren in bipolare Zellen, was die Voraussetzung für Zellinterkalation schafft
- Ein dynamisches Zelladhäsionsverhalten durch ständiges Lösen und Knüpfen von Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Kontakten
- Eine Umorganisation des Zytoskeletts als Grundvoraussetzung für die beiden erstgenannten Prozesse

Die genannten drei Prozesse sind eng miteinander verbunden. Konvergente Extension ist nur möglich, wenn die Umorganisation des Zytoskeletts, Veränderung der Zellform sowie des Zelladhäsionsverhaltens koordiniert ablaufen und eine Einheit bilden.

Mittlerweile existiert eine recht detaillierte Vorstellung, auf welchem Weg und über welche Effektoren die Wnt-Signalwege konvergente Extension steuern. Ebenso weiß man recht genau über die zellulären Abläufe im Verlauf von konvergenter Extensionsbewegung bescheid. Allerdings existieren bislang lediglich bruchstückartige Hinweise darauf, wie die an den Zellbewegungen beteiligten Signalkaskaden mit der Regulation der Zelladhäsion in Zusammenhang stehen.

Wichtige Verbindungsglieder zwischen Signaltransduktion und dem Zelladhäsionsverhalten der Zelle könnten die kleinen GTPasen der Rho-Familie darstellen. Es existieren außerdem Hinweise, dass Mitglieder der Protocadherine neben der Steuerung der Zelladhäsion auch bei der Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielen.

Die Forschung auf diesem Gebiet konzentriert sich unter anderem auf folgende Fragen:

- Auf welche Art erfolgt Interaktion der einzelnen Wnt-Wege sowie mit anderen Signalwegen wie dem MAP-Kinase-Signalweg oder dem TGF β -Signalweg?
- Über welche molekularen Effektoren und Mechanismen erfolgt die Verbindung von Signaltransduktion und Zelladhäsion?
- Auf welchem Weg werden die molekularen Grundvoraussetzungen geschaffen, um den koordinierten Ablauf der an konvergenter Extension beteiligten Prozesse zu gewährleisten?

9 Zielsetzung der Arbeit

Der Wnt/PCP-Signalweg ist in *Xenopus* essentiell für die konvergente Extensionsbewegung des Mesoderms im Verlauf der Gastrulation. Allerdings existieren ebenfalls Hinweise, dass eine Überaktivierung dieses Signalwegs konvergente Extension in negativer Weise beeinflusst. Durch Mikroinjektion eines XWnt-11-Morpholinos, XWnt-11-mRNA sowie von dominant-negativen und konstitutiv aktiven intrazellulären Effektoren wird dieser Signalweg in seiner Aktivität verändert. Mittels Analyse von Keller-Explantaten soll eine detaillierte Untersuchung vorgenommen werden, inwieweit eine Veränderung der Aktivität des Wnt/PCP-Signalwegs konvergente Extension beeinflusst. Darüber hinaus sollen durch diese Versuche Aufschlüsse gewonnen werden, über welche intrazellulären Komponenten der Wnt/PCP-Signalweg konvergente Extension steuert.

Neben dem Wnt/PCP-Signalweg ist der kanonische Wnt-Signalweg ebenfalls essentiell für konvergente Extension, indem das Zielgen *Xnr-3* aktiviert wird (Kühl *et al.* 2001). Es existieren Hinweise, dass XWnt-11 und somit der Wnt/PCP-Signalweg möglicherweise über *Xnr-3* aktiviert wird (Tada & Smith 2000, Yokota *et al.* 2003). Die Vermutung einer Abhängigkeit der XWnt-11-Expression vom kanonischen Wnt-Signalweg und dessen Zielgen *Xnr-3* soll mittels Echtzeit-RT-PCR-Analyse überprüft werden. Ferner sind Coinjektionsexperimente geplant, um herauszufinden, ob und auf welcher Ebene Interaktionen zwischen den beiden Signalwegen bestehen.

Aufgrund seiner Bedeutung bei konvergenter Extension ist die Erlangung von Kenntnissen zur Funktionsweise von *Xnr-3* wichtig, um genauere Aufschlüsse über die dieser Zellbewegung zugrunde liegenden zellulären Mechanismen zu erhalten. Bislang wurde jedoch noch kein direktes Zielgen von *Xnr-3* identifiziert. Mittels eines substraktiven Screens unter Verwendung eines Kits der Firma BD Biosciences sollen *Xnr-3*-abhängig regulierte Gene selektiv amplifiziert werden und eine cDNA-Bibliothek dieser Gene angelegt werden. Die Identifizierung von *Xnr-3*-Zielgenen soll durch radioaktive Hybridisierung zum Ausschluss von Falsch-Positiven cDNA-Klonen bzw. Sequenzierung von potentiellen *Xnr-3*-Zielgenen erfolgen.

Von großem Interesse ist ferner die Beantwortung der Frage, über welche zellulären Mechanismen Zelladhäsionsmoleküle wie Cadherine wirken und ob ein Zusammenhang zu den Wnt-Signalwegen, die für diese Zellbewegungen bedeutend sind, besteht. Im Fall des paraxialen Protocadherins in *Xenopus* (XPAPC) wird ein solcher Zusammenhang vermutet (Kim *et al.* 1998). Mittels Coinjektionen von Komponenten der an konvergenter Extension beteiligten Wnt-Signalwegen mit XPAPC bzw. eines XPAPC-Morpholinos sollte herausgefunden werden, ob und über welche Effektoren ein Zusammenhang zwischen XPAPC und den Wnt-Signalwegen besteht.

II MATERIAL & METHODEN

1 Materialien

1.1 Enzyme und Chemikalien

1.1.1 Enzyme

DNase I	Roche Diagnostics, Mannheim
GoTaq DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
Proteinase K	Merck KGaA, Darmstadt
RNase Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Promega, Mannheim
RNA-Polymerasen (SP6, T3 und T7)	Promega, Mannheim
Taq DNA-Polymerase	Promega, Mannheim

1.1.2 Chemikalien

2-log DNA Marker	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Agarose	GIBCO, Schottland
Agar	GIBCO, Schottland
Baktotrypton	GIBCO, Schottland
Blocking-Reagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
BSA	PAA Laboratories, Cölbe
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
[α - ³² P] dCTP Redivue Tip TM RT 3000	Amersham; New York, USA
Desoxyribonukleotide	Promega, München
DIG RNA Labelling Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
Fluorescein RNA Labelling Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
Hefeextrakt	USB; Cleveland, USA
iQ Sybr Green Supermix	Bio-Rad, München
Magermilchpulver	Heierler Cenovis, Radolfzell
Morpholino-Oligonukleotide	GeneTools; Philmath, USA
NBT/BCIP Stock Solution	Roche Diagnostics, Mannheim
Oligo-(dT) ₂₅ -Dynabeads	Dynal Biotech, Hamburg
Pferdeserum	Invitrogen, Karlsruhe
Phenol/Chloroform-Lösung	Promega, Mannheim
Phenol/Chloroform-Lsg (Tris-ges., pH 8.2)	Promega, Mannheim
Temed	Bio-Rad, München
Tween 20	Serva, Heidelberg
[α - ³² P] UTP	Amersham; New York, USA

Alle übrigen verwendeten Chemikalien wurden über folgende Firmen bezogen: AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma Aldrich Chemie (Taufkirchen).

1.2 Puffer und Lösungen

- Alkalische Phosphatase-Puffer (AP-Puffer) für NBT/BCIP
100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 0,1 % (v/v) Tween 20
- Antikörperlösung für Immunfärbung
Erst- bzw. Zweitantikörper in der angegebenen Verdünnung in PBST + 10% Pferdeserum + 5% DMSO geben
- Antikörperlösung für *in situ* Hybridisierung
Anti-DIG- bzw. Anti-Fluorescein-AP Fab Fragments; 1:2000 in Blockierungspuffer verdünnt
- APBS
2,7 mM KCl, 0,15 mM KH₂PO₄, 103 mM NaCl, 0,7 mM Na₂PO₄, pH 7.5
- Blockierlösung für Westernblot
10 % (w/v) Milchpulver in TBST
- Blockierungspuffer für *in situ* Hybridisierung
1x BMB, 10 % (v/v) Pferdeserum, 0,05 % (v/v) Tween 20 in DEPC-H₂O
- Blotpuffer für Westernblot
25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol
- BMB (5x)
10 % (w/v) Blocking-Reagenz in 5x MAB
- BSA-Lösung
1 % BSA in H₂O
- Cysteinhydrochlorid-Lösung
2 % (w/v) Cysteinhydrochlorid in H₂O, pH 8.0
- Denhardt's (50x)
1 % (w/v) BSA, 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon, 1 % (w/v) Ficoll 400
- DEPC-Wasser
1 ml Diethylpyrocarbonat über Nacht in 1 l Wasser leicht schütteln, anschließend autoklavieren.
- Detektionspuffer für Westernblot
100 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20
- Elektrophoreselaufpuffer für SDS-PAGE
25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
- Färbelösung für *in situ* Hybridisierung
1 % (v/v) NBT/BCIP-Stammlösung in AP-Puffer

- Färbelösung für Westernblot
1 % (v/v) NBT/BCIP-Stammlösung in Detektionspuffer
- HCG-Lösung
HCG in 0,5 M NaCl lösen
- Heparin-Lösung
100 mg/ml in DEPC- H₂O
- *Hogness freezing medium*
18 g KH₂PO₄, 63 g K₂HPO₄, 4,5 g Natriumcitrat, 0,9 g (NH₄)₂SO₄, 440 g Glycerin, mit H₂O auf einen Liter auffüllen
- Hybridisierungspuffer für *in situ* Hybridisierung
50 % (v/v) Formamid deionisiert, 5x SSC, 2 % (v/v) Torula RNA-Lösung, 0,1 % (v/v) Heparinlösung, 1x Denhardt's, 0,1 % (v/v) Tween 20, 0,1 % (w/v) CHAPS, 5 mM EDTA
- IPTG-Lösung
100 mM IPTG in H₂O lösen
- Ladepuffer (6x) für Agarosegelelektrophorese
0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol, 30 % (v/v) Glycerin
- LB-Medium
1 % (w/v) Baktotrypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl
- LB-Agar
1,5 % Agar in LB-Medium lösen und autoklavieren; nach Abkühlen auf etwa 50°C Antibiotika in einer Konzentration von 100 µg/ml zugeben
- MAB (5x)
0,5 M Maleinsäure, 0,75 M NaCl, pH 7.5
- MBSH
880 mM NaCl, 24 mM NaHCO₃, 100 mM KCl, 4 mM CaCl₂, 3,3 mM Ca(NO₃)₂, 100 mM HEPES, 8 mM MgSO₄, pH 7.4
- MEMFA (10x)
100 mM MOPS pH 7.4, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, 0,1 % (v/v) Tween 20, 4 % (v/v) Formaldehyd
- *Mild stripping solution*
5 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM EDTA, 0,1x Denhardt's
- Natriumphosphat-Waschpuffer für radioaktive Hybridisierung
5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, pH 7.2
- NileBlue-Färbelösung
0,01 % (w/v) NileBlue-Chlorid über Nacht in 0,5 M Phosphatpuffer pH 7.8 lösen und die noch vorhandenen Partikel durch einen Faltenfilter abtrennen
- NOP-Puffer inkl. Protease Inhibitor
10 mM Tris-HCl pH 7.8, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,75 mM CaCl₂, 2 % Nonidet P40
In 10 ml NOP-Puffer wird eine Tablette Complete Protease Inhibitor Cocktail gelöst

- PBS
37 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7.5
- PBST
0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS
- Ponceau S Färbelösung
1 % (v/v) Essigsäure, 0,5 % (v/v) Ponceau S
- Prähybridisierungslösung für radioaktive Hybridisierung
5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, pH 7.2, 0,7 % (w/v) SDS
- Proteinase K-Lösung
10 µg/ml Proteinase K in TBST
- SDS-Ladepuffer (5x)
500 mM Tris-HCl pH 6.8, 10 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
- SOB-Medium
2 % (w/v) Baktotrypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,05 % (w/v) NaCl, 0,25 % (w/v) MgCl₂ x 6 H₂O, pH 7.0
- SOC-Medium
SOB, 20 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄, 20 mM Glucose
- SSC (20x)
3 M NaCl, 300 mM Na-Citrat, pH 7.0
- TAE-Puffer
40 mM Tris/Acetat, pH 8.3, 1 mM EDTA
- TBST
25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂
- TFB 1
30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 15 % (v/v) Glycerol, pH 5.8. Die Lösung wird anschließend steril filtriert
- TFB 2
100 mM MOPS pH 6.5, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15 % Glycerol. Die Lösung wird vor Gebrauch steril filtriert
- Torula RNA-Lösung
50 mg/ml Torula RNA in DEPC- H₂O lösen
- Triethanolamin-Lösung
100 mM Triethanolamin, pH 7.4 in DEPC- H₂O
- X-Gal-Lösung
50 mg/ml X-Gal in N,N'-dimethylformamid (DMF) lösen

1.3 Antikörper

Primärantikörper:

- Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Anti-Fluorescein-AP Fab Fragments (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Anti-phospho-Histon H3 – polyklonaler Kaninchen-AK (BIOMOL, Heidelberg)
- b6-2A12 – monoklonaler Maus-AK, gegen *Xenopus nuclear factor 7* (C. Dreyer, MPI, Tübingen)
- m9E10 – monoklonaler Maus-AK, Epitop gegen humanes c-Myc (J. Behrens, MDC, Berlin)

Sekundärantikörper:

- GAM-AP: AP-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG (Dianova, Hamburg)
- GAR-AP: AP-konjugierte Ziege-anti-Kaninchen IgG (Dianova, Hamburg)
- GAR-cy3: CyTM-3-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG (Dianova, Hamburg)

1.4 Plasmide

Tab. II-1: verwendete Plasmide

	Vektor	Eigenschaft	Verwendung	Quelle	Referenz
Aktivin-Xnr3	pSP 64T3	Xnr-3 mit Aktivin-Prodomäne	Mikroinjektion	W. Smith, Santa Barbara, USA	Hansen <i>et al.</i> 2000
β-Catenin	pSP 64T3	aktiv	Mikroinjektion	R.T. Moon, Washington, USA	
cm Xnr-3	pGEM5Zf	„Cleavage-Mutante“	Mikroinjektion	W. Smith, Santa Barbara, USA	Hansen <i>et al.</i> 2000
Chordin	pBS SK	cDNA-Klon	<i>In situ</i> Hybrid.	E. De Robertis, LA, USA	
Geminin	pCS 2	aktiv	Mikroinjektion	M.W. Kirschner, Boston, USA	Kroll <i>et al.</i> 1998
JNK	pDH 105	konst. aktiv	Mikroinjektion	M. Köhl, Ulm	Nishitoh <i>et al.</i> 1998
mGFP	pCS 2	aktiv	Mikroinjektion	E. De Robertis, LA, USA	Kim <i>et al.</i> 1998
M-XPAPC	pCS 2	Deletionsmut.	Mikroinjektion	E. De Robertis, LA, USA	Kim <i>et al.</i> 1998
S-XPAPC	pCS 2	dom. negativ	Mikroinjektion	E. De Robertis, LA, USA	Kim <i>et al.</i> 1998
Xbra	pGEM7	aktiv	Sonde f. radio-aktive Hybr.	Paul Wilson	Smith <i>et al.</i> 1991
XDshΔDEP	pCS 2	Deletionsmut.	Mikroinjektion	R.T. Moon, Washington, USA	Miller <i>et al.</i> 1999
XDshΔDIX	pCS 2	Deletionsmut.	Mikroinjektion	R.T. Moon, Washington, USA	Miller <i>et al.</i> 1999
Xfz 7		aktiv	Mikroinjektion	H. Steinbeisser, Heidelberg	
XLef-1	pCS 2	aktiv	Mikroinjektion	D. Gradl, Karlsruhe	

Xnr-3-myc	pCS 2	aktiv	Mikroinjektion		
XPAPC	pCS 2	aktiv	Mikroinjektion	E. De Robertis, LA, USA	Kim <i>et al.</i> 1998
XRac1-N17	pCS 2	dom. negativ	Mikroinjektion	K. Giehl, Ulm	Stahle <i>et al.</i> 2003
XRac1-V12	pCS 2	konst. aktiv	Mikroinjektion	K. Giehl, Ulm	Stahle <i>et al.</i> 2003
XRhoA-N19	pCS 2	dom. negativ	Mikroinjektion	K. Giehl, Ulm	Stahle <i>et al.</i> 2003
XRhoA-V14	pCS 2	konst. aktiv	Mikroinjektion	K. Giehl, Ulm	Stahle <i>et al.</i> 2003
XWnt-8	pSP 64T3	aktiv	Mikroinjektion	R.T. Moon, Washington, USA	
XWnt-11-myc	pCS2	aktiv	Mikroinjektion	E. de Robertis, LA, USA	Djiane <i>et al.</i> 2000

1.5 Morpholino-Oligonukleotide

Tab. II-2: verwendete Morpholino-Oligonukleotide

Morpholino	Sequenz	Referenz
Kontroll-MO	5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'	GeneTools; Philmath, USA
Xfz7-MO	5' – CCAACAAGTGATCTCTGGACAGCAG – 3'	Winklbauer <i>et al.</i> 2001
XLef-1-MO 1	5'-CCCCTGCTCCAGAGAGCTGAGGCAT-3'	Albert 2004
XLef-1-MO 2	5'-GAGAGCTGAGGCATGGCTCCAGAAC-3'	Albert 2004
XLef-1 mis-MO	5'-CCCCAGCTCAAGAGAACTGACGCAT-3'	
Xnr-3-MO	5'-ACAGGTTCAAGAAATGCCATCTCTGG-3'	
Xnr-3 mis-MO	5'-ACAGCTTCACAAATGGCATCACTGG-3'	
XPAPC-MO 1	5'-CCTAGAAACAGTGTGGCAATGTGAA-3'	Medina <i>et al.</i> 2004 Unterseher <i>et al.</i> 2004
XPAPC-MO 2	5'-CTTGCCCTAGAAAGAGTGCTGCTGTG-3'	Medina <i>et al.</i> 2004 Unterseher <i>et al.</i> 2004
XWnt-11-MO	5'-CCAGTGACGGGTCCGAGCCATTGGT-3'	Pandur <i>et al.</i> 2002

1.6 Geräte

Blotkammer	Trans-Blot SD	Bio-Rad, München
Brutschrank		Binder, Tuttlingen
Fluoreszenzmikroskop	DMIRE2	Leica, Bensheim
Fluoreszenzstereomikroskop	MZFLIII	Leica, Bensheim
Digitalkamera Retiga Color 12 bit		Qimaging, Burnaby, Canada
Kaltlichtquelle KL 1500 LCD		Leica, Bensheim
Geigerzähler	LB 122	Berthold-Technologies
Geldokumentationsanlage	Diana II	Raytest, Straubenhardt
	GelMax	Intas, Göttingen
Gelelektrophoresekammern		Bio-Rad, München
Gelkammer f. Westernblot	Mini-PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad, München

Hybridisierungsinkubator	7601	GFL
Kühlbrutschrank	BK-600	Kendro, Langensfeld
Magnetrührer	IKAMAG RCTbasic	IKA, Staufen
Mikroinjektionsanlage		
Kaltlichtquelle	Fiber Optic Light S. EK-1	Euromex
Stereomikroskop	MIC 1630 ZS	Euromex
Injektionsanlage	PV820 Pneum PicoPump	H. Saur, Reutlingen
Mikropipettenzieher	Model P-97	Sautter Instruments, Novato USA
PCR Cycler	iCycler	Bio-Rad, München
pH-Meter	pH 521	WTW, Weilheim
Phosphoimager	BAS 1500	Fujitsu Siemens
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Schüttelinkubator	Orbital Shaker	Thermo Forma, Marietta USA
Sicherheitswerkbank	Microflow Modell ABS	Nunc, Wiesbaden
Spannungsquelle	PowerPac 300	Bio-Rad, München
Thermomixer	5436	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, NY USA
Zentrifugen	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
	Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau
	5415 D	Eppendorf, Hamburg
Waagen		Sartorius

2 Methoden

2.1 Mikrobiologische Methoden

2.1.1 Anlegen von Flüssig- und Plattenkulturen

Das Animpfen der verwendeten *Escherichia coli*-Stämme erfolgt entweder aus einer vorhandenen Flüssigkultur, einer Plattenkultur oder einer Bakteriendauerkultur. Die Anzucht einer Flüssigkultur erfolgt in LB-Medium, dem das für das selektive Wachstum der gewünschten Bakterien erforderliche Antibiotikum in einer Konzentration von 100 µg/ml zugegeben wird. Die Kultur wird im Schüttelinkubator bei 37°C und 225 rpm über Nacht angezogen.

Plattenkulturen werden auf LB-Agar angelegt. Hierzu werden 200 µl Bakterienkultur mit einem Spatel ausplattiert und die Agarplatte über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.1.2 Anlegen von Bakteriendauerkulturen

Das Aufbewahren von Bakterienkulturen über einen längeren Zeitraum erfolgt in Form von Glycerinkulturen. Hierzu werden die Bakterien mit 10x *Hogness freezing medium* gemischt (9 Teile Bakterien, 1 Teil Medium). Nach Möglichkeit wird die Glycerinkultur in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um die Überlebensrate zu erhöhen, und anschließend bei – 80°C aufbewahrt.

2.1.3 Blau-Weiß-Selektionierung

Einige Vektoren besitzen das Gen *lacZ*, das für das Enzym β-Galaktosidase codiert. Innerhalb dieses Gens befindet sich die Klonierungsstelle zum Einfügen von DNA-Fragmenten. Nach Aufnahme eines Fragments kann somit das Enzym nicht mehr gebildet werden.

Um eine Blau-Weiß-Selektionierung durchzuführen, werden 40 µl XGal- sowie 200 µl IPTG-Lösung ausplattiert und die Platten vor dem Ausplattieren des Transformationsansatzes für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Der Vektor enthält einen Promotor, der durch IPTG induziert werden kann. Ist die β-Galaktosidase funktionsfähig, so wird das Galaktosederivat X-Gal zu einem blauen Farbstoff gespalten. Bakterienkolonien, die kein Insert enthalten, sind somit blau gefärbt. Kolonien, bei denen das Insert in den Vektor eingefügt wurde, erscheinen weiß.

2.1.4 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

250 ml LB-Medium, dem 20 mM MgSO₄ zugesetzt wurde, wird mit 2,5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* JM109 (Genotyp: *endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17* (r_k⁻ m_k⁺) *relA1 supE44 Δ(lac-proAB)* [F' *traD36 proAB lacI^qZAM15*]) angeimpft. Die Bakterienkultur wird bei 37°C und 225 rpm so lange geschüttelt, bis sie eine OD₆₆₀ von 0,5 bis 0,6 aufweist. Die Zellen werden bei 4500 x g und 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert und das Pellet in 100 ml gekühltem TFB 1 resuspendiert. Die Zellen werden für 5 Minuten auf Eis gestellt und anschließend erneut bei 4500 x g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Danach werden die

Zellen in 10 ml TFB 2 resuspendiert und nach 30-minütiger Inkubation auf Eis zu Portionen von 100 µl aliquotiert. Die Portionen werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

2.1.5 Transformation von Plasmiden in chemisch kompetente *E.coli* JM 109

Zu 50 µl chemisch kompetenter *E. coli* JM109 werden 1 bis 5 µl DNA-Lösung pipettiert – gereinigtes Plasmid bzw. ein Ligationsansatz. Der Ansatz wird 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 45 Sekunden in ein 42°C warmes Wasserbad überführt. Dieser ‚Hitzeschock‘ erleichtert den Bakterien die Aufnahme des Plasmids. Die Bakterien werden erneut für 3 Minuten auf Eis gestellt, 450 µl SOC-Medium zugegeben und die Bakteriensuspension anschließend für eine Stunde bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Je nach Anzahl der erwarteten Kolonien wird die Bakterienkultur verdünnt, ehe 200 µl auf selektivem LB-Agar ausplattiert werden.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Isolierung von Plasmiden von Filtern:

Um Plasmide zu verschicken, wird in der Regel 500 ng Plasmid (in 1 µl 10 mM Tris, pH 7.6 gelöst) auf ein Whatman 3MM Filterpapier getropft.

Die DNA wird durch fünfminütige Inkubation in 50 µl 10 mM Tris, pH 7.6 aus dem Filterpapier gelöst. 1 µl der Lösung wird anschließend zur Transformation verwendet.

Präparation von Plasmid-DNA:

Plasmidisolierung erfolgt aus Flüssigkulturen. Je nach Bedarf an gereinigter Plasmid-DNA wird die Präparation im Minimaßstab aus 2 ml Bakterienkultur bzw. im Midimaßstab, wofür 40 ml Bakterienkultur angesetzt werden, durchgeführt.

Die Plasmidisolierung im Minimaßstab wird mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ durchgeführt, für die Präparation von Plasmid-DNA im Midimaßstab wird das „QIAGEN Plasmid Midi Kit“ verwendet. Beide Kits werden von der Firma Qiagen bezogen. Die Versuchsdurchführung erfolgt nach der beiliegenden Vorschrift des Herstellers.

Die Methode beruht bei beiden Verfahren darauf, dass die Plasmid-DNA zunächst an eine Affinitätsmatrix gebunden wird, von der sie mittels eines Puffers niedrigen Salzgehalts wieder isoliert werden kann. Durch dieses Verfahren wird DNA von hoher Reinheit gewonnen.

Die alkalische Lyse nach Birnboim (Birnboim & Dooley 1979) findet Anwendung, wenn geringfügige Verunreinigungen die Experimente nicht beeinträchtigen. Hierzu werden 1 ml Bakterienkultur für 10 Minuten bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Zur weiteren Durchführung werden die Puffer P1, P2 und P3 aus dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ verwendet, deren Zusammensetzung der dem Kit beiliegenden Produktbeschreibung des Herstellers zu entnehmen ist. Das Pellet wird in 200 µl Puffer P1 resuspendiert und durch Zugabe von Puffer P2 und anschließende Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Nach Zugabe von 200 µl Puffer P3 und Abtrennung der Plasmid-DNA von den

übrigen Zellbestandteilen durch 20-minütige Zentrifugation bei 13000 *rpm* wird die DNA durch Zugabe von 420 μ l Isopropanol und anschließender Zentrifugation für 20 Minuten bei 13000 *rpm* gefällt. Das Pellet wird nach Reinigung der DNA mit 70 % (v/v) Ethanol in 20 μ l sterilem H₂O bidest. resuspendiert.

Präparation von Gesamt-RNA:

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Embryonen oder Explantaten erfolgt mittels des „SV Total RNA Isolation System“ der Firma Promega. Bei der Durchführung wird nach dem beiliegenden Protokoll des Herstellers vorgegangen. Diese Methode bedient sich ebenfalls Säulen mit einer Affinitätsmatrix, über die RNA selektiv isoliert und aufgereinigt wird.

Präparation von mRNA aus Gesamt-RNA:

Für empfindliche Anwendungen wie Echtzeit-RT-PCR ist die Anwesenheit von ribosomaler und Transfer-RNA störend. Um reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten, wird mRNA eingesetzt, die mit Hilfe magnetischer Kügelchen, Oligo-(dT)₂₅-Dynabeads, aus der Gesamt-RNA isoliert wird. Diese Methode beruht darauf, dass der Poly-A-Schwanz der mRNA an das Oligo-dT-Nukleotid bindet, das an eine magnetische Matrix gekoppelt ist. Wird die Probelösung in das Feld eines Magneten gebracht, lagern sich die magnetischen Kügelchen mitsamt der gebundenen mRNA an der Wand des Probengefäßes an; die ungebundenen Bestandteile können entfernt werden.

Die Versuchsdurchführung erfolgt nach dem beiliegenden Protokoll des Herstellers der Dynabeads. Es werden 75 μ g Gesamt-RNA eingesetzt. Die Elution der mRNA erfolgt in einem Volumen von 10 μ l.

Die magnetischen Kügelchen werden nach der Verwendung gemäß dem Protokoll des Herstellers regeneriert und können maximal viermal wieder verwendet werden.

2.2.2 Fällung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

Fällung von DNA und RNA:

Durch Zugabe von Alkohol zur DNA- bzw. RNA-Lösung wird die Hydrathülle der Nukleinsäuren zerstört, was dazu führt, dass sie präzipitieren. Die Fällung erfolgt entweder durch Zugabe von 1/20 des Volumens der Lösung 0,5 M EDTA, 1/10 des Volumens 3 M Natriumacetat, pH 5.2 sowie 2 Volumina Ethanol absolut oder durch Zugabe des 0,7-fachen Volumens der Lösung an Isopropanol. Der Ansatz wird bei Ethanolfällung für mindestens 15 Minuten bei – 20°C gelagert und anschließend bei 4°C mit maximaler Geschwindigkeit für 15 Minuten zentrifugiert. Bei Isopropanolfällung wird direkt nach der Zugabe für 30 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. In beiden Fällen wird das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in einem geeigneten Volumen H₂O bidest. aufgenommen.

Phenol-Chloroform-Extraktion:

Eine Phenol-Chloroform-Extraktion wird häufig vor einer Fällung durchgeführt, um die Nukleinsäuren von weiteren Bestandteilen der Lösung wie Proteinen zu reinigen. Hierzu macht man sich den Sachverhalt zunutze, dass sich nach Phenol-Zugabe eine polare wässrige sowie eine apolare phenolhaltige Phase bilden. Die polaren Nukleinsäuren sammeln sich in

der wässrigen Phase. Zur Aufreinigung versetzt man die Lösung mit demselben Volumen an Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol. Für die Extraktion von RNA wird eine Lösung verwendet, deren pH-Wert auf 5.3 eingestellt ist, die Extraktion von DNA wird mit Tris-gesättigtem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (pH 8.0) durchgeführt. Die Probe wird geschüttelt und zentrifugiert (15 min bei 4°C und 13000 rpm). Die wässrige Phase, in der sich die Nukleinsäuren befinden, wird abgenommen und mit demselben Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gereinigt.

Aufreinigung über Säulen:

Eine Aufreinigung der Nukleinsäuren ist auch über Säulen mit einer Affinitätsmatrix möglich. In der Regel ist die Nukleinsäure-Konzentration bei diesem Verfahren niedriger, die Reinheit ist jedoch meist höher. So findet die Aufreinigung über Säulen Verwendung, wenn Nukleinsäuren von hoher Reinheit, wie zum Beispiel bei der Herstellung von Sonden für *in situ* Hybridisierung, benötigt werden. Es werden „Probe Quant G50 Micro Columns“ der Firma Amersham (New York, USA) verwendet, die Aufreinigung erfolgt gemäß der beiliegenden Vorschrift des Herstellers.

cDNA für RT-PCR wird vor der PCR-Reaktion mittels des „High Pure PCR Product Purification Kit“ von Roche aufgereinigt. Abweichend vom Protokoll erfolgt die Elution in 1:10-verdünntem Elutionspuffer, um zu verhindern, dass das im Puffer vorhandene EDTA in einer Konzentration vorliegt, die hoch genug ist, um die Funktion der DNA-Polymerase zu beeinträchtigen.

2.2.3 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration erfolgt photometrisch. Es wird die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge λ von 260 nm gemessen, wo das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt und daraus die Konzentration errechnet. Der Konzentrationsbestimmung liegt das Lambert-Beersche Gesetz zugrunde.

Die Reinheit der Probe wird ermittelt, indem der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und der Absorption bei 280 nm, wo das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt, bestimmt wird. Dieser Wert sollte sich zwischen 1,8 und 2,0 bewegen.

2.2.4 Restriktionsanalyse

Restriktionsendonukleasen spalten den DNA-Doppelstrang. Dabei erkennen sie spezifische Zielsequenzen von vier bis acht Basenpaaren, die meist ein Palindrom bilden. Je nach Restriktionsenzym entstehen entweder glatte Enden oder Überhänge.

Es werden Restriktionsendonukleasen in einer Aktivität von 3 U pro μg zu schneidender DNA eingesetzt. Das Volumen des Ansatzes beträgt 20 μl . Der Verdau der DNA erfolgt für 90 Minuten bzw. über Nacht im passenden Puffer bei der für das Enzym optimalen Reaktionstemperatur.

2.2.5 Analytische Agarosegelelektrophorese

Unter dem Einfluss eines elektrischen Gleichstromfeldes wandern Nukleinsäurefragmente in einem Agarosegel aufgrund ihrer negativen Ladung vom Minus- zum Pluspol. Dabei erfolgt eine Auftrennung gemäß der Größe der DNA-Fragmente, da kurze Fragmente schneller laufen als lange.

Zur Agarosegelelektrophorese werden je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente 1- bis 2-prozentige (w/v) Agarosegele verwendet. Das Gel wird mit 0,05 µl Ethidiumbromid pro ml Gel versetzt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgt bei 80 bis 120 Volt. Im Verlauf der Gelelektrophorese lagert sich Ethidiumbromid in die DNA-Doppelhelix ein. Durch die Interkalation des Ethidiumbromids fluoreszieren die DNA-Fragmente bei Anregung durch UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) und können somit in einer Geldokumentationsanlage sichtbar gemacht werden.

2.2.6 *in vitro* Transkription

in vitro Transkription dient dazu, aus einem Plasmid mRNA-Kopien eines Gens zu amplifizieren. Geeignete Vektoren besitzen eine Promotorsequenz, die als Bindestelle für die SP6-, T3- oder T7-RNA-Polymerase dient. Es ist erforderlich, das Plasmid zunächst mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease zu spalten, damit bei der anschließenden Transkriptionsreaktion nur das gewünschte Gen und nicht die Vektorsequenz amplifiziert wird.

Die Herstellung von *sense* mRNA zur Mikroinjektion wird mit dem „mMessage mMachine High Yield Capped RNA Transcription Kit“ der Firma Ambion (Huntington, Großbritannien) durchgeführt, bei der Versuchsdurchführung wird gemäß des Protokolls des Herstellers verfahren. Die Amplifikation von *antisense* mRNA, die als Sonde bei der *in situ* Hybridisierung Einsatz findet, erfolgt mit dem „Digoxigenin/Fluorescein RNA-Labeling Kit“ von Roche, wobei ebenfalls nach der beiliegenden Versuchsvorschrift des Herstellers vorgegangen wird.

Zur Aufreinigung des Ansatzes wird eine Phenol-Chloroform-Extraktion sowie eine anschließende Aufreinigung über Säulen durchgeführt. Die mRNA wird in sterilem RNase-freiem H₂O bidest. aufgenommen und bei – 80°C gelagert.

2.2.7 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird mittels des Enzyms Reverse Transkriptase mRNA in cDNA umgeschrieben, die anschließend zur Analyse per PCR herangezogen werden kann. Wird die cDNA für eine normale RT-PCR benötigt, wird Gesamt-RNA zur Reversen Transkription herangezogen. Für die wesentlich empfindlichere Echtzeit-RT-PCR wird zunächst mRNA gemäß 2.2.1.4 isoliert und als Matrize für die Amplifikation verwendet.

Die cDNA-Synthese wird mit dem „ImProm II Reverse Transcription System“ von Promega durchgeführt.

2.2.8 PCR

PCR ist ein sehr empfindliches Verfahren zur selektiven Amplifikation von DNA-Fragmenten. Dabei wird das gewünschte Fragment mit Hilfe von thermostabilen Polymerasen und zwei Primern, die die zu amplifizierende Region flankieren, vervielfältigt. Dies geschieht in Zyklen, die aus Aufspaltung der DNA in Einzelstränge, Anlagerung der Primer an die komplementäre Sequenz der DNA sowie anschließender Synthese des zweiten DNA-Stranges bestehen. Idealerweise verdoppelt sich nach jedem Zyklus die Anzahl der amplifizierten DNA-Moleküle. Eine PCR-Reaktion umfasst normalerweise zwischen 25 und 40 Zyklen.

2.2.8.1 verwendete Primer

Tab. II-3: verwendete PCR-Primer

Gen	Sequenz	Verwendung
Aktin	fwd 5' – aca gtc tgt gtg cgt cca ac – 3' rev 5' – tca tgt tga aag ggt ctg tcc – 3'	Kontrollgen Echtzeit RT-PCR
Ap-2rep	fwd 5' – gaa tga tca gtt tcc tct gac atg c – 3' rev 5' – tca cgt gtg tca aca ttt ccg ta – 3'	RT-PCR substr. Screen
Geminin	fwd 5' – tgg caa gtt ctg tag ttt aag gtc a – 3' rev 5' – cac gaa gtc ttg aag act taa agg a – 3'	RT-PCR substr. Screen
hnRNP 2H9	fwd 5' - gga caa gct ctg gta aca gca t – 3' rev 5' – cgg aaa ccc tga tgg att ag – 3'	RT-PCR substr. Screen
Id 2	fwd 5' – cag aat tca cag acg aga gca aa – 3' rev 5' – agg gga taa ttg tag cgc aat c – 3'	RT-PCR substr. Screen
Ilf 3	fwd 5' – tgt ctt ctc cgt cct cct caa t – 3' rev 5' – tgg aac agc aaa cag acc ca – 3'	RT-PCR substr. Screen
Klon 4	fwd 5' – atc tgc aga aaa cac ctt ctc g – 3' rev 5' – ctc ccc gaa caa tgc ttg ag – 3'	RT-PCR substr. Screen
Klon 10	fwd 5' - tgc aga agg gtg tga tgg ag -3' rev 5' – cgg ata gga ttg tat tca gag aag g – 3'	RT-PCR substr. Screen
Klon 12	fwd 5' – aga cac aag cac aga cat gct tc – 3' rev 5' – tgc gcg gat aaa tet ctt cc – 3'	RT-PCR substr. Screen
M 13	fwd 5' – ggt ttt ccc agt cac gac g – 3' rev 5' – cac agg aaa cag cta tga cca tg – 3'	Sondenherstellung radioaktive Hybridisierung
ODC	fwd 5' – gcc att gtg aag act ctc tcc att c – 3' rev 5' – ttc ggg tga ttc ctt gcc ac – 3'	Kontrollgen RT-PCR
RGC 32	fwd 5' - gta tta aca tgt gta tca gcc gct – 3' rev 5' – tgg cga ctc tet tta tag aaa cag – 3'	RT-PCR substr. Screen
Siamois	fwd 5' – gac ttt gtg aac aga tgc cg – 3' rev 5' – gga gag tgg aaa gtg gtt gc – 3'	Echtzeit RT-PCR Regulation der Wnt-Zielgene
Splfact (Klon 7)	fwd 5' – gat gct cag gat tta cca ggt t – 3' rev 5' – tgc ttg gct gtt tcc tgt tat c – 3'	RT-PCR substr. Screen
Twin	fwd 5' – cag gat tca ggt tgg ttc c – 3' rev 5' – aag cat ctg ggt tct tet gc – 3'	Echtzeit RT-PCR Regulation der Wnt-Zielgene
Xbra	fwd 5' – ttc agc ctg tct gtc aat gc – 3' rev 5' – tga gac act ggt gtg atg gc – 3'	Sondenherstellung radioaktive Hybridisierung
XERH	fwd 5' – ttc cat ttc ctg ctg gct tc – 3' rev 5' – aca gct aag atc tgc cag gtc a – 3'	RT-PCR substr. Screen
Xmyb 1	fwd 5' – cca cag cca tag tgg att ctg c – 3' rev 5' – ttc agc aca gag gga ggt gtt c – 3'	RT-PCR substr. Screen
Xnr-3	fwd 5' – aag aga tcac ccg agt gc – 3' rev 5' – ctg tgg aac tgc aca agt gg – 3'	Echtzeit RT-PCR Regulation der Wnt-Zielgene
XWnt-11	fwd 5' – gaa gtc aag caa gtc tgc tgg – 3' rev 5' – gca gta gtc agg gga act aac cag – 3'	Echtzeit RT-PCR Regulation von Wnt-11

Die Primer wurden von den Firmen MWG (Aktin), Qiagen (ODC, siamois, twin, Xbra, Xnr-3) sowie Biomers synthetisiert.

2.2.8.2 herkömmliche PCR

Zur Amplifizierung eines spezifischen DNA-Fragments werden folgende Komponenten benötigt: 25 ng DNA-Matrize, 2,5 µl 10-fach konzentrierter PCR-Reaktionspuffer, 1,5 µl 25 mM MgCl₂, 0,5 µl 40 mM dNTPs, je 0,5 µl von 10 µM Lösung der beiden Primer sowie 1 U Taq-Polymerase. Die PCR-Reaktion erfolgt in einem Volumen von 25 µl. Wird wie im Fall der Herstellung einer DNA-Sonde für die radioaktive Hybridisierung mit einem Reaktionsvolumen von 50 µl gearbeitet, wird die Menge aller im Ansatz enthaltenen Substanzen verdoppelt.

Je nach Schmelztemperatur der verwendeten Primer sowie der Größe des zu amplifizierenden Fragments wird die Temperatur zur Primeranlagerung sowie die Dauer der Synthese des zweiten DNA-Strangs angepasst. Ein häufig verwendetes PCR-Programm besteht aus folgenden Schritten:

	2 Minuten – 95°C	
Aufspaltung:	30 Sekunden – 95°C	}
Anlagerung:	30 Sekunden – 55°C	
DNA-Synthese:	60 Sekunden – 72°C	
	5 Minuten – 72°C	30x

Wurde ein anderes PCR-Programm verwendet, ist dies bei der Beschreibung des Versuchs im Ergebnisteil vermerkt.

2.2.8.3 RT-PCR

Mittels RT-PCR wird cDNA selektiv amplifiziert. So weist man über den Umweg der Reversen Transkription in einer Probe vorhandene mRNA nach. Die PCR-Reaktion läuft analog zur herkömmlichen PCR ab; anstelle der DNA-Matrize wird jedoch pro Ansatz 0,5 µl der gereinigten cDNA-Lösung eingesetzt. In der Regel wird die cDNA-Lösung verdünnt (in sterilem H₂O bidest.) eingesetzt.

2.2.8.4 Echtzeit-RT-PCR

Mittels Echtzeit-RT-PCR besteht die Möglichkeit, die eingesetzte mRNA-Ausgangsmenge absolut oder relativ zu quantifizieren. Der Verlauf der PCR-Reaktion kann am Monitor verfolgt werden. Das Verfahren beruht darauf, dass die Menge an amplifizierter DNA mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Sybr Green bestimmt wird. Dieser Fluorophor lagert sich unspezifisch in doppelsträngige DNA ein. Die Bindung an die DNA führt dazu, dass Sybr Green ein Fluoreszenzsignal der Wellenlänge 530 nm emittiert, welches von einem Detektor aufgenommen wird. Auf diese Weise wird ausschließlich amplifizierte DNA detektiert; nicht

amplifizierte cDNA führt zu keiner Fluoreszenz. Das Signal steigt proportional zur Menge an doppelsträngiger DNA.

Gegenüber Reporterassays, bei denen Genexpression über Coexpression von Fluoreszenzmarkern wie GFP detektiert wird, besitzt RT-PCR den Vorteil, dass im endogenen System gearbeitet werden kann.

Die PCR-Reaktion erfolgt in einem 25 µl-Ansatz, der 12,5 µl iQ Sybr Green Supermix, in welchem Polymerase, Mg²⁺-Ionen, Reaktionspuffer, dNTPs sowie Sybr Green in doppelter Konzentration vorliegen, 1 µl mit sterilem H₂O bidest. verdünnter mRNA-Lösung sowie 1 µl Primer-Mix (20 µM) enthält. Es wird standardmäßig folgendes Programm verwendet:

10 Minuten – 95°C	}	40x
30 Sekunden – 95°C		
30 Sekunden – 58°C		
30 Sekunden – 72°C		
7 Minuten – 72°C		

Zur Erstellung einer Schmelzkurve, die wichtig ist, um festzustellen, ob das gewünschte Fragment amplifiziert wurde, wird nach Ablauf des PCR-Programms die Temperatur ausgehend von 50°C alle 10 Sekunden um 0,5°C bis zum Erreichen von 100°C erhöht und die Veränderung der Fluoreszenz gemessen. Im Bereich des Schmelzpunkts ist ein starker Abfall der Fluoreszenz erkennbar. Der Schmelzpunkt eines bestimmten DNA-Fragments hängt unter anderem ab von seinem GC-Gehalt sowie von seiner Länge. Somit lassen sich beispielsweise Aussagen darüber treffen, ob das spezifische Fragment oder unerwünschte Produkte wie Primerdimere amplifiziert wurden.

2.2.9 substraktiver Screen

Ein so genannter substraktiver Screen dient dazu, Gene aufzuspüren, die unter bestimmten Bedingungen selektiv exprimiert bzw. ausgeschaltet werden, indem diese spezielle cDNA-Population zunächst mit einer Kontrollpopulation hybridisiert wird und diejenigen Gene, die lediglich in einer der beiden Vergleichsproben vorhanden sind, selektiv amplifiziert werden. Dieser Versuch wird mit dem „Clontech PCR-Select cDNA Substraction Kit“ der Firma BD Biosciences nach dem beiliegenden Protokoll des Herstellers durchgeführt. Eine ausführliche Beschreibung der Methode erfolgt im Ergebnisteil.

2.2.10 Anlegen einer cDNA-Bibliothek

Zum Anlegen einer cDNA-Bibliothek wird das „pGEM-T Easy Vector System“ der Firma Promega verwendet.

Zunächst wird ein so genanntes ‚A-tailing‘ durchgeführt. Dabei wird an den einzuklonierenden Fragmenten an beiden Enden ein A(denin)-Überhang erzeugt. Da der zur Klonierung der Fragmente verwendete pGEM-T-Vektor an der Insertionsstelle auf beiden Seiten kurze T-Überhänge besitzt, wird somit gewährleistet, dass nur ein Fragment in den

Vektor aufgenommen wird. Dies wird gemäß der Versuchsbeschreibung im dem Kit beiliegenden Protokoll durchgeführt. Anschließend werden die Fragmente wie in der Versuchsvorschrift beschrieben in den Vektor ligiert und in im Kit enthaltene kompetente *E. coli* JM 109 transformiert.

Die Bakteriensuspension wird auf LB_{Amp}-Agarplatten ausplattiert. Mittels Blau-Weiß-Selektionierung wird zwischen Bakterien, die den Vektor inklusive einligiertem Fragment aufgenommen haben und solchen, in die lediglich der Vektor ohne Insert transformiert wurde, unterschieden. Nach 16-stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C werden die weißen Bakterienkolonien mit einem Zahnstocher gepickt. Die Kolonien werden in Mikroplatten mit 96 Vertiefungen überführt und in jeweils 200 µl LB_{Amp} über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Somit kann zur späteren Verwendung jeder Klon exakt zugeordnet werden. Die cDNA-Bibliothek wird in 1x *Hogness freezing medium* bei - 80°C zur dauerhaften Verwendung gelagert.

2.2.11 radioaktive Hybridisierung

Bei der radioaktiven Hybridisierung lagert sich eine radioaktiv markierte Sonde an komplementäre Abschnitte der sich auf einer Nylonmembran befindlichen Proben-DNA. Mittels eines *Phosphoimagers* wird detektiert und dokumentiert, an welchen Stellen die Sonde gebunden hat.

Übertragen von DNA auf eine Nylonmembran – modifizierter Filterabklatsch:

Der Filterabklatsch dient dazu, Plasmid-DNA aus Bakterienkolonien auf eine Nylonmembran zu übertragen. Die fixierte DNA von vielen verschiedenen Bakterienklonen kann anschließend parallel über eine Hybridisierungsreaktion analysiert werden.

Die Durchführung des Filterabklatsches erfolgt wie im von der Firma Roche herausgegebenen „DIG Application Manual“ (S. 131 ff.) beschrieben. Es werden positiv geladene Nylonmembranen der Firma Roche Diagnostics verwendet, auf eine Membran werden 5 µl Bakteriensuspension von jeder Kolonie aufgetragen.

Anstelle von Bakteriensuspension ist auch das Auftragen von isolierter Plasmid-DNA möglich. Hierbei wird die DNA nach dem Auftragen auf die Nylonmembran lediglich mittels eines UV-Crosslinkers auf der Membran fixiert.

Herstellung von radioaktiv markierten Sonden:

Die radioaktive Markierung von DNA-Sonden erfolgt durch α -³²P- markiertes dCTP, die Sonde wird mittels PCR-Amplifikation hergestellt. Hierbei wird ein 50 µl-Ansatz eingesetzt, dem 16,7 pmol α -³²P- markiertes dCTP zugegeben werden, das eine Radioaktivität von 3 µCurie pro pmol aufweist. Die Zugabe der radioaktiven Substanz erfolgt gemäß der den Nukleotiden beiliegenden Beschreibung. Zur Überprüfung der Amplifikation des gewünschten Fragments wird ein paralleler Ansatz ohne Zusatz von radioaktivem dCTP mitgeführt, der anschließend mittels Agarosegelelektrophorese analysiert wird. Die Sonde wird durch Ethanol-fällung aufgereinigt und in 30 µl H₂O bidest. gelöst. Der Einbau der radioaktiven Nukleotide in die DNA wird durch die Messung der Radioaktivität im Geigerzähler verifiziert.

Die Herstellung einer radioaktiv markierten mRNA-Sonde folgt prinzipiell der unter 2.2.6 beschriebenen *in vitro* Transkription mit dem „Digoxigenin/Fluorescein RNA-Labeling Kit“ von Roche. Abweichend von der Versuchsvorschrift von Roche werden nicht-markierte Nukleotide eingesetzt. Außerdem werden pro Ansatz 5 μl α - ^{32}P - markierte UTP-Lösung mit einer Stoffmenge von 16 pmol sowie einer Radioaktivität von 3 $\mu\text{Curie}/\text{pmol}$ zugegeben. Die Synthese der mRNA-Sonde wird ebenfalls anhand einer nicht-radioaktiven Parallelreaktion, der Einbau der radioaktiven Nukleotide mit dem Geigerzähler kontrolliert.

radioaktive Hybridisierung und Detektion:

Zur Durchführung von radioaktiven Hybridisierungen wird mit geringen Abweichungen wie in von Stein *et al.* (1997) beschrieben vorgegangen. Die Nylonmembran mit der fixierten DNA wird zunächst prähybridisiert. Hierzu wird die Membran für 15 Minuten bei 65°C in Prähybridisierungslösung inkubiert. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 65°C in Prähybridisierungslösung, der pro ml Hybridisierungslösung 1 – 10 ng an radioaktiver Sonde zugegeben werden. Für die zugegebene Menge an Sonde ist vor allem das Alter und damit verbunden die Restradioaktivität maßgeblich. Zur Abschätzung des erforderlichen Volumens an Hybridisierungslösung dient der Richtwert von 0,2 ml Lösung pro Quadratzentimeter Membran (Sambrook *et al.* 1989). Die Membran wird anschließend zweimal für 30 Minuten in 1 x Natriumphosphatpuffer mit 0,1 % (w/v) SDS sowie zweimal für 30 Minuten in 0,1 x Natriumphosphatpuffer mit 0,1 % (w/v) SDS gewaschen.

Zur Detektion wird die Membran in Frischhaltefolie eingeschweißt und eine Fotoplatte für 5 bis 15 Minuten aufgelegt. Anschließend wird die Fotoplatte im *Phosphoimager* gescannt und die Hybridisierungssignale mittels des Programms ‚BASReader 3.01‘ analysiert.

Entfernen von gebundener Sonden-DNA von der Membran:

Eine Nylonmembran kann mehrmals verwendet werden. Vor einer Wiederverwendung ist es jedoch erforderlich, dass sämtliche gebundene Sonden-DNA bzw. -RNA von der Membran entfernt wird. Hierzu wird die Membran zunächst für 30 Minuten bei 45°C in 0,4 M NaOH-Lösung inkubiert und anschließend in *mild stripping solution* (Sambrook *et al.* 1989) überführt, wo sie für 10 Minuten bei Raumtemperatur verbleibt. Die Membran wird an der Luft getrocknet und bis zur erneuten Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.3 Entwicklungsbiologische und immunologische Methoden

2.3.1 Haltung von *Xenopus laevis*

Adulte *Xenopus laevis* werden nach Geschlecht getrennt bei einer Wassertemperatur von 18 – 21°C gehalten. Das Wasser, das durch die Anlage zirkuliert, wird über einen Bakterienfilter gereinigt und mittels UV-Licht entkeimt. Die Beleuchtungsdauer beträgt 14 Stunden pro Tag. Die Tiere erhalten einmal pro Woche klein geschnittenes Rinderherz sowie ein- bis zweimal pro Woche Trockenfutter.

Nach der Eiablage wird das Weibchen zur Regeneration für eine Nacht in Salzwasser mit 3 % (w/v) NaCl gesetzt, ehe es wieder in die Anlage überführt wird.

2.3.2 Eiablage und *in vitro* Fertilisation

Um die Fähigkeit zur Eiablage zu induzieren, injiziert man einem adulten Weibchen entweder 10 bis 12 Stunden vor der Eiablage 200 µl einer HCG-Lösung, die 3 U des Hormons pro µl Lösung enthält. Alternativ ist eine Präinjektion von 100 µl 0,5 U/µl enthaltender HCG-Lösung 16 bis 24 Stunden sowie eine zusätzliche Injektion von 167 µl 3U/µl HCG-Lösung 6 bis 8 Stunden bevor die Eier benötigt werden, möglich.

Sind die Frösche zur Eiablage bereit, werden sie mit den Fingern im unteren Rückenbereich sanft massiert und die aus der Kloake austretenden Eier in einer Petrischale aufgefangen.

Um eine zeitgleiche Befruchtung aller Eier eines Geleges sicherzustellen, werden die Eier *in vitro* befruchtet. Zur Präparation des Hodens wird das Männchen zunächst für mindestens 30 Minuten in 0,05 % (v/v) Aminobenzolsäure-Ethylestermethansulfonatlösung betäubt und getötet, indem die Halswirbelsäule durchtrennt wird. Die sich im Innern des Tieres befindlichen Hoden werden nach Öffnen der Bauchdecke herauspräpariert und in 1x MBSH bei 4°C gelagert.

Zur Befruchtung der Eier wird der Hoden möglichst fein in 1x MBSH mazeriert. 100 µl dieser Suspension werden zusammen mit 900 µl H₂O über dem frischen Laich verteilt. Die befruchteten Eier drehen sich, ausgelöst durch Abheben der Vitellinhülle von der Eioberfläche bei der Befruchtung, so dass der animale, dunkel pigmentierte Pol nach oben zeigt.

2.3.3 Entfernung der Gallerthülle und Anfärbung

Zur Vereinzelung der Zygoten werden diese frühestens eine Stunde nach der Befruchtung von der Gallerthülle befreit, die der Vitellinmembran aufliegt. Dazu werden die Eier für maximal fünf Minuten in Cysteinhydrochlorid-Lösung geschwenkt und anschließend mehrmals in 0,1x MBSH gewaschen.

Die unpigmentierten Embryonen der Albinos werden nach der Entfernung der Gallerthülle für fünf bis zehn Minuten in NileBlue-Färbelösung angefärbt, um ihre Entwicklung besser beobachten zu können. Anschließend werden die Embryonen mehrmals mit 0,1x MBSH gewaschen.

2.3.4 Mikroinjektion und Embryonenpflege

Der zur Injektion notwendige Gasdruck wird durch komprimierten technischen Stickstoff geliefert. Zur Injektion benutzt man mit Hilfe des Mikropipettenziehers hergestellte ultrafeine Glaskapillaren. Dabei sollte die Nadelspitze so fein wie möglich sein, um Verletzungen des Embryos durch die Injektion auf ein Minimum zu beschränken.

Je nach Zielbereich, in dem die injizierte Substanz wirksam sein soll, wird in eine oder zwei Blastomeren im Zwei- bzw. Vierzellstadium injiziert. Das injizierte Gesamtvolumen wird auf 8 nl eingestellt. Zur Injektion werden die Embryonen in eine Petrischale übertragen, in der sich Agar befindet, in den die Noppen eines Tischtennisbelags eingedrückt wurden. Da hierdurch Vertiefungen entstehen, die ziemlich genau der Größe eines *Xenopus*-Eies entsprechen, können die Embryonen so während der Injektion fixiert werden. Nach der Injektion werden die Embryonen in 0,1x MBSH überführt. Eine bis zwei Stunden nach der Injektion wird das Medium gewechselt.

Anschließend werden die Embryonen bis zum Erreichen des gewünschten Stadiums bei konstanter Temperatur im Kühlbrutschrank gehalten. Die Temperatur sollte zwischen 13 und 22°C liegen, wobei eine Steigerung der Temperatur eine schnellere Entwicklung zur Folge hat. Um die Überlebensrate zu erhöhen, werden die abgestorbenen Embryonen mehrmals täglich entfernt sowie das Medium mindestens einmal pro Tag ausgetauscht. Die Bestimmung der Stadien erfolgt nach Nieuwkoop und Faber (1967).

2.3.5 Präparation von *Open Face Keller Explants*

Die nach ihrem Erfinder Ray Keller *Open Face Keller Explants* oder *Keller Explants* genannten Explantate (Keller 1991) stellen ein sehr gutes Hilfsmittel dar, um konvergente Extensionsbewegungen während der Gastrulation von *Xenopus*, die im Innern des Embryos ablaufen, von außen sichtbar zu machen.

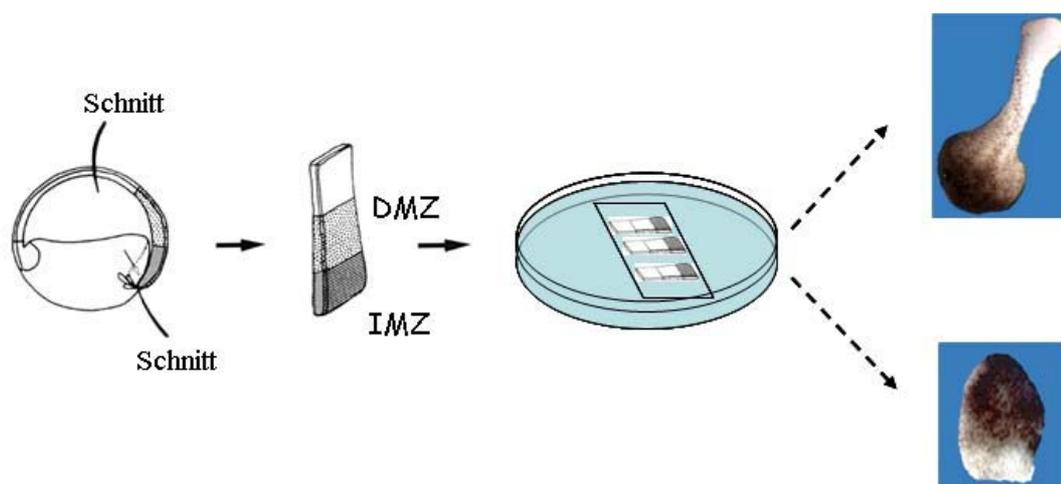


Abb. II-1: Präparation von Keller-Explantaten

Aus Embryonen im Stadium 10,25 wird das Explantat herauspräpariert, welches die dorsale Marginalzone (DMZ) sowie die einwandernde Marginalzone (IMZ) beinhaltet. Die Explantate werden unter einem Deckglas fixiert und in MBSH kultiviert. Konvergente Extensionsbewegung zeigt sich im Explantat anhand eines langen Fortsatzes (oben rechts). Die Bildung des Fortsatzes unterbleibt, wenn konvergente Extension beeinträchtigt ist (unten rechts).

Hierzu lässt man den Embryo bis zum Erreichen von Stadium 10,25 wachsen, welches den Beginn der Gastrulation markiert und dadurch zu erkennen ist, dass sich auf der dorsalen Seite der vegetativen Hemisphäre eine dunkle halbmondförmige Struktur, der Blastoporus, bildet. Mit zwei feinen Uhrmacherpinzetten wird die Vitellinmembran vorsichtig entfernt. Anschließend wird wie in Abb. II-1 dargestellt ein Stück aus dem Embryo präpariert, das sich unmittelbar über der dorsalen Blastoporuslippe beginnend in Richtung des animalen Pols erstreckt. Das Explantat enthält die dorsale Marginalzone sowie die einwandernde Marginalzone. In der dorsalen Marginalzone befindet sich der Spemann-Organisator, das für konvergente Extensionsbewegungen relevante Signalzentrum. Die benachbarte einwandernde Marginalzone umfasst die Zellen, die im Verlauf der Gastrulation in den Embryo einwandern und konvergenter Extension unterworfen sind. Die Explantate werden in Petrischalen überführt, deren Boden zuvor mit BSA-Lösung beschichtet wurde, um ein ungehindertes Wandern des Gewebes zu gewährleisten. Um ein Zusammenrollen der Explantate zu verhindern und eine Bewegung des einwandernden Mesoderms innerhalb einer Ebene sicherzustellen, werden die Explantate unter Deckgläsern fixiert. Die Inkubation erfolgt in 1x MBSH für 8 Stunden bei einer Temperatur von 20 – 22°C.

2.3.6 Präparation von animalen Kappen

Explantate aus dem zukünftigen ektodermalen Gewebe der animalen Kappen werden ebenfalls häufig zur Analyse von konvergenter Extension herangezogen, da diese Bewegung nach Zugabe von mesoderm-induzierenden Substanzen wie Aktivin simuliert werden kann. Zur Präparation entfernt man von sich im Blastulastadium befindlichen Embryonen analog zur Präparation von Keller-Explantaten die Vitellinmembran. Anschließend wird das dunkel pigmentierte Gewebe des animalen Pols mittels zweier feinen Uhrmacherpinzetten vorsichtig abpräpariert. Im Rahmen dieser Arbeit werden die animalen Kappen nicht zur Analyse von konvergenter Ausdehnung benutzt, sondern dienen als Ausgangsmaterial für RT-PCR-Analysen. Daher wird direkt nach der Präparation der Explantate deren Gesamt-RNA präpariert.

2.3.7 Fixierung und Lagerung der Embryonen und Explantaten

Werden die Embryonen oder Explantate für eine spätere Lyse zur Extraktion von RNA bzw. zur Proteinextraktion aufbewahrt, werden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80°C gelagert. Werden sie für eine *in situ* Hybridisierung oder Immunfärbung herangezogen, werden sie fixiert. Hierfür werden sie für eine Stunde in MEMFA gebracht, zur Entwässerung nacheinander in Lösungen mit 25 % (v/v), 50 % (v/v) sowie 75 % (v/v) Methanol in DEPC-H₂O überführt und schließlich in reinem Methanol bei – 20°C gelagert.

2.3.8 Ganzkeimfärbung - *whole mount in situ* Hybridisierung

Neben der RT-PCR stellt Ganzkeimfärbung eine weitere Möglichkeit dar, spezifische mRNA nachzuweisen. Obwohl die Empfindlichkeit wesentlich geringer ist, liegt ihr Vorteil darin, dass eine räumliche Verteilung von exprimierter mRNA dargestellt werden kann.

Sämtliche Schritte werden unter leichtem Schütteln durchgeführt. Die fixierten Embryonen werden zunächst zur Rehydratisierung für je fünf Minuten in 75 % (v/v), 50 % (v/v) sowie 25 % (v/v) Methanol in TBST inkubiert. Anschließend werden die äußeren Schichten mittels Proteinase K-Lösung für sieben bis zehn Minuten permeabilisiert. Die Dauer der Proteinase K-Behandlung ist abhängig vom Alter der Embryonen und von der Temperatur. Jüngere Embryonen sowie wärmere Temperaturen erfordern kürzere Zeiten. Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen an die RNA-Sonden werden die basischen Proteine durch zweimaliges fünfminütiges Waschen mit frisch angesetzter Triethanolamin-Lösung und anschließender Acetylierung durch zweimalige Zugabe von 5 µl Essigsäureanhydrid angesäuert. Die Embryonen werden zweimal mit TBST gewaschen, für eine Stunde in MEMFA nachfixiert und anschließend nochmals fünfmal mit TBST gewaschen. Zur Prähybridisierung werden die Embryonen einmal mit Hybridisierungspuffer gewaschen und anschließend in 500 µl Puffer für vier Stunden bei 60°C inkubiert. Die mit Digoxigenin bzw. Fluorescein markierte RNA-Sonde wird in Hybridisierungspuffer verdünnt (1 µg Sonde pro ml Puffer) und für fünf Minuten bei 85°C denaturiert, ehe sie auf die Embryonen gegeben wird. Die Hybridisierung mit der Sondenlösung erfolgt bei 60°C über Nacht.

Am nächsten Morgen wird die Sondenlösung abgenommen und zur Wiederverwendung bei -20°C aufbewahrt. Nacheinander werden folgende Waschschritte für jeweils 20 Minuten bei 60°C durchgeführt: zweimal in 1 ml Hybridisierungspuffer, zweimal in 2x SSC + 0,05 % (v/v) Tween 20, zweimal in 0,2x SSC + 0,05 % (v/v) Tween 20. Nach zweimaligem Waschen in TBST bei Raumtemperatur werden die Embryonen für 1 Stunde in Blockierungspuffer äquilibriert und anschließend in 500 µl Antikörperlösung überführt, wo sie über Nacht bei 4°C verbleiben.

Die Embryonen werden sechsmal für jeweils 30 Minuten in TBST gewaschen, in AP-Puffer umgepuffert und in kleine Petrischalen überführt. Anschließend werden sie in Färbelösung so lange im Dunkeln inkubiert, bis die gewünschte Intensität erreicht ist.

2.3.9 Immunfärbung

Die in Methanol aufbewahrten Embryonen werden zunächst zweimal für jeweils 10 Minuten mit TBST gewaschen und anschließend für fünf Minuten in einer modifizierten TBST-Lösung, die 1% Tween 20 sowie 20 % DMSO enthält, permeabilisiert. Die Blockierung erfolgt für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 20%iger Pferdeserumlösung in PBST. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgt in Antikörperlösung über Nacht bei 4°C. Der ungebundene Antikörper wird mit TBST fünfmal für 30 Minuten bei Raumtemperatur heraus gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgt analog zum Primärantikörper über Nacht bei 4°C. Abschließend werden die Explantate erneut fünfmal für 30 min mit TBST gewaschen und in Elvanol eingedeckelt.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Proteinextraktion aus Embryonen

10 Embryonen werden in 75 µl NOP-Puffer inklusive Protease-Inhibitor durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit einer 0,40 mm-Kanüle homogenisiert. Zur vollständigen Solubilisierung der Proteine wird die Suspension für 30 Minuten bei 4°C geschüttelt. Um Dotterlipide abzutrennen, werden 75 µl Freon dazu pipettiert, die Lösung durch Vortexen ausgiebig gemischt und für eine Minute bei 4°C mit 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wird die obere, die Proteine enthaltende Phase vorsichtig abgenommen.

2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Ein Polyacrylamidgel besteht aus einem Sammelgel und einem Trenngel. Der Hauptunterschied liegt im geringeren pH-Wert des Sammelgels. Dieser bewirkt, dass die Proteine beim Durchlauf durch das Sammelgel alle auf eine schmale Bande konzentriert werden, während sie sich im basischen Trenngel entlang ihrer Größe auftrennen.

Für ein 10 %iges Trenngel werden 1,7 ml 30 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 1,3 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 50 µl (w/v) SDS und 1,9 ml H₂O bidest. gemischt und die Polymerisation durch Zugabe von 2 µl TEMED sowie 50 µl 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat gestartet. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert ist, wird das Sammelgel aus 500 µl 30 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 30 µl 10 % (w/v) SDS, 380 µl 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 und 2,1 ml H₂O bidest. angesetzt.

Zum Proteinextrakt wird das entsprechende Volumen von fünffach konzentriertem reduzierendem Ladepuffer zugegeben. Die reduzierende Substanz β-Mercaptoethanol bewirkt eine Auffaltung der Proteinketten und eine Auftrennung in Monomere. Das ebenfalls im Ladepuffer enthaltene Detergenz SDS führt dazu, dass die Proteine alle eine negative Gesamtladung annehmen, die zu ihrer Größe proportional ist, was eine Auftrennung im Gleichspannungsfeld ermöglicht. Die Proben werden für 5 Minuten auf 95°C erhitzt.

Zu Beginn der Elektrophorese wird eine Spannung von 100 V angelegt, die auf 160 V erhöht wird, nachdem die Proben in das Trenngel eingedrungen sind. Die Gelelektrophorese erfolgt in 1x Laufpuffer. Zur Abschätzung der Größe der detektierten Proteine wird der Proteinstandard SDS-6H der Firma Sigma verwendet, der sechs Banden der Größe 29, 45, 66, 97, 116 sowie 205 kDa aufweist.

2.4.3 Westernblot-Analyse

Nach der Auftrennung werden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dies erfolgt in einer Gelkammer der Firma Bio-Rad. Zunächst wird die Membran für 5 Minuten in Blotpuffer äquilibriert. Zum Aufbau des „Blot-Sandwiches“ werden zwei 3 MM Whatman-Filterpapiere in Blotpuffer getaucht und in die Gelkammer gelegt. Darauf wird die Membran und anschließend das Gel gelegt. Nach oben wird das „Blot-Sandwich“ durch zwei weitere Filterpapiere abgeschlossen. Durch sanften Druck werden Luftblasen entfernt. Der Transfer der Proteine erfolgt bei 50 mA für 90 Minuten.

Die Qualität des Transfers wird mittels reversibler Färbung mit Ponceau S überprüft. Hierfür wird die Membran für eine Minute in Färbelösung inkubiert und anschließend mit Wasser so lange entfärbt, bis die Proteinbanden sichtbar werden. Zur späteren Orientierung werden die Banden des Standards mit Bleistift nachgezogen. Die gefärbte Membran wird direkt in Blockierlösung überführt, wo sie für eine Stunde verbleibt und während dieser Zeit leicht geschüttelt wird. Anschließend wird die Membran in Folie eingeschweißt und 1 ml der 9E10-Primärantikörperlösung zugegeben. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgt über Nacht bei 4°C.

Die Membran wird unter leichtem Schütteln dreimal für jeweils 10 Minuten mit TBST gewaschen und anschließend der Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus-Alkalische Phosphatase) in einer Verdünnung von 1:5000 (in 1 % (w/v) Milchpulver/TBST) zur Membran gegeben und die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die Membranen zweimal für 10 Minuten in TBST, einmal für 10 Minuten in TBS sowie zweimal für 5 Minuten in Detektionspuffer gewaschen, ehe die Membran in Färbelösung inkubiert wird. Die Färbung erfolgt im Dunkeln so lange, bis deutliche Banden sichtbar sind. Durch Waschen in Wasser wird die Färbereaktion gestoppt.

Der Blot wird zur Dokumentation eingescannt und in Alufolie eingepackt aufbewahrt.

III ERGEBNISSE

1 Die Bedeutung des Wnt/PCP-Signalwegs für konvergente Extension

1.1 Untersuchung von konvergenter Extension mittels Keller-Explantaten

Eine umfassende Analyse der Auswirkung von Veränderungen in der Aktivität des Wnt/PCP-Signalwegs auf konvergente Extensionsbewegung des Mesoderms während der Gastrulation von *Xenopus laevis* wurde mittels *Open Face Keller Explants* durchgeführt.

Hierfür wurde der Wnt/PCP-Signalweg zunächst durch Mikroinjektion von Substanzen, die einen Einfluss auf die Aktivität dieser Signalkaskade besitzen, überaktiviert bzw. gehemmt. Anschließend wurden Keller-Explantate präpariert und anhand der Elongation der Explantate die Fähigkeit zur konvergenten Extension untersucht.

Ort und Zeitpunkt der Injektion sind abhängig von dem Bereich, in dem die injizierte Substanz wirksam sein soll. Da konvergente Extensionsbewegung des Mesoderms im dorsalen Bereich des Embryos stattfindet, wurden die verwendeten Substanzen in die beiden dorsalen Blastomeren von Embryonen im Vierzellstadium injiziert. Diese sind im Idealfall deutlich heller und auch kleiner als die beiden ventralen Blastomeren. Die Embryonen wurden anschließend in einen Kühlbrutschrank mit einer Innentemperatur von 15°C überführt. Unter diesen Bedingungen erreichen die Embryonen 20 bis 21 Stunden nach der Befruchtung Stadium 10,25, welches den Beginn der Gastrulation markiert. In diesem Stadium wurden Keller-Explantate präpariert, die anschließend für acht Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Von jedem injizierten Konstrukt wurden 10 bis 12 Explantate präpariert. Zusätzlich wurden an jedem Versuchstag 8 bis 10 Explantate von uninjizierten (Wildtyp-) Embryonen geschnitten. Um eine Vergleichbarkeit sämtlicher Injektionen zu gewährleisten, wurden an einem Versuchstag ausschließlich Gelege eines Weibchens verwendet. Ein ungehinderter Ablauf der konvergenten Extensionsbewegung war daran zu erkennen, dass sich das Explantat deutlich verlängerte, wobei die Verlängerung deutlich schmaler als die Basis war. Im Fall einer vollständigen Hemmung der konvergenten Extension war hingegen keinerlei Verlängerung erkennbar.

Um eine Aussage darüber zu treffen, inwieweit die Mikroinjektionen konvergente Extension beeinträchtigen, wurden die Explantate wie in Kühl *et al.* (2001) beschrieben, in drei Klassen eingeteilt. Explantate der Klasse 0 weisen eine vollständige Hemmung der konvergenten Extension auf (Abb. III-1 A). Im Fall einer unbeeinträchtigten konvergenten Extension zeigen die Explantate eine Gestalt wie in Abb. III-1 C dargestellt und werden der Klasse 2 zugeordnet. Explantate, die eine schwache Verlängerung sowie eine leichte Verschmälerung des Fortsatzes aufweisen, gehören der Klasse 1 an (Abb. III-1 B). Explantate aus uninjizierten Embryonen sollten zur überwiegenden Mehrheit der Klasse 2 angehören. War dies nicht der Fall, so war davon auszugehen, dass eine eventuell festgestellte Hemmung der konvergenten Extension nicht durch die Injektion einer Substanz hervorgerufen wurde; diese Daten wurden für die Analyse der konvergenten Extension nicht herangezogen.

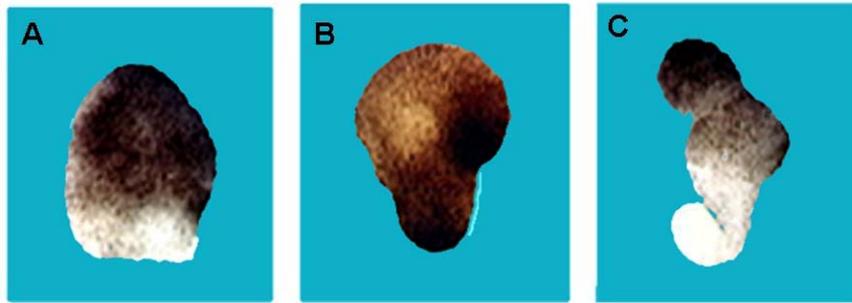


Abb. III-1: Keller-Explantate werden in drei Klassen eingeteilt (nach Kühl *et al.* 2001)

A: In Explantaten der Klasse 0 ist konvergente Extension vollständig reprimiert B: Explantate der Klasse 1 weisen schwache konvergente Extensionsbewegung auf C: Explantate der Klasse 2 sind stark verlängert, konvergente Extension findet in vollem Umfang statt.

1.2 Morpholino-Oligonukleotide hemmen die Translation

Eine Möglichkeit zur Analyse der Funktion eines Gens besteht darin, dieses Gen selektiv zu hemmen. Dies kann mittels eines dominant-negativen Konstrukts des Gens erfolgen, welches die Funktion des endogenen Gens reprimiert, indem es zum Beispiel mit diesem in Konkurrenz um Interaktionspartner tritt. Zunehmenden Stellenwert nimmt die spezifische Hemmung eines Gens durch so genannte Morpholino-Phosphoramidat-Oligonukleotide oder abgekürzt Morpholino-Oligonukleotide (MO) bzw. Morpholinos ein.

Ein Bestandteil der Morpholinos sind die 4 Basen - Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin – die auch in Nukleinsäuren vorkommen. Im Gegensatz zu DNA und RNA ist die Base hier jedoch nicht mit einem Zuckerrest, sondern mit einem Morpholinring verbunden. Die Verbindung zweier Monomere erfolgt beim Morpholino über ein Phosphordiamidat anstelle eines Phosphatrestes. Ein Vergleich der Struktur von DNA und Morpholino-Oligonukleotid ist in Abb. III-2 gezeigt.

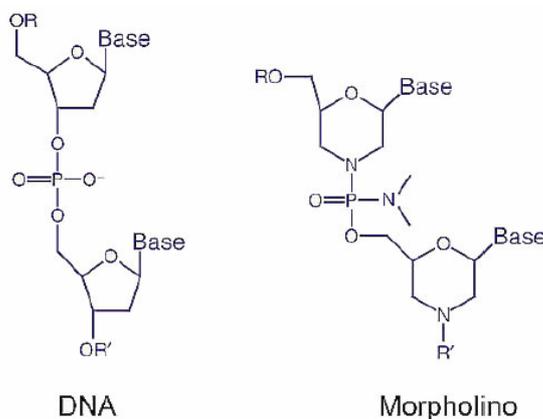


Abb. III-2: Vergleich der Struktur von DNA und Morpholino-Oligonukleotid.

Sowohl Morpholino als auch DNA enthalten die 4 Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin. Im links dargestellten DNA-Molekül ist die Base mit Desoxyribose verbunden, die Verknüpfung zweier Monomere erfolgt über einen Phosphatrest. Im Morpholino nimmt ein Morpholinring die Position des Zuckers ein, die Verknüpfung der Untereinheiten erfolgt über ein Phosphordiamidat.

Die Struktur des Morpholinos bedingt zum einen eine exzellente mRNA-Bindefähigkeit, zum anderen sind MOs im Vergleich zu RNA äußerst stabil und werden nicht von RNasen abgebaut, was die Effizienz der Substanz in der Zelle erhöht und außerdem verhindert, dass sich degradierte Bestandteile eines MO in die DNA der Zelle einlagern und Mutationen oder andere unerwünschte biologische Effekte auslösen (Summerton & Weller 1997). Morpholino-Oligonukleotide bestehen aus 20 bis 25 Monomeren. Sie binden an den komplementären Sequenzabschnitt in der mRNA des Zielgens und unterbinden spezifisch deren Translation. Morpholinos werden in der Regel so konstruiert, dass sie im Bereich um das Startcodon binden und so die Bildung des Initiationskomplexes für die Translation verhindern. Gegenüber der Verwendung von dominant-negativen Konstrukten haben Morpholinos den Vorteil, dass eventuell auftretende unspezifische Nebenwirkungen weitgehend ausgeschlossen werden können.

1.3 XWnt-11 wird durch Injektion eines spezifischen Morpholinos reprimiert

Durch Injektion eines Morpholino-Oligonukleotids, das spezifisch die Translation von XWnt-11 unterbindet, wurde der Wnt/PCP-Signalweg gehemmt. Hierfür wurde ein Morpholino-Oligonukleotid eingesetzt, das XWnt-11 im Bereich des Startcodons bindet und das erstmals von Pandur *et al.* (2002) beschrieben wurde. In dieser Publikation wurde das Morpholino verwendet, um die Funktion von XWnt-11 auf die Herzentwicklung zu untersuchen.

Anhand von Keller-Explantaten wurde analysiert, welche Auswirkungen die Injektion dieses Morpholinos auf die konvergente Extensionsbewegung des einwandernden Mesoderms hat. Hierfür wurde das XWnt-11 Morpholino in die beiden dorsalen Blastomeren von Embryonen im Vierzellstadium injiziert. Im Verlauf der Injektionsexperimente stellte sich heraus, dass das Morpholino-Oligonukleotid, ebenso wie sämtliche anderen verwendeten Morpholino-Oligonukleotide, seine Wirkung in der dorsalen Marginalzone nur entfalten konnte, wenn es genau in diesen Bereich des Embryos injiziert wurde.

Nach Erreichen des Gastrulastadiums wurden Keller-Explantate aus den Embryonen präpariert. Es war notwendig, sicherzustellen, dass der nach Injektion des Morpholinos beobachtete Effekt eine spezifische Auswirkung der Herunterregulation des Morpholino-Zielgens war und nicht durch sonstige Einflüsse, wie zum Beispiel durch Verletzung bei der Injektion, hervorgerufen wurde. Hierzu diente die Injektion eines Kontrollmorpholinos, welches von der Firma Gene-Tools so konstruiert wurde, dass keine komplementären Sequenzen zu diesem Morpholino in den bisher bekannten Genen von *Xenopus* existieren.

Bei Verwendung von Morpholinos ist es wichtig, die optimale Konzentration zu finden. In zu hoher Konzentration verursachen Morpholinos unspezifische Nebeneffekte, so lösen sie zum Beispiel Absterben von Zellen aus (Heasman 2002). Die optimale Konzentration ist die minimale Konzentration, in der das Morpholino-Oligonukleotid wirksam ist.

Die eingesetzte Morpholino-Konzentration kann auf verschiedene Art und Weise angegeben werden. Üblich ist die Angabe der (Stoffmengen-) Konzentration. Alternativ ist jedoch auch

eine Angabe der injizierten Stoffmenge oder der Masse an injizierter Substanz möglich. Dabei entspricht eine Konzentration von 500 μM bei einem Injektionsvolumen von 8 nl einer injizierten Stoffmenge von 4 pmol, die eine Masse von 40 bis 50 ng aufweist. Im Folgenden wird die Menge an injiziertem MO anhand der injizierten Stoffmenge angegeben.

Aus zahlreichen Publikationen geht hervor, dass eine Blockierung des Wnt/PCP-Signalwegs zu einer Hemmung der konvergenten Extensionsbewegung führt. Somit wurde erwartet, dass Injektion des XWnt-11-Morpholinos einen Rückgang der Elongation in den Explantaten zur Folge haben müsste.

Die injizierte Stoffmenge an XWnt-11-Morpholino wurde im Bereich von 0,125 pmol bis 4 pmol variiert. Als Kontrollgruppe wurden sämtliche Explantate aus uninjizierten Embryonen herangezogen, die an den für den Versuch relevanten Versuchstagen präpariert wurden. In diesem Fall handelte es sich um 13 Versuchstage, an denen 213 Kontrollexplantate geschnitten wurden. Um verlässliche Aussagen zu ermöglichen, musste ein Injektionsexperiment in mindestens zwei unabhängigen Versuchen bestätigt werden.

Während eine Stoffmenge von 0,125 pmol lediglich einen geringen Effekt auf die konvergente Extension in Keller-Explantaten hatte, waren bei einer Stoffmenge von 4 pmol bereits zu Beginn der Gastrulation schwerste Entwicklungsstörungen feststellbar, die eine Präparation von Keller-Explantaten unmöglich machten. Der Großteil der Embryonen starb bereits im Verlauf der Gastrulation. Als geeignet erwies sich eine Stoffmenge von 0,5 bzw. 1 pmol. In beiden Fällen sank der Anteil der Explantate mit unbeeinträchtigter konvergenter Extension auf etwa 40 % verglichen mit der uninjizierten Kontrolle.

Die Ergebnisse der Injektionen sind in Abb. III-3 zusammengefasst. Für die Darstellung der Elongation der Explantate wurden nur die vollständig elongierten Klasse 2-Explantate herangezogen. Dabei wurde der Anteil an Klasse 2-Explantaten in der uninjizierten Kontrollgruppe auf 100 % normiert und der Anteil vollständig elongierter Explantate aus den injizierten Embryonen relativ zur Kontrollgruppe aufgetragen.

Um die Spezifität des Morpholinos zu verifizieren, wurde versucht, die Hemmung der konvergenten Extensionsbewegung in den Explantaten durch Coinjektion von XWnt-11 mRNA aufzuheben. Dies gelang, indem eine Mischung aus 1 pmol Morpholino und 16 pg XWnt-11 injiziert wurde. Dabei stieg der Anteil der Explantate mit vollständiger konvergenter Extensionsbewegung sogar über den Wert des Wildtyps an. Da auch bei den uninjizierten Embryonen niemals alle Explantate der Klasse 2 zugeordnet werden, sind Werte über 100 % möglich.

Sowohl die Hemmung der konvergenten Extension bei Injektion der Morpholino-Oligonukleotide als auch die Wiederherstellung dieser Gastrulationsbewegung durch Coinjektion von XWnt-11-mRNA war signifikant, was mittels Durchführung eines studentischen t-Tests für die Anteile der mit 0 und 2 klassifizierten Explantate auf dem Signifikanzniveau von 0,95 bestätigt wurde. Somit konnte nachgewiesen werden, dass das Morpholino sowohl funktionell als auch selektiv war.

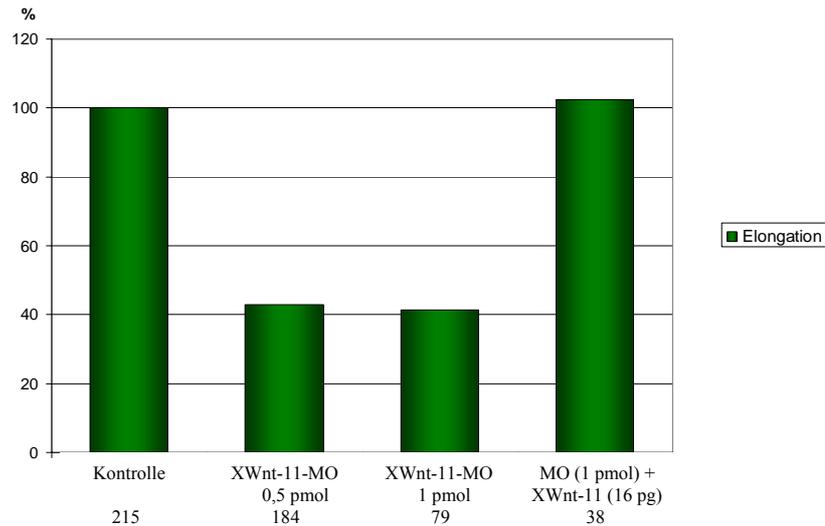


Abb. III-3: Injektion eines XWnt-11-Morpholinos hemmt die Elongation in Keller-Explantaten. Dieser Effekt wird durch Coinjektion von XWnt-11-mRNA wieder aufgehoben.

Der Anteil der zur Klasse 2 zugehörigen Explantate aus der uninjizierten Kontrollgruppe wurde auf 100 % normiert und der Anteil der vollständig elongierten Explantate relativ zu diesem Wert berechnet. Die Anzahl in der unteren Zeile gibt die Summe der analysierten Explantate an.

1.4 Überexpression von Xwnt-11 zeigt phänotypische Auswirkungen

Die Blockierung des Wnt/PCP-Signalwegs durch Injektion eines XWnt-11-Morpholinos hemmte wie erwartet die konvergente Extensionsbewegung. In einem weiteren Versuch wurde untersucht, welche Auswirkung Überexpression dieses Signalwegs auf die konvergente Extension hatte.

Die Überaktivierung des Wnt/PCP-Signalwegs erfolgte durch Injektion von exogener XWnt-11-mRNA, die mittels *in vitro* Transkription aus Plasmid-DNA hergestellt wurde. Es wurden 8 nl injiziert, die zwischen 4 pg und 500 pg XWnt-11-mRNA enthielten. Zunächst wurde die Auswirkung einer Überaktivierung des Wnt/PCP-Signalwegs auf die Entwicklung von *Xenopus*- Embryonen anhand der Phänotypen untersucht.

Hierzu wurden die Embryonen bei 16°C inkubiert. Die Phänotypen wurden 46 bzw. 68 Stunden nach der Befruchtung ausgewertet und am Fluoreszenzstereomikroskop fotografiert. Zu diesen Zeitpunkten hatten die uninjizierten Kontrollembryonen Stadium 26 bzw. 36 erreicht. Aufnahmen der charakteristischen Phänotypen zeigt Abb. III-4.

Eine Konzentration von bis zu 32 pg XWnt-11 hatte keine sichtbaren Auswirkungen zur Folge. Mit einer Erhöhung der Konzentration waren jedoch Störungen in der Embryonalentwicklung verbunden, die bei steigender Konzentration gravierender ausfielen, was sowohl anhand der geringeren Überlebensrate, als auch an der zunehmenden Schwere der Phänotypen zum Ausdruck kam. Eine Übersicht über die beobachteten Phänotypen ist in Tab. III-1 aufgelistet. Die Auswertung wurde 68 Stunden nach der Befruchtung durchgeführt.

Einige der injizierten Embryonen zeigten bereits während der Gastrulation Probleme beim Schließen des Blastoporus, was sich später in Form von offenen Rücken auswirkte. Eine Ursache für diesen Phänotyp liegt in einer Störung von Gastrulationsbewegungen, wodurch

die Entwicklung von Notochord und darüber liegendem Neuralgewebe nicht korrekt abläuft, so dass sich das Neuralrohr zum Ende des Neurulastadiums nicht schließt oder sich in gravierenden Fällen gar nicht erst bildet.

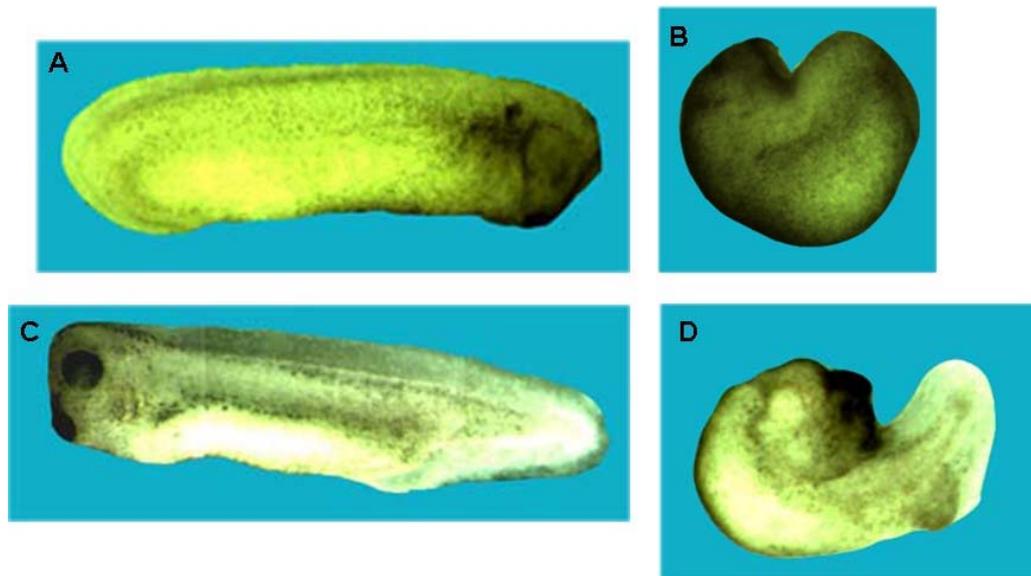


Abb. III-4: Überexpression von XWnt-11 hat Störungen in der Entwicklung dorsaler Strukturen zur Folge. A: Wildtyp-Embryo, St. 26 B: Embryo, 250 pg XWnt-11 injiziert, St. 26. Die Embryonen waren im Vergleich zur uninjizierten Kontrollgruppe deutlich verkürzt C: Wildtyp-Embryo, St. 36 D: Embryo, 250 pg XWnt-11 injiziert, St. 36. Vor allem die dorsalen Strukturen waren stark verkürzt, dieser „Schnecken-Phänotyp“ deutete auf eine Beeinträchtigung von konvergenter Extensionsbewegung hin.

Im weiteren Verlauf der Entwicklung stellte sich heraus, dass bei Injektion von hohen Dosen XWnt-11 viele der Embryonen eine stark verkürzte Körperachse aufwiesen. Dabei war die dorsale Seite jedoch wesentlich stärker verkürzt als die ventrale. Die schwerste Form war aufgrund der Verkürzung der dorsalen Seite derart stark gebogen, dass Kopf und Schwanz nebeneinander lagen. Aufgrund seines charakteristischen Aussehens wurde dieser Phänotyp als „Schnecken-Phänotyp“ bezeichnet. Diese Embryonen wiesen häufig zusätzlich einen offenen Rücken auf.

Tab. III-1: Übersicht über die Überlebensrate und das Auftreten von charakteristischen Phänotypen nach XWnt-11-Injektion.

	Überlebens- rate	normal	Leicht dorsal verkürzt	Offene Rücken	„Schnecken- Phänotyp“	Multiple Schäden
500 pg	68/239 – 28 %	10	9	9	36	4
250 pg	54/124 – 44 %	18	8	8	20	
125 pg	21/32 – 66 %	8		13		
62,5 pg	31/36 – 85%	24	2	5		
32 pg	21/22 – 95 %	21				

1.5 Überexpression von XWnt-11 hemmt konvergente Extension

Die Analyse der Phänotypen lässt vermuten, dass die Überaktivierung des Wnt/PCP-Signalwegs durch Injektion von exogenem XWnt-11 eine Beeinträchtigung von Gastrulationsbewegungen zur Folge hat. Gerade die Verkürzung der Körperachse und insbesondere die Verkürzung der dorsalen Seite lassen auf Störungen in der konvergenten Extensionsbewegung schließen.

Um die Auswirkung der XWnt-11-Überexpression auf konvergente Extension direkt zu untersuchen, wurde XWnt-11-mRNA in einer Konzentration zwischen 4 pg und 500 pg in die beiden dorsalen Blastomeren in Embryonen im Vierzellstadium injiziert. Es wurden Keller-Explantate präpariert, die anschließend gemäß der oben beschriebenen Einteilung klassifiziert wurden. Die Ergebnisse zeigt das Diagramm in Abb. III-5. Analog zu Abb. III-3 wurde der Anteil der vollständig elongierten Explantate aus der uninjizierten Kontrollprobe auf 100 % normiert.

Interessanterweise lag bereits bei einer injizierten Menge von 4 pg XWnt-11-mRNA der Anteil der vollständig elongierten Explantate um zwei Drittel unter dem Wert der uninjizierten Kontrolle. Mit steigender Konzentration verstärkte sich dieser Effekt.

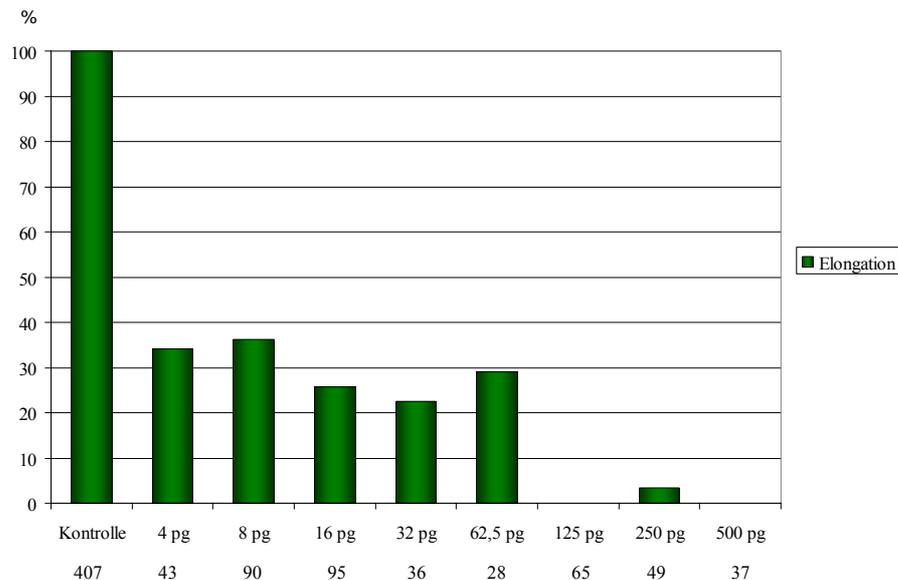


Abb. III-5: XWnt-11-Überexpression hemmt konvergente Extension bereits in einer Konzentration von 4 pg. Auf der x-Achse ist die Menge an injizierter XWnt-11-mRNA aufgetragen. Die Elongation der Explantate ging bereits bei Injektion von 4 pg XWnt-11-mRNA auf etwa ein Drittel des Wertes der Kontrolle zurück. Erhöhung der Konzentration führte zu einer Verstärkung des hemmenden Effektes

1.6 Sowohl Hemmung als auch Überaktivierung des Wnt/PCP-Signalwegs hemmt konvergente Extension

Um zu überprüfen, über welche Effektoren der Wnt/PCP-Signalweg konvergente Extensionsbewegung ermöglicht, wurde dieser Signalweg durch Injektion eines Morpholinos gegen den für die Weiterleitung des Wnt-Signals in die Zelle verantwortlichen Rezeptors Frizzled 7 gehemmt. Außerdem wurde der Signalweg auf weiteren Ebenen durch Injektion von Dishevelled Δ DEP sowie von dominant-negativen Konstrukten der kleinen GTPasen RhoA (RhoA-N19) und Rac 1 (Rac 1-N17) inhibiert. Daneben wurde dieser Signalweg durch Injektion von aktivem Frizzled 7 bzw. RhoA-V14 sowie Rac 1-V12, konstitutiv-aktiven Konstrukten der kleinen GTPasen, überaktiviert und die Auswirkung auf die konvergente Extensionsbewegung anhand von Keller-Explantaten analysiert.

Bei Dsh Δ DEP handelt es sich um eine Deletionsmutante, die aufgrund des Fehlens der DEP-Domäne selektiv die Signalweiterleitung innerhalb des Wnt/PCP-Signalwegs verhindert, ohne den kanonischen Wnt-Signalweg zu beeinträchtigen. Die konstitutiv-aktiven bzw. dominant-negativen Konstrukte der kleinen GTPasen wurden durch Austausch einer für die Regulation bzw. Funktion wichtigen Aminosäure erhalten.

Die Injektion von mRNA der konstitutiv aktiven RhoA- sowie Rac1-Konstrukte hatte selbst in äußerst geringer Konzentration schwerwiegende Störungen in der Entwicklung der Embryonen zur Folge.

Eingeschleuste mRNA wird bereits kurz nach der Injektion translatiert und das Genprodukt ist in der Zelle aktiv. Da die kleinen GTPasen an einer Vielzahl von Prozessen in der Zelle beteiligt sind, ist nicht verwunderlich, dass eine Überaktivierung zu einem derart frühen Zeitpunkt die weitere Entwicklung beeinträchtigt. Um die Bildung von aktivem Protein bereits während der ersten Teilungen zu verhindern, wurde das DNA-Plasmid injiziert. Die Transkription der injizierten DNA erfolgt erst nach Beginn der zellulären Genexpression, die im *Xenopus*-Embryo nach der so genannten *midblastula transition* (MBT) während des Blastulastadiums einsetzt.

Die Ergebnisse aus diesen Experimenten sind in Abb. III-6 zusammengefasst. Es war festzustellen, dass die Hemmung des Wnt/PCP-Signalwegs auf allen Ebenen einen signifikanten Rückgang der Elongation der Explantate zur Folge hatte, wie eine Durchführung eines studentischen t-Tests auf dem Signifikanzniveau von 0,95 bestätigte. Allerdings fiel das Ausmaß der Inhibierung der Elongation sehr unterschiedlich aus. Bei Injektion des Morpholinos gegen Fz 7 lag der Anteil der elongierten Explantate lediglich um 30 % unter dem Wert der Kontrolle, Überaktivierung von Fz 7 hatte hingegen eine 70 %ige Hemmung zur Folge.

Die Ergebnisse lassen jedoch den Schluss zu, dass Veränderungen in der Aktivität sämtlicher injizierter Substanzen eine negative Auswirkung auf konvergente Extensionsbewegung haben.

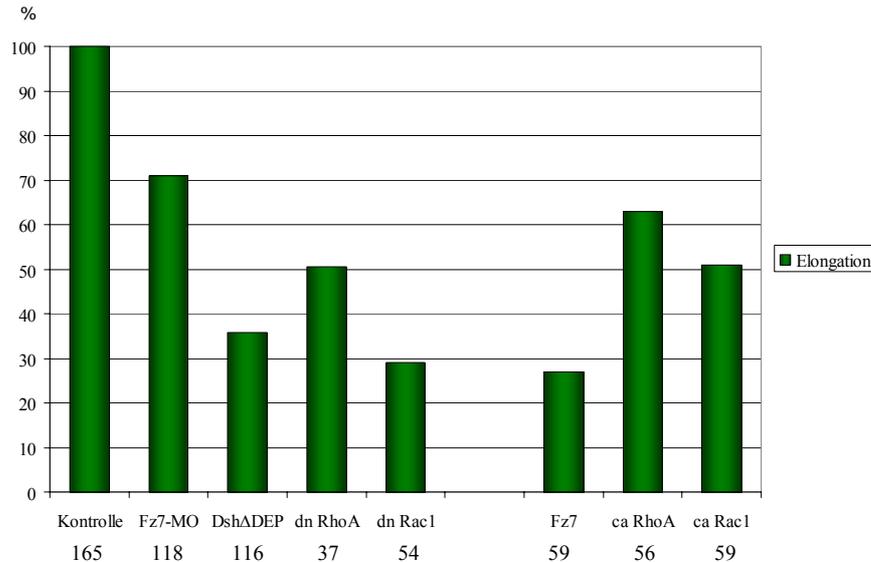


Abb. III-6: Sowohl Überaktivierung als auch Inhibierung des Wnt/PCP-Signalwegs hemmt konvergente Extension. Injiziert wurden: Fz 7-MO: 4 pmol, DshΔDEP: 500 pg, dn RhoA: 200 pg, dn Rac 1: 200 pg, Fz 7: 500 pg, ca RhoA: 20 pg DNA, ca Rac 1: 20 pg DNA. Alle injizierten Konstrukte führten zu einem signifikanten Rückgang der Elongation in den Explantaten, was durch Durchführung eines studentischen t-tests bestätigt wurde.

1.7 Hemmung des Wnt/PCP-Signalwegs hemmt selektiv die Konstriktion

Eine interessante Feststellung ist, dass die Explantate bei den unter 1.6 beschriebenen Experimenten in vielen Fällen einen bislang noch nicht beschriebenen Phänotyp zeigten. Sie waren zwar vollständig elongiert, allerdings waren ihre Auswüchse extrem breit. Für die gesonderte Erfassung dieser Explantate wurde eine neue Klasse eingeführt: die Klasse 2x (Abb. III-7).

Wie bereits erwähnt, besteht die konvergente Extensionsbewegung aus Konvergenz sowie Elongation. Nach R. Keller wird die Verschmälerung des Mesoderms als Folge von Konvergenz im Verlauf der konvergenten Extension als Konstriktion definiert (Keller *et al.* 2000).

Zur Klärung der Frage, ob die Klasse 2x als eigenständige Klasse betrachtet werden kann, wurden 40 Explantate der Klasse 2 sowie 45 Explantate der Klasse 2x fotografiert und anschließend am Computer mit Hilfe des Programms ‚Openlab Version 3.1.1‘ vermessen. Hierzu wurde die ursprüngliche Länge L_U , die Gesamtlänge L_G , die Gesamtbreite B_G sowie die Breite der die einwandernden Zellen repräsentierenden Verlängerung (B_V) herangezogen. Es wurde das Verhältnis der Gesamtlänge zur ursprünglichen Länge (L_G / L_U) sowie das Verhältnis der Gesamtbreite zur Breite der einwandernden Zellen (B_G / B_V) bestimmt.

Für L_G / L_U ergab sich für die Explantate der Klasse 2 ein Wert von 2,2 mit einer Standardabweichung von $\pm 0,3$; für die Explantate der Klasse 2x lag dieser Wert bei $2,2 \pm 0,2$. Das Verhältnis B_G / B_V , welches ein Maß für die Fähigkeit zur Konstriktion darstellt, betrug bei den Explantaten der Klasse 2 $2,5 \pm 0,3$, während es bei den der Klasse 2x zugeordneten Explantaten auf $1,6 \pm 0,2$ zurückging. Dieser Unterschied war statistisch signifikant. Somit

handelte es sich beim 2x-Phänotyp um eine eigenständige Klasse, bei der eine Reduktion der Fähigkeit zur Konstriktion vorlag, wogegen die Elongation nicht beeinträchtigt war.

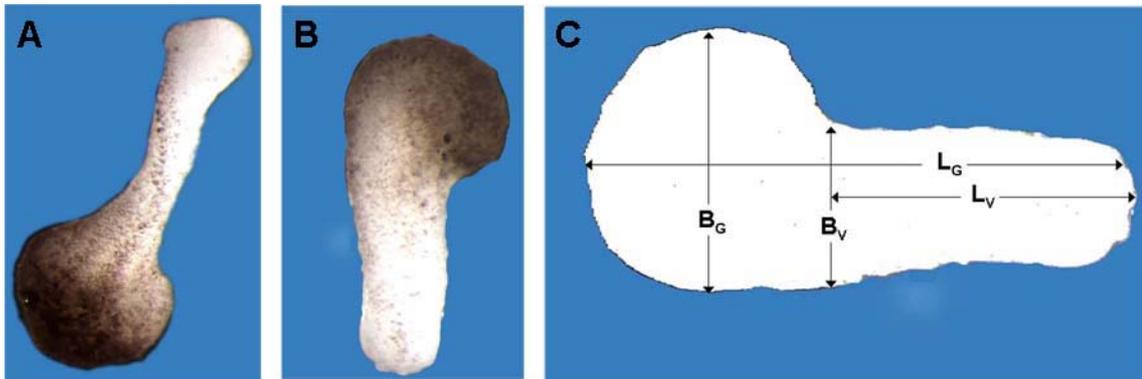


Abb. III-7: Der Phänotyp 2x repräsentiert eine eigenständige Klasse von Keller-Explantaten.

A: Explantat der Klasse 2. B: Explantat der Klasse 2x. In C sind die relevanten Parameter dargestellt, die für die Feststellung herangezogen wurden, ob es sich bei dem Phänotyp 2x um eine eigenständige Klasse handelte: B_G : Gesamtbreite, B_V : Breite der Verlängerung, L_G : Gesamtlänge, L_V : Länge der Verlängerung

Um zu überprüfen, ob der Phänotyp 2x bei Injektion bestimmter Komponenten des Wnt/PCP-Signalwegs gehäuft auftrat, wurde dieser Signalweg zum einen durch Injektion von 1 pmol XWnt-11-Morpholino sowie durch Injektion der unter 1.6 erwähnten Konstrukte gehemmt und zum anderen durch aktive bzw. konstitutiv aktive Konstrukte von XWnt-11, Frizzled 7, RhoA sowie Rac1 überaktiviert.

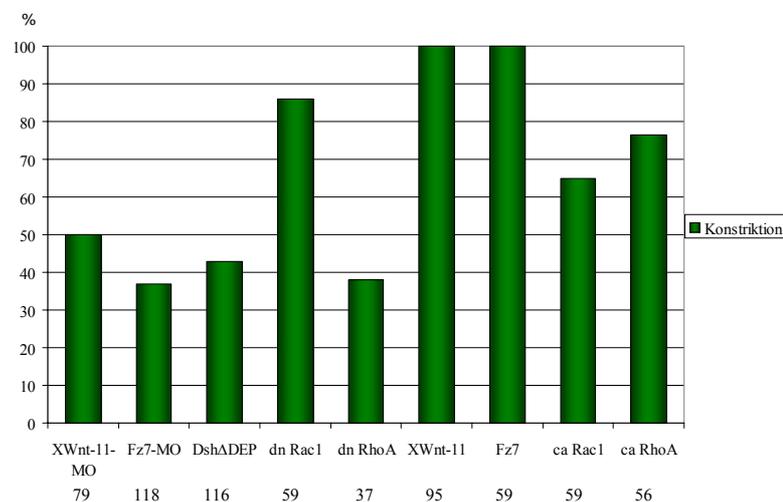


Abb. III-8: Hemmung des Wnt/PCP Signalwegs mittels dn RhoA hemmt selektiv die Konstriktion.

Injiziert wurden: XWnt-11-MO: 1 pmol, Fz 7-MO: 4 pmol, dn Rac 1: 200 pg mRNA, dn RhoA: 200 pg mRNA, XWnt-11: 16 pg mRNA, Fz 7: 500 pg mRNA, ca Rac 1: 20 pg DNA, ca RhoA: 20 pg DNA. Aufgetragen wurde der Anteil der Klasse 2-Explantate, die Konstriktion aufwiesen. Während Hemmung des Wnt/PCP-Signalwegs durch XWnt-11-MO, Fz 7-MO sowie dn RhoA eine starke Hemmung der Konstriktion verursachte, hatten die übrigen Konstrukte einen deutlich schwächeren bzw. gar keinen Einfluss auf die Konstriktion.

Es war festzustellen, dass Explantate der Klasse 2x bei der Injektion bestimmter Substanzen gehäuft auftraten. So waren bei Hemmung des Wnt/PCP-Signalwegs durch Injektion von Frizzled 7-Morpholino, DshΔDEP sowie RhoA-N19 mehr als 50 % der elongierten

Explantate vom Typ 2x, während der Anteil der Explantate mit gehemmter Konstriktion bei Injektion von dominant-negativem Rac 1 sowie bei Überaktivierung des Wnt/PCP-Signalwegs deutlich geringer ausfiel.

Aus den in Abb. III-8 dargestellten Ergebnissen folgt, dass eine Hemmung der Expression von XWnt-11, Frizzled 7, Dishevelled sowie RhoA bei der Mehrzahl der elongierten Explantate eine Beeinträchtigung der Konstriktion zur Folge hat.

2 Hemmung von XPAPC verhindert Konstriktion

In einem Parallelprojekt wurde versucht zu klären, über welchen Mechanismus das paraxiale Protocadherin XPAPC in *Xenopus* konvergente Extension beeinflusst. Grundlage für diese Versuche waren die Erkenntnisse von Kim *et al.* (1998).

Kim *et al.* wiesen nach, dass Inhibierung des Protocadherins konvergente Extension in animalen Kappen verhindert, woraus gefolgert wurde, dass XPAPC essentiell für den korrekten Ablauf von Gastrulationsbewegungen ist.

Für ihre Versuche verwendeten Kim *et al.* drei Konstrukte: aktives (*full length*) FL-XPAPC sowie die beiden Deletionskonstrukte M-XPAPC und S- bzw. DN-XPAPC, deren Struktur in Abb. III-9 schematisch dargestellt ist. Bei M-XPAPC ist ein Großteil der zytoplasmatischen Domäne deletiert, während S-XPAPC lediglich die für den extrazellulären Abschnitt codierende Sequenz beinhaltet. Das Genprodukt dieser Mutante ist sekretiert und zeigt dominant-negative Auswirkung. Sowohl M-XPAPC als auch S-XPAPC verhinderten konvergente Extensionsbewegung in animalen Kappen.

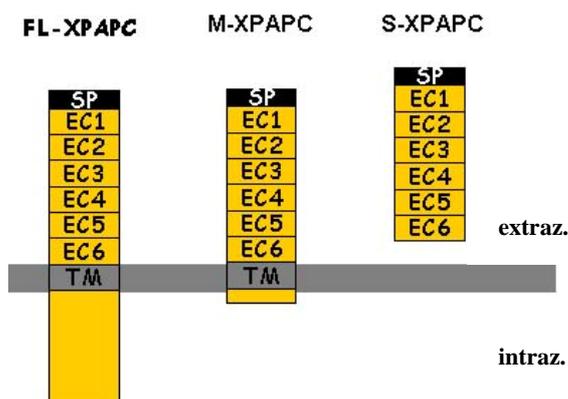


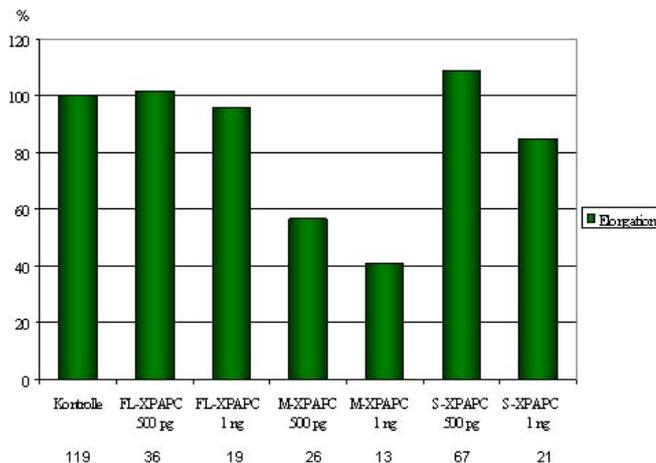
Abb. III-9: Schematische Darstellung der von Kim *et al.* verwendeten Konstrukte.

Das aktive FL-XPAPC enthält die komplette Sequenz. In M-XPAPC ist ein Großteil der zytoplasmatischen Domäne deletiert, das dominant-negative S-XPAPC beinhaltet lediglich die 6 extrazellulären (EC) Domänen sowie das Signalpeptid (SP), die Transmembrandomäne (TM) sowie die zytoplasmatische Domäne sind deletiert.

Zunächst wurde versucht, die Ergebnisse von Kim *et al.* unter Verwendung derselben Konstrukte zu reproduzieren. Allerdings wurde der Einfluss dieser Substanzen auf die konvergente Extensionsbewegung nicht mittels animalen Kappen sondern anhand von Keller-Explantaten untersucht. Die Konstrukte wurden in einer Konzentration von jeweils 500 pg sowie 1 ng dorsal injiziert. Dies entspricht in etwa den von Kim *et al.* eingesetzten Konzentrationen. Nach Erreichen des Stadiums 10,25 wurden Keller-Explantate präpariert. Überraschenderweise konnten die Ergebnisse von Kim *et al.* in unseren Versuchen nicht

bestätigt werden. Die Injektion von M-XPAPC hatte eine Hemmung der Elongation der Explantate zur Folge. Bei Injektion des dominant-negativen S-XPAPC war jedoch selbst bei einer injizierten Menge von 1 ng keine Hemmung der Elongation im Vergleich zur uninjizierten Kontrolle feststellbar (Abb. III-10 A).

A:



B:

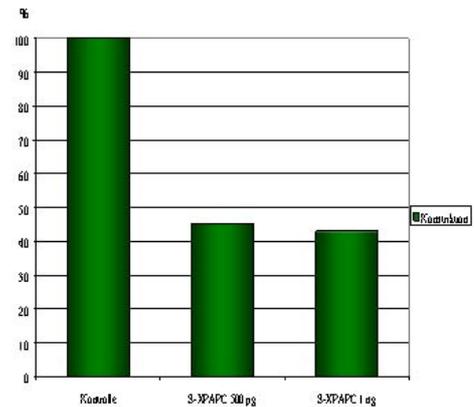


Abb. III-10: Injektion von dominant-negativem X-PAPC hemmt selektiv die Konstriktion in Keller-Explantaten.

A: Während Injektion von M-XPAPC eine Hemmung der Elongation verursachte, war dies im Falle des dominant-negativen Konstrukts S-XPAPC nicht der Fall. B: Injektion von S-XPAPC hemmte jedoch selektiv die Konstriktion.

Interessant war jedoch, dass mehr als die Hälfte der Explantate aus mit S-PAPC injizierten Embryonen den bereits oben beschriebenen 2x-Phänotyp aufwiesen, der auf eine gestörte Konstriktion hindeutet. Der Anteil der Explantate vom Typ 2x an sämtlichen vollständig elongierten Explantaten lag sowohl bei Injektion von 500 pg als auch von 1 ng zwischen 50 und 60 %. Dieser Effekt trat bei Injektion von M-XPAPC nicht auf.

Die Analyse von Keller-Explantaten zeigt, dass die Injektion eines dominant-negativen XPAPC-Konstrukts die Konstriktion negativ beeinflusst, ohne jedoch die Elongation zu beeinträchtigen.

In einem weiteren Versuch wurde die Funktion von XPAPC durch Injektion eines spezifischen Morpholino-Oligonukleotids gehemmt. Dabei wurde erwartet, die Ergebnisse aus den Experimenten mit dem dominant-negativen XPAPC-Konstrukt zu bestätigen.

Das verwendete Morpholino wurde in Medina *et al.* (2004) sowie Unterseher *et al.* (2004) beschrieben. Es bindet 60 bis 80 Nukleotide vom Startcodon entfernt an die 5' untranslatierte Region von XPAPC. Bei Injektion von 0,8 pmol des Morpholinos zeigten 32 % der vollständig elongierten Explantate eine Störung der Konstriktionsfähigkeit. Dieser Anteil lag jedoch deutlich unter den Werten, die bei Verwendung des dominant-negativen Konstrukts erhalten wurden, und ließ sich auch durch Erhöhung der Morpholinokonzentration nicht steigern.

Eine Datenbankanalyse (<http://www.ncbi.nih.gov/blast>) ergab, dass zwei leicht voneinander abweichende mRNA-Sequenzen existieren, die vermutlich zwei Pseudoallele von XPAPC im

tetraploiden Genom von *Xenopus laevis* repräsentieren. Zusätzlich zur Sequenz von XPAPC, die von Kim *et al.* (1998) veröffentlicht wurde, existiert ein mit BU911425 bezeichneter *Expressed Sequence Tag* (EST), der in dem zur Sequenz des Morpholinos komplementären Abschnitt in sechs Basen von der XPAPC-Sequenz abweicht. Bei einem EST handelt es sich um eine cDNA-Sequenz, die identifiziert und in Sequenzdatenbanken verzeichnet ist, von der allerdings keine weiteren Informationen über das Gen sowie das zugehörige Protein existieren. Somit ist das Morpholino (XPAPC-MO 1), das zur von Kim *et al.* beschriebenen XPAPC-Sequenz komplementär ist, wahrscheinlich lediglich in der Lage, dieses Pseudoallel zu inaktivieren, während das andere unbeeinträchtigt bleibt. Um die selektive Hemmung der Konstriktion bei Inhibierung von XPAPC durch Injektion eines spezifischen Morpholinos zu verstärken, wurde ein zweites Morpholino (XPAPC-MO 2) eingesetzt, das komplementär zur Sequenz BU911425 ist. Injektion dieses Morpholinos in einer Konzentration von 0,8 pmol hatte einen Anteil von 44 % an 2x-Explantaten zur Folge. Wurde eine Mischung im Verhältnis 1:1 aus XPAPC-MO 1 und XPAPC-MO 2 in einer Gesamtstoffmenge von 0,8 pmol eingesetzt, steigerte sich der Anteil an Explantaten mit dem Phänotyp 2x an den elongierten Explantaten auf 56 %. Daher wurde für alle folgenden Versuche diese Mischung eingesetzt, welche von nun an als XPAPC-MO bezeichnet wird.

XPAPC-MO 1 (-56 bis -80)

XPAPC 5'-GATTCACATTGCCACACTGTTTCTAGGCATGAA....ATGCTG-3'
BU911425 5'-GATTCACA**CAGCAGCACTCTTTCTAGGCAAG**AA....ATGCTG-3'

XPAPC-MO 2 (-62 bis -86)

Abb. III-11: Sequenz der verwendeten XPAPC-Morpholinos.

XPAPC-MO 1 ist komplementär zur 5' UTR-Region der von Kim *et al.* veröffentlichten XPAPC-Sequenz. XPAPC-MO 2 ist komplementär zum EST BU911425, der wahrscheinlich ein zweites XPAPC-Pseudoallel repräsentiert. Der Abschnitt der mRNA, an den das Morpholino bindet, ist grau unterlegt. Die abweichenden Basen sind rot markiert.

Auf die Elongation der Explantate hatte die Injektion der Morpholinos jedoch keinen Einfluss. Bei Coinjektion von XPAPC zusammen mit dem XPAPC-MO wurde die Fähigkeit zur Konstriktion wieder hergestellt. Injektion des Kontrollmorpholinos der Firma Gene-Tools führte zu keiner signifikanten Reduktion von Elongation bzw. Konstriktion der Explantate. Die Ergebnisse aus diesem Versuch sind in Abb. III-12 zusammengefasst. In diesem Schaubild sind Elongation und Konstriktion gemeinsam aufgetragen. Für beide Eigenschaften wurde der Anteil der vollständig elongierten bzw. der zur Konstriktion befähigten Explantate in der uninjizierten Kontrolle auf 100 % normiert. Der extrem hohe Wert für die Elongation bei Injektion von XPAPC-MO 1 kommt dadurch zustande, dass in der uninjizierten Kontrolle etwa 60 % der Explantate der Klasse 2 zugeordnet wurden, während sämtliche Explantate aus den injizierten Embryonen vollständige Elongation zeigten.

Somit wurde durch Blockieren der Translation mittels spezifisch gegen XPAPC gerichteter Morpholinos bestätigt, dass Hemmung von XPAPC die Konstriktion beeinträchtigt, während die Elongation unbeeinträchtigt bleibt.

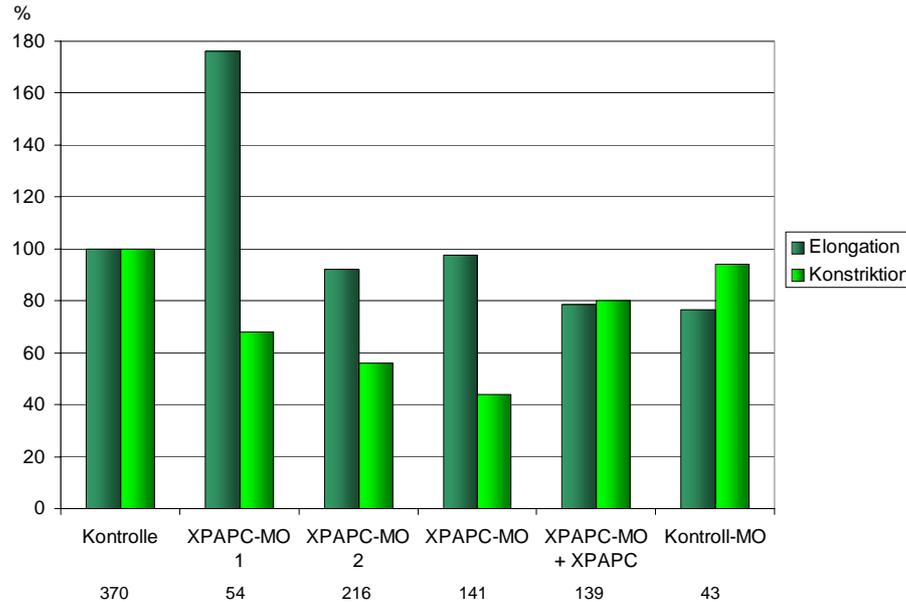


Abb. III-12: Die Hemmung von XPAPC durch Injektion von spezifischen Morpholinos hemmt selektiv die Konstriktion. XPAPC-MO ist eine Mischung aus XPAPC-MO 1 und XPAPC-MO 2 im Verhältnis 1:1. Sämtliche Morpholinos wurden in einer Stoffmenge von 0,8 pmol eingesetzt, XPAPC-mRNA wurde in einer Konzentration von 500 pg coinjiziert. Die dunkelgrünen Balken repräsentieren den Anteil der vollständig elongierten Explantate, der Anteil der Explantate, die Konstriktion aufwiesen, ist durch die hellgrünen Balken dargestellt.

2.1 XPAPC ist erforderlich für koordinierte Zellpolarität

Unter Verwendung des XPAPC-MO wurde die Funktionsweise von XPAPC bei der konvergenten Extensionsbewegung näher analysiert. Die Schlussfolgerung, dass die fehlende Verschmälerung der Explantate eine Folge von beeinträchtigter Konstriktion war, wurde bestätigt durch *in situ* Hybridisierungen, die zeigten, dass das Expressionsmuster von Chordin als Markergen für das axiale sowie von XPAPC als Markergen für das paraxiale Mesoderm bei Hemmung von XPAPC deutlich verbreitert war. Dies war keine Folge von gesteigerter Zellproliferation, wie Immunfärbungen auf phospho-H3 zur Bestimmung der Häufigkeit von Zellteilungen sowie DAPI-Färbung zur Bestimmung der Gesamtzellzahl zeigten.

Mittels *time lapse*-Videoaufnahmen an Keller-Explantaten wurde festgestellt, dass die Zellen des einwandernden Mesoderms bei Hemmung von XPAPC nicht in der Lage waren, auf koordinierte Art und Weise bipolare Zellpolarität anzunehmen, was eine Grundvoraussetzung für konvergente Extensionsbewegung darstellt. Infolge dessen war die Bewegung der Zellen nicht auf die dorsale Mittellinie hin gerichtet sondern verlief in zufälliger Richtung. Dies zeigte, dass XPAPC bedeutend für eine koordinierte Zellpolarität und gerichtete Wanderung des mesodermalen Gewebes ist. Die Beobachtung, dass XPAPC vor allem an den medialen und lateralen Enden der Zellen lokalisiert war, führte zu der Annahme, dass die asymmetrische subzelluläre Lokalisation möglicherweise ein Signal für die Zellen zur koordinierten Zellbewegung darstellt.

Die diesen Erkenntnissen zugrunde liegenden Versuche wurden von A. Schambony und J. Hefele durchgeführt und sind in Unterseher *et al.* (2004) veröffentlicht.

2.2 XPAPC ist nicht Bestandteil des Wnt/PCP-Signalwegs

Die beobachteten Defekte waren denen ähnlich, die in Augen und Flügeln von *Drosophila* auftreten, wenn der *planar cell polarity*-Signalweg inhibiert wird (Axelrod *et al.* 1998). Dies lässt vermuten, dass XPAPC Zellpolarität über den zum *Drosophila* PCP-Signalweg homologen Wnt/PCP-Signalweg der Vertebraten koordiniert, was anhand von Keller-Explantaten überprüft wurde. Hierzu wurde der Wnt/PCP-Signalweg durch Injektion von 4 pmol Frizzled 7-MO gehemmt, was wie bereits in Abb. III-8 dargestellt, bei fast zwei Dritteln der vollständig elongierten Explantate eine Hemmung der Konstriktion zur Folge hatte. Bei Richtigkeit der Vermutung, dass XPAPC Zellpolarität über den Wnt/PCP-Signalweg koordiniert, müsste aktives XPAPC in der Lage sein, diesen Effekt wieder aufzuheben.

Es war jedoch nicht möglich, eine Wiederherstellung der Konstriktion durch Coinjektion von 500 pg XPAPC zu erreichen. Dagegen führte die Aktivierung von Genen, bei denen eine Frizzled 7-abhängige Aktivierung bekannt ist, zu einer deutlichen Verbesserung der Konstriktionsfähigkeit. Eine Behandlung des Mediums mit 200 nM PMA, einem Aktivator der Frizzled 7-abhängigen Kinase PKC, führte zu einer teilweisen Wiederherstellung von Konstriktion in den Explantaten. Coinjektion von Dsh Δ DIX, einer Dishevelled-Mutante, der die DIX-Domäne fehlt und die selektiv den Wnt/PCP-Weg aktiviert, stellte die Wildtyp-Situation nahezu vollständig wieder her. Auf die Elongation der Explantate hatte die zusätzliche Zugabe von Aktivatoren von Komponenten, die in Signalkaskaden unterhalb von Fz 7 involviert sind, allerdings eher negative Auswirkung.

Parallel dazu wurde versucht, die durch Injektion des XPAPC-Morpholinos ausgelöste Hemmung der Konstriktion durch Coinjektion von 500 pg Xfz 7, von 500 pg Dsh Δ DIX sowie durch Zugabe von 200 nM PMA ins Medium aufzuheben. Es wurde jedoch festgestellt, dass dies eher den gegenteiligen Effekt hatte. Es wurde sowohl eine Hemmung der Elongation als auch eine Hemmung der Konstriktion, verglichen mit den Morpholino-injizierten Exemplaren, festgestellt. Die Fähigkeit zur Konstriktion, die bei Injektion des XPAPC-Morpholinos noch bei 50 % der elongierten Explantate festgestellt wurde, lag bei Coinjektion von Fz 7 bei 30 % und ging bei Zugabe von PMA auf 15 % zurück. Wurde Dsh Δ DIX coinjiziert, starben die Embryonen bereits vor Erreichen des Gastrulastadiums.

Die Auswirkungen sämtlicher Coinjektionen zur Überprüfung, ob es sich bei XPAPC um eine Komponente des Wnt/PCP-Signalwegs handelt, sind in Abb. III-13 zusammengefasst.

Es wurde deutlich, dass sowohl XPAPC als auch Fz 7 die Konvergenz in Keller-Explantaten steuern. Allerdings war es nicht möglich, die Effekte durch Hemmung der einen Komponente durch Aktivierung der anderen aufzuheben, was bedeutet, dass diese beiden Proteine nicht im selben Signalweg aktiv sind.

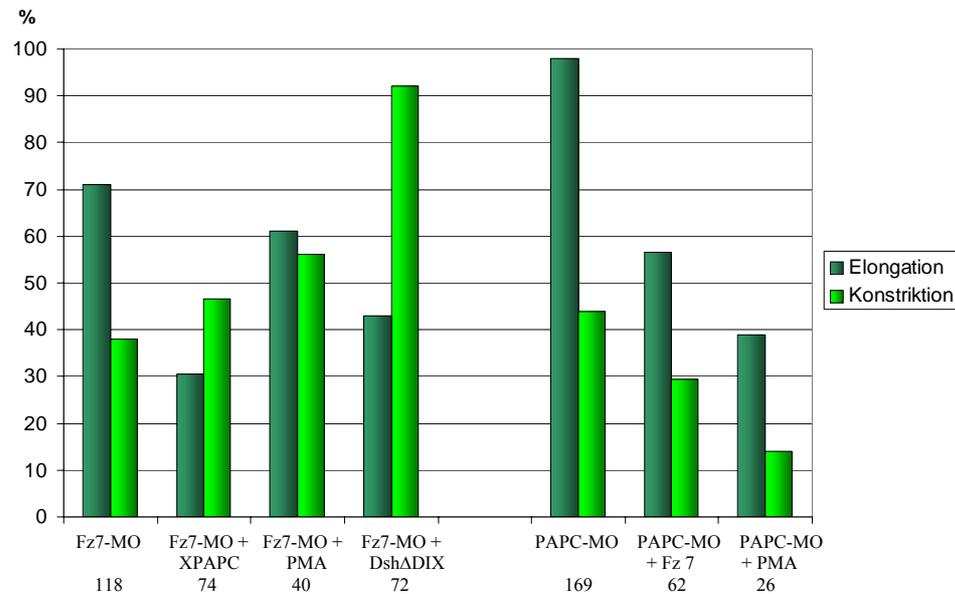


Abb. III-13: XPAPC und Fz 7 sind nicht im selben Signalweg aktiv.

Die injizierten mRNA-Mengen betragen: Fz 7: 500 pg, DshΔDIX: 500 pg, XPAPC: 500 pg. Es wurden 4 pmol Fz 7-MO sowie 0,8 pmol XPAPC-MO injiziert. PMA wurde in einer Konzentration von 200 nM ins Medium gegeben, in dem die Explantate kultiviert wurden. Elongation (dunkelgrün) und Konstriktion (hellgrün) wurden jeweils im Verhältnis zur uninjizierten Kontrolle, die auf 100 % normiert wurde, angegeben

2.3 XPAPC koordiniert Zellpolarität über RhoA und JNK

Um eventuelle Auswirkungen von XPAPC auf Komponenten des Wnt/PCP-Wegs zu untersuchen, wurden von A. Schambony und C. Winter Immunpräzipitationen durchgeführt. Dabei war XPAPC in der Lage, endogenes RhoA sowie JNK zu aktivieren, während Überexpression des Protocadherins auf Rac 1 einen hemmenden Einfluss hatte. Auf die Aktivität von Cdc 42, der dritten kleinen GTPase, der eine Bedeutung im Wnt/PCP-Signalweg in *Xenopus* zugeschrieben wird, hatte XPAPC keinen Einfluss. Weiterhin wurde festgestellt, dass Überexpression von RhoA JNK zu aktivieren vermochte, was vermuten lässt, dass JNK innerhalb dieses über XPAPC aktivierten Signalwegs unterhalb von RhoA liegt. Diese Ergebnisse wurden mittels Keller-Explantaten bestätigt. Wie aus Abb. III-14 ersichtlich ist, hatte Coinjektion des konstitutiv aktiven RhoA-Konstrukts RhoA-V14 mit dem XPAPC-Morpholino eine Wiederherstellung der Konstriktion in Keller-Explantaten zur Folge. Coinjektion des dominant negativen RhoA-Konstrukts RhoA-N19 hatte den gegenteiligen Effekt. Konstitutiv aktives sowie dominant negatives Rac 1 hatte in diesem Zusammenhang keinen Einfluss auf die Konstriktion, jedoch hatte Coinjektion der Konstrukte in beiden Fällen eine Reduktion der Elongation zur Folge.

Coinjektion eines konstitutiv aktiven Konstrukts des JNK-Aktivators MKK 7 führte zu einer teilweisen Wiederherstellung der Konstriktion, während dieser Effekt bei Coinjektion von JNK nahezu vollständig war und sogar noch zu einer Verbesserung führte, wenn JNK und konstitutiv aktives RhoA zusammen mit XPAPC-MO injiziert wurde.

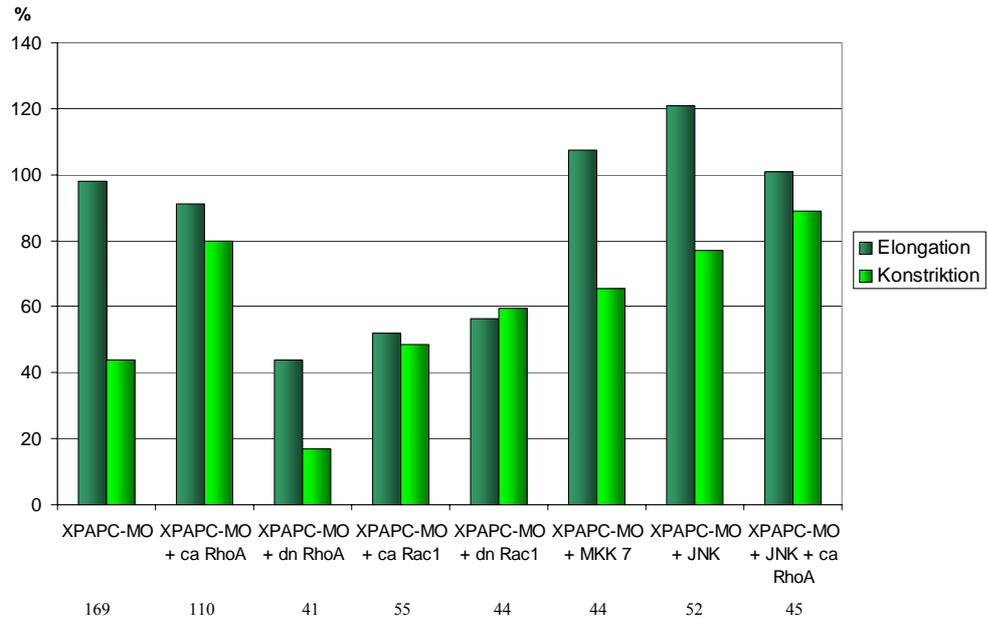


Abb. III-14: XPAPC koordiniert Zellpolarität über RhoA und JNK.

Es wurde mRNA in folgender Konzentration injiziert: dn RhoA: 100 pg, dn Rac 1: 100 pg, JNK: 500 pg. Von folgenden Konstrukten wurde DNA injiziert: ca RhoA: 2,5 pg, ca Rac 1: 5 pg, MKK 7: 25 pg. XPAPC-MO wurde in einer Stoffmenge von 0,8 pmol eingesetzt

3 Wechselwirkungen zwischen Wnt/PCP- und kanonischem Wnt-Signalweg

3.1 Existiert ein linearer Zusammenhang zwischen den beiden Wegen?

Die in Kapitel 1 vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass sowohl Überaktivierung als auch Inhibierung des Wnt/PCP-Signalwegs negative Auswirkungen auf die konvergente Extensionsbewegung in *Xenopus* haben. Dieser Signalweg wird in *Xenopus* wie auch in anderen Vertebraten über den Liganden Wnt-11 aktiviert. Untersuchungen von Tada & Smith (2000) identifizierten XWnt-11 in *Xenopus* als direktes Zielgen des Transkriptionsfaktors Xbra, der als Mesoderminduktor fungiert und auch eine positive Rolle bei konvergenter Extensionsbewegung spielt.

Neben dem Wnt/PCP-Signalweg ist auch der kanonische Wnt-Signalweg essentiell für konvergente Extensionsbewegung in *Xenopus*, indem über den Transkriptionsfaktor XLeF-1 das zur TGF β -Superfamilie gehörige Xnr-3 aktiviert wird (Kühl *et al.* 2001).

In der Publikation von Yokota *et al.* (2003) wurde postuliert, dass Xbra über Xnr-3 aktiviert wird. Fasst man die Erkenntnisse von Tada & Smith und Yokota *et al.* zusammen, so führt dies zur Vermutung, dass XWnt-11 und damit auch der Wnt/PCP-Signalweg unterhalb von Xnr-3 liegt und dieser Signalweg somit über den kanonischen Wnt-Signalweg aktiviert wird. Auch Erkenntnisse aus Zebrafisch deuten darauf hin, dass die zu Xnr-3 homologen Gene Cyclops und Squint Aktivatoren für Wnt-11 darstellen (Myers *et al.* 2002b).

Somit stellt sich die Frage, ob tatsächlich ein derartiger linearer Zusammenhang zwischen dem Wnt/ β -Catenin- und dem Wnt/PCP-Signalweg besteht.

3.2 Die Expression von XWnt-11 wird durch Hemmung von XLeF-1 bzw. Xnr-3 nicht beeinflusst

3.2.1 RT-PCR ermöglicht Messung von Genexpression

Bei der Aufklärung, welche Faktoren einen Einfluss auf die Expression eines Gens innerhalb von Signalkaskaden haben, ist RT-PCR ein gebräuchliches Verfahren. Durch sie wird ermöglicht, mRNA gesuchter Gene im Anschluss an eine Reverse Transkription zu detektieren und zu amplifizieren, was Rückschlüsse über die Aktivität des Gens zulässt.

Für die folgenden Versuche fand Echtzeit-RT-PCR Verwendung. Echtzeit-PCR besitzt gegenüber der herkömmlichen PCR eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit. Auf diese Art können bereits kleinste DNA- bzw. RNA-Mengen detektiert werden. Darüber hinaus ist eine Quantifizierung der DNA-Ausgangsmenge mittels herkömmlicher PCR aufwändig und ungenau, wohingegen mit Echtzeit-PCR die Möglichkeit gegeben ist, die DNA-Ausgangsmenge relativ und absolut zu bestimmen. Ein weiterer Vorteil der Echtzeit-PCR liegt darin, dass der Verlauf der PCR-Reaktion zeitgleich aufgezeichnet wird und am Monitor verfolgt werden kann. Die Menge an amplifizierter DNA wurde mittels des

Fluoreszenzfarbstoffes Sybr Green bestimmt, der sich unspezifisch in doppelsträngige DNA einlagert und dabei ein Fluoreszenzsignal emittiert.

Zur relativen Quantifizierung der mRNA-Ausgangsmenge ist der so genannte *threshold* von Bedeutung, der angibt, nach wie vielen PCR-Zyklen ein erster messbarer Anstieg der Fluoreszenz beobachtet wird. Eine Absenkung des *thresholds* um einen Zyklus zeigt eine um das doppelte erhöhte mRNA-Ausgangsmenge an. Für die Vergleichbarkeit der Proben ist eine zusätzliche Kontrollreaktion für jedes zu testende Gen erforderlich, bei der ein Vergleichsgen amplifiziert wird, das ubiquitär in der Zelle vorhanden ist und nachweislich nicht durch die Injektion beeinflusst wird. Dieses Gen sollte in allen Proben etwa gleich stark exprimiert sein. Vor dem eigentlichen Versuch wurde zunächst die Zuverlässigkeit der Echtzeit-RT-PCR-Analyse anhand eines Beispielversuchs mit drei verschiedenen Konzentrationen des Vergleichsgens Aktin überprüft. Die Aufzeichnung des Verlaufs der PCR-Reaktion ist in Abb. III-15 zu sehen.

Hierfür wurde zunächst die Gesamt-RNA aus uninjizierten Kontrollembryonen im Stadium 10,25 präpariert. Da ribosomale und Transfer-RNA, die mehr als 95 % der RNA-Menge der Zelle ausmachen, den Verlauf der Echtzeit-PCR stören können, wurde die mRNA unter Verwendung von Oligo-(dT)₂₅-Dynabeads aus der Gesamt-RNA isoliert. Nach Umschreiben der mRNA in cDNA und anschließender Aufreinigung der cDNA wurde die PCR-Reaktion durchgeführt. Hierfür wurde die cDNA-Lösung in den Verdünnungen 1:5, 1:25 sowie 1:125 als DNA-Matrize für die Amplifikation eingesetzt. Von jeder Konzentration wurden drei Parallelansätze pipettiert, damit eventuelle „Ausreißer“ nicht zur Verfälschung der Ergebnisse führen. Die Negativkontrolle enthielt sämtliche Komponenten des PCR-Ansatzes mit Ausnahme der DNA. Sie ist wichtig, um Kontaminationen der übrigen Bestandteile des PCR-Ansatzes auszuschließen.

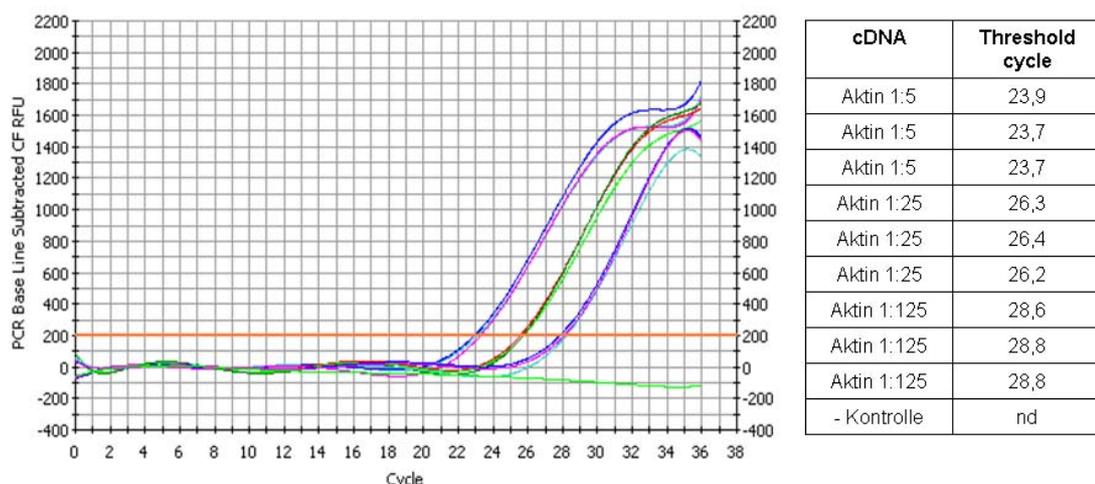


Abb. III.15: Aufzeichnung des Tests zur Zuverlässigkeit der Echtzeit-RT-PCR.

Auf der x-Achse ist die Anzahl der absolvierten PCR-Zyklen, auf der y-Achse die detektierte Fluoreszenz als Maß für DNA-Amplifikation aufgetragen. Die exponentiellen Kurven zeigen die Amplifikation der DNA an, der *threshold cycle* ist als orangefarbene Linie markiert. In der Tabelle rechts ist der Zeitpunkt angegeben, an dem die Fluoreszenz der jeweiligen Probe über den *threshold* ansteigt. Für diesen Versuch wurde die cDNA-Ausgangslösung um den Faktor 5, 25 sowie 125 verdünnt. nd (*not detectable*) besagt, dass die Fluoreszenz zu keinem Zeitpunkt der PCR-Reaktion über den *threshold* anstieg.

Im Idealfall sollte eine um das fünffache reduzierte Konzentration zu einer Erhöhung des *thresholds* um $\log_2 5 = 2,3$ führen. Die ermittelten Werte lagen mit 2,5 zwischen den Verdünnungen 1:5 und 1:25 sowie mit 2,4 zwischen den Verdünnungsstufen 1:25 und 1:125 recht nahe an diesem Idealwert. Die Negativkontrolle zeigte keinerlei Amplifikation.

Ein Nachteil bei der Verwendung von Sybr Green besteht in seiner fehlenden Spezifität, so dass unspezifische Produkte wie Primerdimere ebenfalls ein Ansteigen der Fluoreszenz verursachen. Aufgrund der Tatsache, dass ein spezifisches DNA-Fragment eine genau definierte Schmelztemperatur besitzt, die vom GC-Gehalt sowie von seiner Länge abhängt, wurde im Anschluss an die PCR-Reaktion eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Dadurch wird eine Aussage über die Natur des amplifizierten Fragments ermöglicht. Eine Schmelzpunktanalyse ist zum Beispiel dann hilfreich, wenn auch in der Negativkontrolle ein Anstieg der Fluoreszenz auftritt.

3.2.2 Untersuchung der XWnt-11-Expression mittels RT-PCR

Um zu überprüfen, ob kanonischer und Wnt/PCP-Signalweg innerhalb einer linearen Kaskade agieren, wurde zunächst untersucht, ob Hemmung des kanonischen Wnt-Signalwegs durch Injektion eines spezifischen XLef-1- sowie Xnr-3-Morpholinos eine Auswirkung auf die Genexpression von XWnt-11 hatte. Die Funktionalität und Spezifität der Morpholinos wurde an anderer Stelle experimentell belegt (XLef-1: Albert 2004; Xnr-3: diese Arbeit – Kapitel 4). Im Fall von XLef-1 wurde analog zu XPAPC eine Kombination aus XLef-1-MO 1 und XLef-1-MO 2 im Verhältnis 1:1 eingesetzt.

Es wurden 4 pmol XLef-1-Morpholino bzw. 2 pmol Xnr-3-Morpholino in die beiden dorsalen Blastomeren im Vierzellstadium injiziert. In zwei weiteren Ansätzen wurden als Kontrollen 1 pmol XWnt-11-MO sowie 16 pg XWnt-11-mRNA injiziert. Nach Erreichen des Gastrulastadiums wurden von den injizierten Ansätzen sowie der uninjizierten Kontrolle jeweils 50 Embryonen abgesammelt und deren Gesamt-RNA isoliert. Nach Präparation der mRNA wurde diese in cDNA umgeschrieben, die nach einer Aufreinigung als Matrize für die Echtzeit-RT-PCR zur Amplifikation von XWnt-11 eingesetzt wurde. Hierfür wurden die cDNA-Lösungen 1:5 verdünnt. Von jedem Ansatz wurden Duplikate angefertigt. Als Kontrollgen diente Aktin.

Um eine Aussage darüber zu ermöglichen, in welcher Weise die Injektionen die Expression von XWnt-11 beeinflussen, wurde sowohl für die uninjizierte Kontrollprobe als auch für die injizierten Proben das Verhältnis V der RNA-Ausgangsmengen zwischen Aktin und XWnt-11 nach folgender Formel bestimmt:

$$V = 2^{(\text{threshold}(\text{Aktin}) - \text{threshold}(\text{XWnt-11}))}$$

Die Genexpression der uninjizierten Kontrollprobe wurde auf 100 % normiert. Anschließend wurde für alle Proben der Quotient $V(\text{uninjiziert}):V(\text{injizierte Probe})$ bestimmt, woraus man die Genexpression in den injizierten Proben relativ zur uninjizierten Kontrollprobe erhielt.

Wie erwartet hatte die Injektion von XWnt-11 einen starken Anstieg der XWnt-11-mRNA Menge zur Folge, da die injizierte mRNA im Verlauf der PCR-Reaktion mit amplifiziert wurde. Allerdings hatte weder die Injektion des XLef-1-Morpholinos noch die Injektion des

Xnr-3-Morpholinos einen Einfluss auf die XWnt-11-Expression. Interessant war die Feststellung, dass eine Hemmung der Translation von XWnt-11 durch Einsatz eines gegen dieses Gen gerichteten Morpholinos ebenfalls einen Anstieg der mRNA-Menge bewirkt.

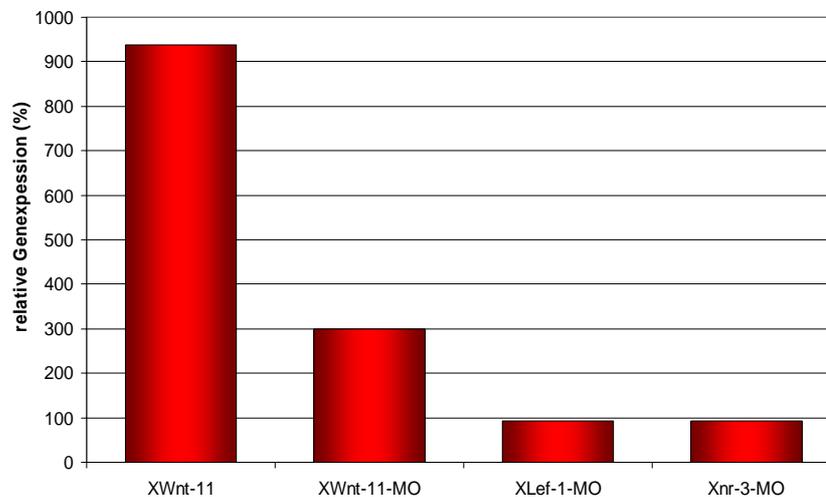


Abb. III-16: Hemmung des kanonischen Wnt-Signalwegs hat keinen Einfluss auf die XWnt-11-Expression. Injiziert wurden 16 pg XWnt-11-mRNA, 1 pmol XWnt-11-MO, 4 pmol XLeF-1-MO sowie 2 pmol Xnr-3-MO. Das Diagramm zeigt die relative XWnt-11-Genexpression, die mittels Echtzeit-RT-PCR ermittelt wurde. Die Genexpression wurde relativ zur uninjizierten Kontrolle angegeben, die auf 100 % normiert wurde.

3.3 XWnt-11 kann Hemmung des kanonischen Wnt-Signalwegs nicht ausgleichen

Die Ergebnisse aus der Echtzeit-RT-PCR deuten darauf hin, dass XLeF-1 sowie dessen Zielgen Xnr-3 keinen Einfluss auf die Expression von XWnt-11 haben.

Um dies zu überprüfen, wurden so genannte ‚Rescueexperimente‘ durchgeführt. Dabei macht man sich den Sachverhalt zu nutze, dass eine Deaktivierung eines Signalwegs auf einer Ebene dadurch aufgehoben werden kann, dass die Kaskade auf einer unterhalb gelegenen Ebene wieder aktiviert wird.

Läge der Wnt/PCP-Signalweg unterhalb des kanonischen Wnt-Signalwegs, so müsste eine Hemmung der konvergenten Extensionsbewegung bei Inhibierung von XLeF-1 bzw. Xnr-3 durch Coinjektion von XWnt-11 in geringer Konzentration wieder aufgehoben werden. Da XWnt-11 selbst bei Überaktivierung die konvergente Extensionsbewegung negativ beeinflusst, besteht die Schwierigkeit bei diesem Experiment darin, die richtige Konzentration für die Injektion von XWnt-11-mRNA zu finden.

Zunächst wurde XWnt-11 zusammen mit einem Morpholino coinjiziert, das spezifisch die Translation von Xnr-3 reprimiert. Das Morpholino wurde in einer Konzentration von 2 pmol eingesetzt, die XWnt-11-Konzentration wurde im Bereich zwischen 4 pg und 500 pg variiert.

Die Injektion von XWnt-11 hatte in keiner der eingesetzten Konzentrationen einen positiven Effekt auf die Elongation der Explantate. Anstelle einer Verbesserung war eher eine stärkere Hemmung der Elongation der Explantate festzustellen, wenn XWnt-11 coinjiziert wurde. In einem weiteren Ansatz wurde der kanonische Wnt-Signalweg auf der Ebene der Lef/TCF-

Transkriptionsfaktoren durch Injektion eines spezifischen XLeF-1-Morpholinos gehemmt. Eine Coinjektion von 4 pg bis zu 32 pg XWnt-11 mRNA zusammen mit 4 pmol des Morpholinos erbrachte ebenfalls keinerlei Verbesserung der Elongation in den Explantaten (Abb. III-17).

Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate aus der PCR-Analyse und sprechen dagegen, dass XWnt-11 innerhalb einer linearen Signalkaskade unterhalb von Xnr-3 agiert.

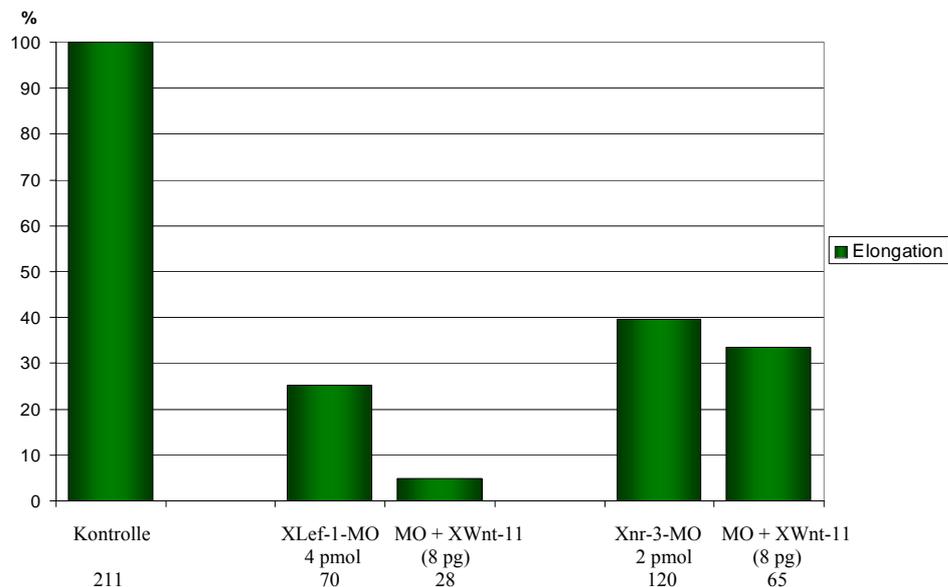


Abb. III-17: XWnt-11 kann die Elongation von Keller-Explantaten nicht „retten“.

Coinjektion von XWnt-11-mRNA war nicht in der Lage, die Elongation von Keller-Explantaten nach Injektion eines spezifischen XLeF-1- bzw. Xnr-3-Morpholinos wieder herzustellen. Die Balken zeigen den Anteil der vollständig elongierten Explantaten relativ zur uninjizierten Kontrolle an.

3.4 kanonischer und Wnt/PCP-Signalweg beeinflussen sich gegenseitig

Um zu überprüfen, ob sich Wnt/PCP- und kanonischer Wnt-Signalweg gegenseitig beeinflussen, wurde versucht, eine Hemmung der Elongation bei XWnt-11-Überexpression durch Coinjektion von verschiedenen Komponenten des kanonischen Wnt-Signalwegs aufzuheben. Zur Analyse, wie sich die Injektionen auf konvergente Extensionsbewegung auswirkt, wurden Keller-Explantate herangezogen.

Zunächst wurde überprüft, ob eine Überexpression des kanonischen Wnt-Signalwegs mittels Injektion von 100 pg XWnt-8-, 500 pg β -Catenin-, 500 pg XLeF-1- sowie 500 pg Xnr-3-mRNA einen Einfluss auf die konvergente Extensionsbewegung zeigte. Dies war nicht der Fall.

Alleinige Injektion von 8 bzw. 16 pg XWnt-11 hatte, wie bereits gezeigt, eine starke Hemmung der Elongation der Explantate zur Folge. Injektion von XWnt-8 bzw. β -Catenin zusammen mit XWnt-11 führte nahezu zur Wiederherstellung der Situation im Wildtyp. Die besten Ergebnisse erbrachten Coinjektionen von 100 pg XWnt-8 mit 16 pg XWnt-11 bzw. 500 pg β -Catenin mit 8 pg XWnt-11. Dagegen wurde durch Coinjektion von XLeF-1 sowie Xnr-3 bei keiner der getesteten XWnt-11-Konzentrationen eine Verbesserung der Elongation der Explantate erreicht. Diese Ergebnisse sind in Abb. III-18 zusammengefasst.

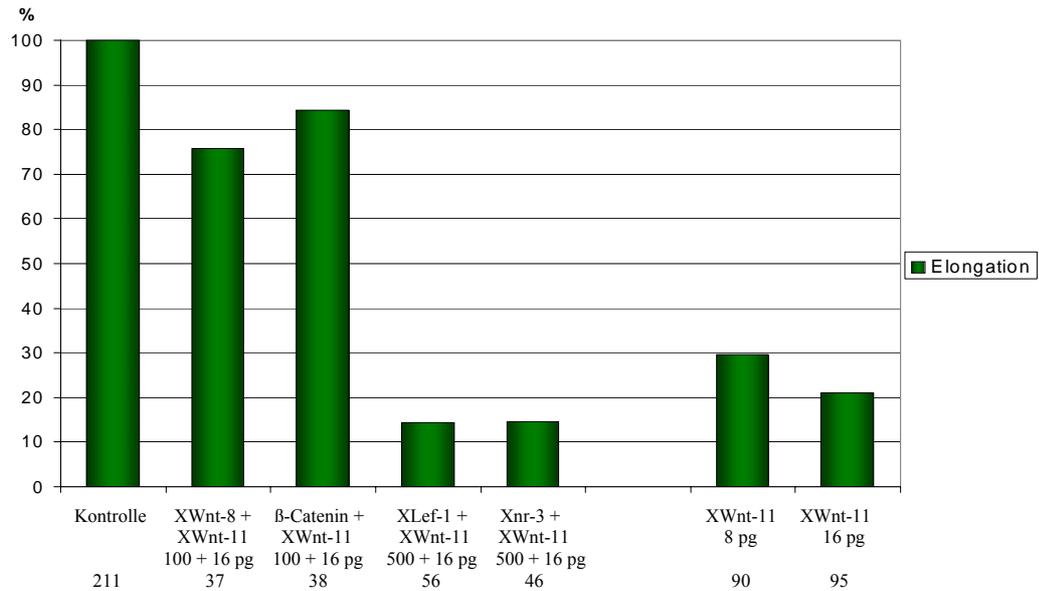


Abb. III-18: Wnt/PCP- und kanonischer Wnt-Signalweg interagieren.

Coinjektion von XWnt-8 bzw. β -Catenin zusammen mit XWnt-11 war in der Lage, konvergente Extension in Keller-Explantaten wieder herzustellen. Coinjektion von XLef-1 sowie Xnr-3 hatte jedoch im Vergleich zur alleinigen Injektion von XWnt-11 keinen positiven Einfluss auf die Elongation der Explantate zur Folge.

Die Tatsache, dass Überaktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs die Hemmung der konvergenten Extension bei Überaktivierung des Wnt/PCP-Signalwegs aufzuheben vermochte, spricht dafür, dass sich die beiden Signalwege gegenseitig beeinflussen.

4 *Xenopus nodal related (Xnr-) 3*

Wie Untersuchungen von Kühl *et al.* (2001) sowie Yokota *et al.* (2003) ergaben, fördert der kanonische Wnt-Signalweg konvergente Extension über Aktivierung des Zielgens Xnr-3. Die Annahme, dass Xnr-3 diese Funktion durch Aktivierung von XWnt-11 und somit des Wnt/PCP-Signalwegs bewerkstelligt, konnte, wie die Ergebnisse aus Kapitel 3 zeigen, nicht bestätigt werden. Somit stellt sich die Frage, auf welche Weise und über welche Zielgene Xnr-3 konvergente Extension fördert.

Um Analysen zur Funktion und Regulation von Xnr-3 im Rahmen dieser Arbeit durchzuführen, wurde ein aus 25 Nukleotiden bestehendes Morpholino-Oligonukleotid entworfen, das Xnr-3 im Bereich des Startcodons bindet. Als Kontrollmorpholino wurde das Xnr-3 mis-Morpholino eingesetzt, dessen Sequenz im Vergleich zum Xnr-3 Morpholino vier Abweichungen aufwies, wodurch die Bindung an die Xnr-3 mRNA nicht mehr gewährleistet sein sollte.

Xnr-3-MO	3'-GGTCTCTACCGTAAAGACTTGGACA-5'
Xnr-3	5'-TTTGCAGGATCCCCAGAGATGGCATTCTGAACCTGTTC-3'
Xnr-3-mis-MO	3'-GGTCACTACGGTAAACAACCTTCGACA-5'

Abb. III-19: Sequenzen der verwendeten Xnr-3-Morpholinos:

Xnr-3-MO sowie Xnr-3-mis-MO sind komplementär zur Xnr-3-Sequenz im Bereich des Startcodons, welches rot markiert ist. Das mis-MO weicht in vier Basen vom Morpholino ab. Die veränderten Basen sind blau hervorgehoben.

4.1 Charakterisierung des Xnr-3 Morpholinos

Bei Verwendung eines bislang noch nicht charakterisierten Morpholinos ist es erforderlich, die Funktionalität sowie die Spezifität des Morpholinos nachzuweisen.

4.1.1 Injektion des Xnr-3 Morpholinos führt zu charakteristischen Defekten

Zunächst wurde analysiert, welche phänotypischen Auswirkungen die Hemmung von Xnr-3 durch Injektion des spezifischen Morpholinos zeigt. Hierzu wurde das Morpholino in unterschiedlicher Konzentration in die dorsale Marginalzone der beiden dorsalen Blastomeren im Vierzellstadium injiziert. Die Embryonen wurden anschließend bei einer Temperatur von 16°C inkubiert und nach 48 Stunden eine Analyse der Phänotypen vorgenommen. Die uninjizierten Embryonen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im Stadium 26. Phänotypische Auswirkungen waren ab einer injizierten Stoffmenge von 0,8 pmol des Morpholinos festzustellen. Das Ausmaß der Defekte steigerte sich mit Erhöhung der Konzentration.

Allerdings wiesen die Embryonen, die auf gleiche Weise und in vergleichbarer Konzentration mit dem Xnr-3-mis-Morpholino injiziert wurden, ebenfalls Defekte auf. Die meisten dieser Embryonen zeigten offene Rücken, ein Phänotyp, der auf eine Störung von Gastrulationsbewegungen und damit verbundener Desorganisation dorsaler Strukturen zurückzuführen sein kann. Daher war das mis-Morpholino als Kontrolle zum Nachweis der Funktionalität und Spezifität des Morpholinos ungeeignet. So wurde als Negativkontrolle auf das XLeF-1-mis-Morpholino zurückgegriffen, das analog zum Xnr-3-mis-Morpholino von der

XLef-1-Sequenz in vier Basen abwich. Dieses Oligonukleotid zeigte selbst bei Injektion der unverdünnten 1 mM Ausgangslösung, was einer Stoffmenge von 8 pmol entspricht, keinerlei phänotypische Auswirkungen.

Eine Zusammenfassung der Häufigkeit der beobachteten phänotypischen Abweichungen vom Wildtyp-Zustand bei Injektion verschiedener Morpholino-Konzentrationen gibt Tabelle III-2:

Tabelle III-2: Phänotypische Auswirkungen der Injektion eines Xnr-3-Morpholinos

Stoffmenge	Anzahl	Normal (%)	Offene Rücken (%)	Posteriorisiert + verkürzt (%)	Sonstige (%)
0,8 pmol	45	84,4	4,4		11,1
2 pmol	48	43,8	37,5	12,5	6,3
4 pmol	116	7,8	23,3	69,0	
8 pmol	46		45,7	54,4	
4 pmol + 500 pg Xnr-3	41	70,7	26,8	2,4	

Wurde das Morpholino in einer Konzentration von 0,8 pmol eingesetzt, hatte dies schwache phänotypische Auswirkungen zur Folge, die bei etwa 15 % der Embryonen festgestellt wurden, jedoch in einigen Fällen nicht genau zugeordnet werden konnten. Mit steigender Morpholino-Konzentration traten immer häufiger charakteristische Störungen auf, die auf eine Beeinträchtigung von Gastrulationsbewegungen schließen ließen. Bei vielen der injizierten Embryonen waren offene Rücken feststellbar. Daneben trat in vielen Fällen eine Verkürzung der Körperachse auf, was ein Hinweis auf eine gestörte konvergente Extensionsbewegung ist. Eine Verkürzung der Körperachse ging in der Regel mit einem teilweisen bis vollständigen Verlust der anterioren Strukturen einher. Wurden 4 pmol Morpholino zusammen mit 500 pg Xnr-myc mRNA coinjiziert, so führte dies bei der Mehrzahl der Embryonen zur Wiederherstellung des Wildtyp-Zustandes.

Abb. III-20 zeigt einen Embryo, der diesen charakteristischen Phänotyp aufweist im Vergleich mit einem uninjizierten Kontrollembryo.

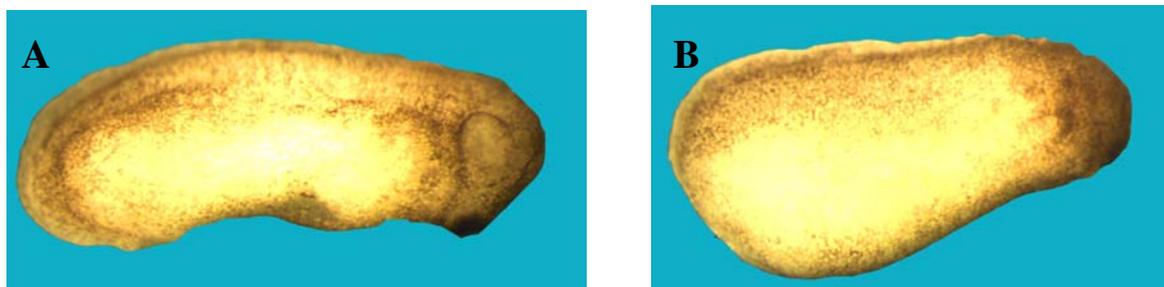


Abb. III-20: Phänotypische Auswirkungen der Xnr-3-Morpholino-Injektion.

Die Embryonen wurden für 48 Stunden bei 16°C inkubiert und anschließend die Phänotypen analysiert.

A: uninjizierter Embryo; Stadium 26. B: Embryo, in den dorsal 4 pmol Xnr-3-MO injiziert wurden. Die antero-posteriore Körperachse ist verkürzt. Daneben ist ein Verlust von anterioren Strukturen erkennbar.

4.1.2 Das Xnr-3-Morpholino blockiert die Translation von exogenem Xnr-3

Um die Funktionalität des Morpholinos *in vitro* zu überprüfen, wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Da kein Antikörper zur Verfügung stand, um die Wirkung des Morpholinos auf endogenes Xnr-3 nachzuweisen, wurde mRNA eines Xnr-3-Konstrukts (Xnr-3-myc) injiziert, bei dem an das C-terminale Ende des Gens ein myc-Epitop angefügt wurde. Das exogene Protein wurde mittels des gegen das Epitop gerichteten Antikörpers 9E10 detektiert.

Um nachzuweisen, dass das Morpholino spezifisch die Translation des exogenen Xnr-3 blockierte, wurden zum einen 500 pg Xnr-3-myc injiziert. Daneben wurde die mRNA zusammen mit 4 pmol Xnr-3-MO bzw. mit dem Kontrollmorpholino coinjiziert. Als Negativkontrolle dienten uninjizierte Embryonen. Die Embryonen wurden nach Erreichen des Gastrulastadiums abgesammelt und lysiert. Die in dem Lysat vorhandenen Proteine wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, mittels Westernblot auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen und das Xnr-3-myc-Protein immunologisch nachgewiesen.

Die detektierten Banden sind in Abb. III-21 A dargestellt und entsprechen in etwa der Größe des unprozessierten Xnr-3-Proteins inklusive eines myc-Epitops, die mit 64 kDa angegeben wurde (Hansen Ezal *et al.* 2000). Während Coinjektion des Kontrollmorpholinos die Translation der injizierten Xnr-3-mRNA nicht reprimierte, wurde bei Coinjektion des Morpholinos die Proteinexpression von Xnr-3 wie erwartet deutlich gehemmt. Als Ladungskontrolle wurde das ubiquitär exprimierte, 80 kDa große Kernprotein *Xenopus nuclear factor* (Xnf) 7 mit dem Antikörper b6-2A12 detektiert. Wie Abb. III-21 B zeigt, war in allen Spuren in etwa die gleiche Proteinmenge aufgetragen.

Somit wurde gezeigt, dass das Morpholino *in vitro* in der Lage ist, die Translation von Xnr-3 zu inhibieren, während das Kontrollmorpholino die Expression von Xnr-3 nicht beeinflusst.

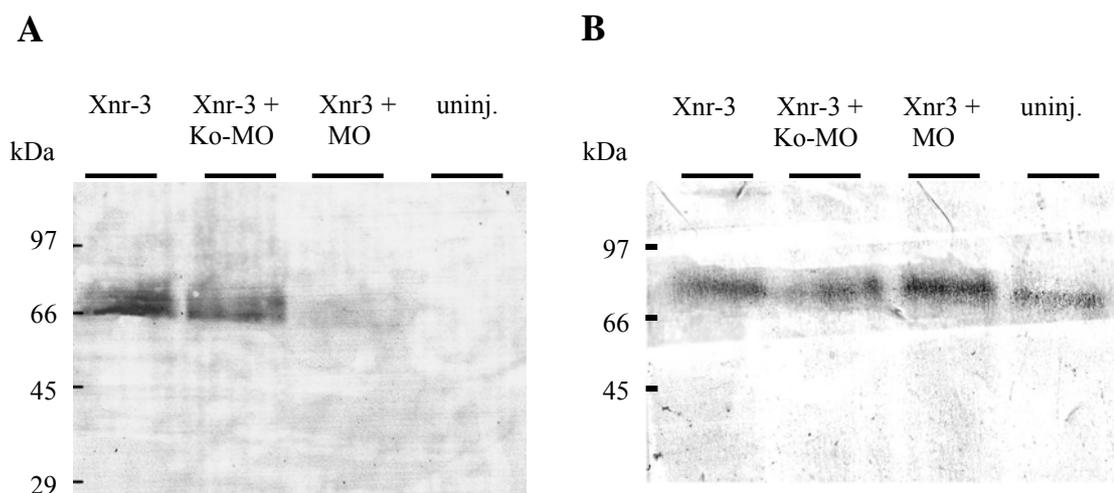


Abb. III-21: Injektion des Xnr-3-Morpholinos hemmt spezifisch die Translation von exogenem Xnr-3.

Die Auswirkung der Morpholino-Injektion auf die Xnr-3-Proteinexpression wurde mittels Westernblot analysiert. Als Größenstandard wurde der Marker SDS-6H von Sigma eingesetzt. Die injizierten Mengen betragen: Xnr-3-myc-mRNA: 500 pg, Xnr-3-MO: 4 pmol, Kontroll (KO)-MO (XLef-1-mis-MO): 4 pmol

A: Exogenes Xnr-3-myc wurde mittels des Antikörpers 9E10 detektiert. B: Als Ladungskontrolle diente das ubiquitär vorkommende Kernprotein *Xenopus nuclear factor* 7, das mit dem Antikörper b6-2A12 detektiert wurde.

4.1.3 Das Xnr-3-Morpholino hemmt die Elongation von Keller-Explantaten

Aufgrund der Tatsache, dass Xnr-3 essentiell für konvergente Extension des Mesoderms ist, wurde erwartet, dass Inhibierung von Xnr-3 durch Morpholino-Injektion negative Auswirkung auf die Elongation von Keller-Explantaten hat.

2 pmol bzw. 4 pmol des Morpholinos wurden dorsal injiziert. Nach Erreichen des Gastrulastadiums wurden Keller-Explantate präpariert. Die Injektion des Morpholinos hatte in beiden eingesetzten Konzentrationen eine deutliche Reduktion der Elongation in den Explantaten zur Folge, wobei die Hemmung bei einer Konzentration von 4 pmol nahezu komplett war. Wurden 500 pg Xnr-3-mRNA zusammen mit 4 pmol Morpholino coinjiziert, führte dies im Vergleich zu den Explantaten aus Morpholino-injizierten Embryonen zu einer deutlichen Verbesserung der Elongation. Allerdings lag der Anteil der Klasse 2-Explantate aus coinjizierten Embryonen lediglich im Bereich des Wertes aus dem Ansatz, in den 2 pmol Xnr-3-Morpholino injiziert wurden (Abb. III-22 A).

Wurden anstelle des Anteils der Klasse 2-Explantate die nicht elongierten Explantate aufgetragen, so wurde deutlicher, dass Xnr-3-Coinjektion zu einer Verbesserung der Elongation führte. Während der Anteil dieser Explantate bei alleiniger Morpholino-Injektion auf das fünf- bis siebenfache im Vergleich mit der uninjizierten Kontrolle anstieg, so verringerte sich dieser Anteil deutlich bei Xnr-3-Coinjektion (Abb. III-22 B).

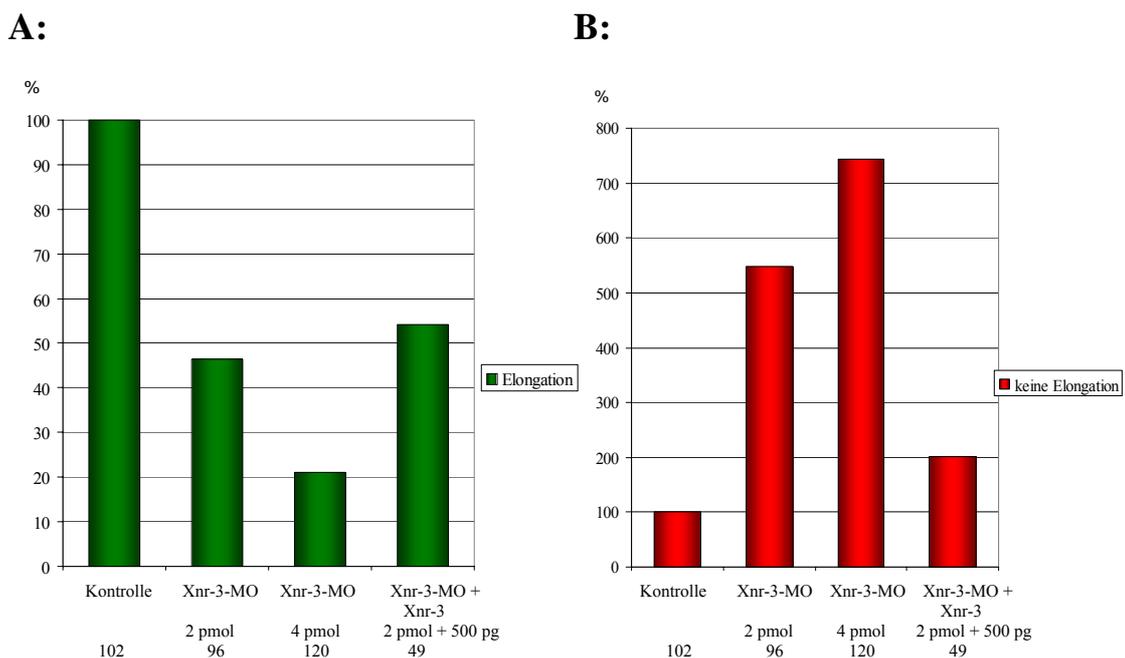


Abb. III-22: Xnr-3-Coinjektion „rettet“ die konvergente Extension nach Xnr-3-Morpholino-Injektion.

In A: ist der Anteil der vollständig elongierten (Klasse 2) Explantate aufgetragen. In B: ist der Anteil der Klasse 0-Explantate aufgetragen. In beiden Fällen wurden die Anteile aus der uninjizierten Kontrolle auf 100 % normiert.

Durch Analyse der Phänotypen sowie der Elongation von Keller-Explantaten wurde *in vivo* nachgewiesen, dass das Morpholino die Expression von Xnr-3 spezifisch reprimiert. Dies wurde durch Westernblot-Analyse *in vitro* bestätigt. Somit ist das Morpholino sowohl funktionell als auch spezifisch.

4.2 Xnr-3 wird über XLeF-1 aktiviert

Eine umfassende Charakterisierung eines XLeF-1-Morpholinos wurde von I. Albert im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt (Albert 2004). Dabei zeigte sich, dass die Injektion einer Mischung aus XLeF-1-MO 1 und XLeF-1-MO 2 im Verhältnis 1:1 Elongation in Keller-Explantaten nahezu komplett inhibierte.

Erkenntnissen von Kühl *et al.* (2001) zufolge ist Xnr-3 ein direktes Zielgen des Transkriptionsfaktors XLeF-1. Somit müsste Coinjektion von Xnr-3-mRNA die negative Auswirkung des Morpholinos wieder aufheben können. Dies war der Fall, wie aus Abb. III-23 ersichtlich wird. Somit wurde bestätigt, dass Xnr-3 ein Zielgen von XLeF-1 ist.

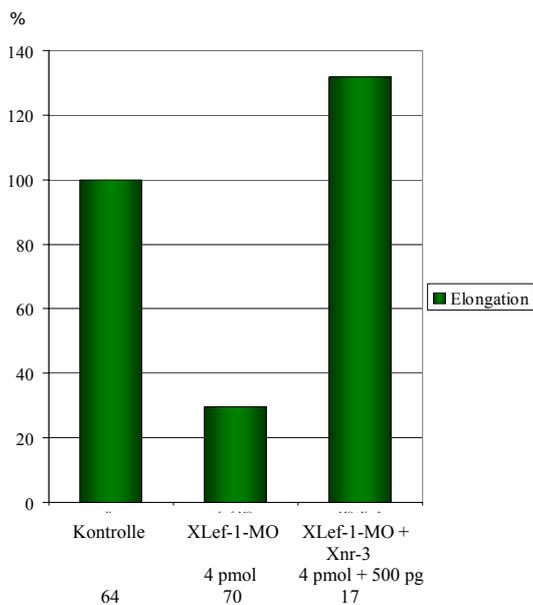


Abb. III-23: Xnr-3-Coinjektion „rettet“ konvergente Ausdehnung nach XLeF-1-Morpholino-Injektion

4.3 Xnr-3, Siamois und Twin werden auf unterschiedliche Art reguliert

Neben Xnr-3 wurden mit Siamois und Twin noch zwei weitere Zielgene des kanonischen Wnt-Signalwegs identifiziert, die zum Zeitpunkt der Gastrulation in *Xenopus laevis* wirksam sind (Brannon *et al.* 1997, Laurent *et al.* 1997). Allerdings deuten Erkenntnisse von Kühl *et al.* (2001), nach denen lediglich Xnr-3 essentiell für konvergente Extensionsbewegung ist, auf eine differentielle Regulation dieser drei Faktoren hin.

Die Überprüfung, in welcher Weise Komponenten des kanonischen Wnt-Signalwegs die Expression dieser drei Gene beeinflussen, erfolgte über Echtzeit RT-PCR. Hierzu wurde der kanonische Wnt-Signalweg durch dorsale Injektion von 100 pg XWnt-8- sowie β -Catenin-mRNA überaktiviert sowie durch Injektion von 4 pmol XLeF-1-Morpholinos gehemmt.

Nach Erreichen des Stadiums 10,25 wurden die Embryonen abgesammelt und die cDNA wie bereits unter 3.2 beschrieben präpariert. In diesem Versuch wurde Ornithin-Decarboxylase (ODC) als Vergleichsogen verwendet. Neben ODC wurden Xnr-3, Siamois sowie Twin mittels Echtzeit RT-PCR amplifiziert. Die Berechnung der Genexpression relativ zur uninjizierten Kontrolle erfolgte analog zum unter 3.2 beschriebenen Versuch. Die Werte aus der

uninjizierten Kontrolle wurden auf 100 % normiert und die Genexpression für Xnr-3, Siamois und Twin in den injizierten Proben relativ zur Kontrolle angegeben (Abb. III-24).

Dabei zeigte sich, dass eine Überaktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs durch Injektion von β -Catenin bzw. XWnt-8 eine Steigerung der Transkriptionsaktivität bei sämtlichen Wnt/ β -Catenin-Zielgenen zur Folge hat. Während der Anstieg der Twin-Expression nach β -Catenin-Injektion bei 30 % und nach XWnt-8-Injektion bei 80 % lag, fiel er im Fall von Xnr-3 mit einem Anstieg um 260 bzw. 300 % und Siamois mit einem Anstieg um 330 bzw. 410 % im Vergleich zur endogenen Transkriptionsaktivität sehr deutlich aus.

Unterschiede in der Auswirkung auf die Genexpression der drei Gene waren festzustellen, nachdem der kanonische Wnt-Signalweg durch Injektion des XLeF-1 Morpholinos inhibiert wurde. Während die Genexpression von Xnr-3 und Twin um 70 % gehemmt wurde, hatte dies auf die Expression von Siamois nahezu keine Auswirkungen.

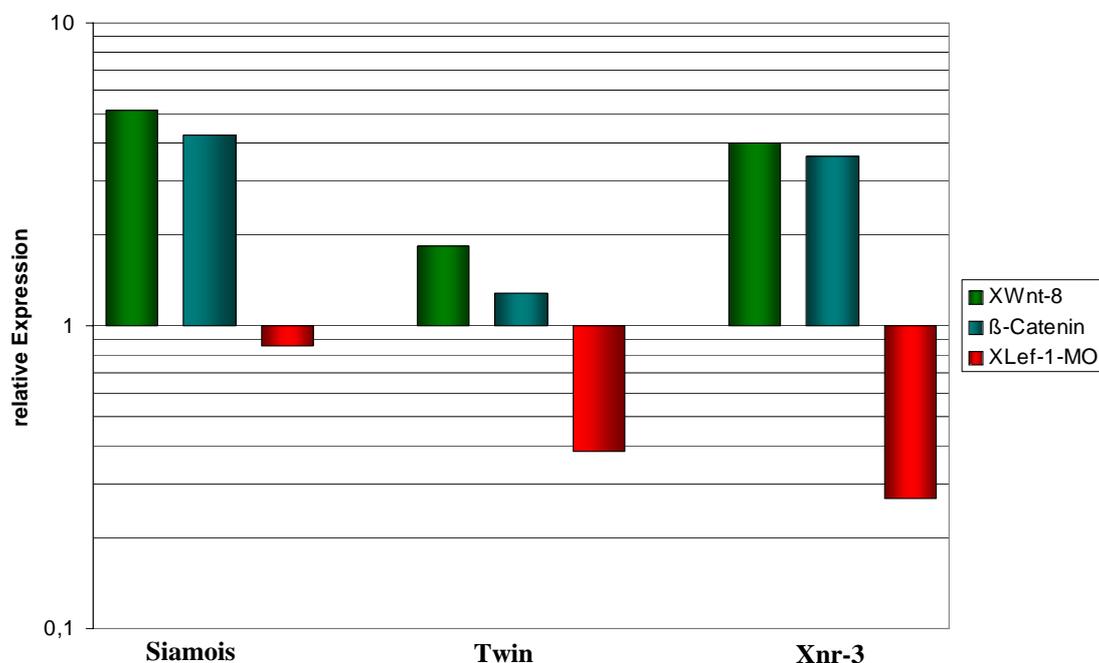


Abb. III-24: Siamois, Twin und Xnr-3 werden unterschiedlich stark durch den kanonischen Wnt-Signalweg reguliert. Mittels Echtzeit-RT-PCR wurde die Genexpression von Siamois, Twin sowie Xnr-3 analysiert, wenn der kanonische Wnt-Signalweg durch Injektion von jeweils 100 μ g XWnt-8 (grüne Balken) bzw. β -Catenin (blaue Balken) überaktiviert wurde sowie durch Injektion von 4 pmol XLeF-1-MO (rote Balken) gehemmt wurde. Die Genexpression in uninjizierten Embryonen wurde auf 1 normiert.

4.4 Identifizierung von Zielgenen von Xnr-3 mittels substraktivem Screen

Obwohl weitgehend Klarheit über die Funktion von Xnr-3 besteht, ist relativ wenig darüber bekannt, auf welche Weise dies bewerkstelligt wird. Obwohl Hinweise bestehen, dass die Regulation der konvergenten Extensionsbewegung durch Xnr-3 über einen FGF-Signalweg abläuft (Yokota *et al.* 2003), wurde bislang kein direktes Zielgen von Xnr-3 identifiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, mittels eines so genannten substraktiven Screens Zielgene von Xnr-3 zu identifizieren. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht darauf, dass die Genexpression von zwei unterschiedlichen Proben verglichen wird. Differenziell exprimierte Gene, das heißt Gene, die lediglich in einer der beiden Proben auftreten, werden selektiv amplifiziert.

4.4.1 Über substraktiven Screen werden Zielgene von Xnr-3 selektiv amplifiziert

Um Zielgene von Xnr-3 zu identifizieren, wurde die Genexpression in Embryonen, bei denen Xnr-3 durch Injektion des Xnr-3-Morpholinos reprimiert wurde, mit derjenigen in uninjizierten Embryonen verglichen.

Bei Genen, die in den uninjizierten Kontrollembryonen exprimiert werden, während sie in den Xnr-3-Morpholino-injizierten Embryonen nicht aktiv sind, handelt es sich um Gene, die durch Xnr-3 aktiviert werden und somit um mögliche Zielgene von Xnr-3. Gene, die im Gegensatz dazu in Xnr-3-Morpholino-injizierten Embryonen aktiv sind, werden durch Xnr-3 reprimiert.

Der substraktive Screen wurde mittels eines Kits der Firma BD Bioscience durchgeführt. Zur Isolierung der zu diesem Zeitpunkt im Embryo aktiven Gene waren 2 µg mRNA als Ausgangssubstanz erforderlich. Um diese zu gewinnen, wurde auf Keller-Explantate zurückgegriffen. Dies hat gegenüber der Verwendung von ganzen Embryonen den Vorteil, dass nur Gene aus der dorsalen Marginalzone, wo Xnr-3 seine Funktion ausübt, berücksichtigt werden. So wird verhindert, dass Gene aus Regionen, in denen Xnr-3 nicht vorkommt, später als potentielle Xnr-3-Zielgene identifiziert werden.

Zur Gewinnung der notwendigen Menge mRNA wurden aus uninjizierten Kontrollembryonen sowie aus mit 4 pg des Xnr-3-Morpholinos injizierten Embryonen jeweils 1000 Explantate präpariert, aus denen zunächst die Gesamt-RNA präpariert wurde. Anschließend wurde hieraus mRNA mittels ‚Dynabeads‘ isoliert. Zur Bestätigung der Funktionalität des Morpholinos wurde aus jedem verwendeten Gelege die Elongation von jeweils 8-10 Explantaten aus injizierten Embryonen sowie der uninjizierten Kontrollgruppe überprüft. Wenn nicht mindestens 50 % der Explantate aus den Morpholino-injizierten Embryonen der Klasse 0 zugeordnet wurden und außerdem nicht mindestens 50 % der Explantate aus uninjizierten Embryonen vollständige Elongation aufwiesen, wurde dieser Ansatz verworfen.

Zur Überprüfung des erfolgreichen Verlaufs des substraktiven Screens wurde zusätzlich zu den beiden Proben eine im Kit enthaltene Positivkontrolle mit mRNA aus menschlichem Skelettmuskelgewebe mitgeführt. Der substraktive Screen wurde gemäß der dem Kit beiliegenden Versuchsvorschrift durchgeführt. Einen Überblick über die einzelnen Arbeitsschritte gibt Abb. III-25.

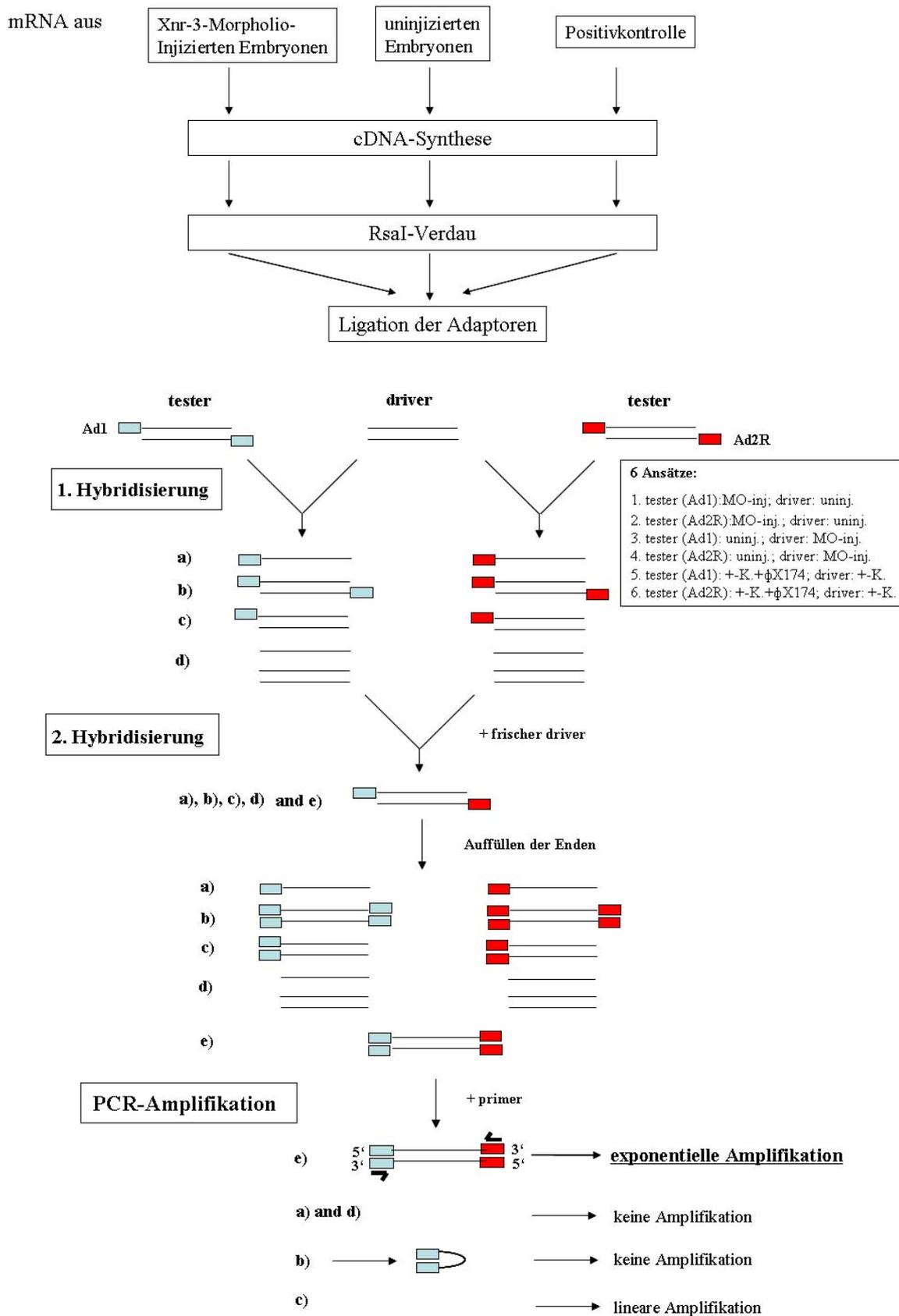


Abb. III-25: Ablauf des subtraktiven Screens.

Zunächst wurden die drei mRNA-Proben in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Diese wurde anschließend einem Restriktionsverdau mit RsaI unterzogen. Dies geschah aus zwei Gründen: Zum einen besitzt RsaI eine aus lediglich vier Basen bestehende Erkennungssequenz. Somit war gewährleistet, dass die überwiegende Mehrheit der in den beiden Proben vorhandenen Gene mindestens einmal geschnitten wurde. Zum andern wurden durch Schneiden der cDNA mittels RsaI Fragmente mit geraden Enden erzeugt, was eine Voraussetzung für die Anlagerung der Adaptoren im nächsten Arbeitsschritt darstellt. Der Verdau wurde anhand der Größenverschiebung hin zu kleineren Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

Bei den Adaptoren handelte es sich um zwei verschiedene, im Kit enthaltene, DNA-Oligomere mit einer Länge von 40 Basen: Adaptor 1 und Adaptor 2R. Sie besitzen keine Phosphatgruppe, so dass sie lediglich an das 5'-Ende der cDNA-Fragmente binden. An die Ligation der Adaptoren schloss sich eine aus zwei Schritten bestehende Hybridisierung an.

Es wurden insgesamt sechs Ansätze benötigt: An jeden cDNA-Pool, also den cDNA-Fragmenten aus uninjizierten und aus Morpholino-injizierten Embryonen sowie aus der Positivkontrolle, wurden Adaptor 1 bzw. 2R angefügt. cDNA, an die ein Adaptor ligiert wurde, ist der ‚tester‘. Anschließend wurde jeder ‚tester‘-Ansatz mit cDNA aus der jeweils anderen Probe, an die keine Adaptoren angefügt wurden – dem so genannten ‚driver‘ hybridisiert. Dabei wurde zur Hybridisierung der ‚tester‘-cDNA-Population aus Morpholino-injizierten Embryonen ‚driver‘-cDNA aus uninjizierten Embryonen zugegeben und umgekehrt. Bei der Hybridisierung der Positivkontrolle fungierte eine Mischung aus HaeIII-geschnittener ϕ X174 DNA und der cDNA aus der Positivkontrolle als ‚tester‘, als ‚driver‘ wurde die cDNA der Positivkontrolle verwendet.

Aus der ersten Hybridisierung gingen vier verschiedene Arten von Fragmenten hervor:

Fragmente, die lediglich in der ‚tester‘-Population vorhanden waren, traten als Typ a)- bzw. Typ b)-Fragmente auf. Analog bildeten Fragmente, die nur im ‚driver‘ vorhanden waren, einzel- bzw. doppelsträngige Typ d)-Fragmente. Fragmente, die sowohl im ‚driver‘ als auch im ‚tester‘ vorhanden waren, lagerten sich zu Typ c)-Fragmenten zusammen.

Im Verlauf der zweiten Hybridisierung wurden die beiden gleichartigen Testerpopulationen aus der ersten Hybridisierung gemischt (also Ansatz 1 mit Ansatz 2; 3 mit 4 und 5 mit 6) und frische ‚driver‘-cDNA aus der jeweils anderen Probe zugefügt. Zusätzlich zu den vier oben beschriebenen Typen traten nun zusätzlich Fragmente vom Typ e) auf. Dabei lagerten sich zwei homologe Typ a)-Fragmente zusammen. Hierbei handelt es sich um die gesuchten differenziell exprimierten Fragmente der Xnr-3-abhängig regulierten Gene. Sie sind lediglich in einer der beiden Populationen (entweder in der uninjizierten Kontrollprobe oder in der Morpholino-injizierten Probe) vorhanden.

Das Vorhandensein der beiden verschiedenen Adaptoren ermöglichte nun die selektive Amplifikation der gesuchten Fragmente mittels PCR. Nach dem Auffüllen der Enden am 3'-Ende wurde die PCR-Reaktion mit spezifischen Primern, die komplementär zum 3'-Ende von Adaptor 1 bzw. von Adaptor 2R waren, durchgeführt. Typ a) und d)-Fragmente besaßen keine Primerbindestellen, so dass keine Amplifikation stattfinden konnte. Bei Typ b)-Fragmenten

lagerten sich die Adaptoren der gegenüberliegenden Seiten aneinander, was ebenfalls Amplifikation verhinderte. Im Fall von Typ c)-Fragmenten fand aufgrund von nur einer Primerbindestelle lineare Amplifikation statt, während einzig bei Fragmenten vom Typ e) exponentielle Amplifikation stattfinden konnte. Somit sollten nach Abschluss des Screens die Fragmente angereichert vorliegen, die entweder über Xnr-3 aktiviert oder reprimiert wurden. Ein erfolgreicher Verlauf des substraktiven Screens wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (Abb. III-26). Im Fall der Positivkontrolle sollten sämtliche Gene, die in der Kontroll-mRNA vorhanden waren, eliminiert werden, da sie sowohl im ‚tester‘ als auch im ‚driver‘ vorkamen. Die DNA-Fragmente der HaeIII-geschnittenen Phagen-DNA waren jedoch nur im ‚tester‘ vorhanden und sollten selektiv amplifiziert werden. Dabei handelt es sich um 4 Fragmente mit einer Länge von 600, 900, 1100 bzw. 1300 Basen. Diese Banden konnten nachgewiesen werden, was bestätigte, dass die Hybridisierungsreaktionen und die anschließende PCR-Amplifikation prinzipiell korrekt abliefen. An dieser Stelle war es jedoch nicht möglich, genaue Aussagen darüber zu treffen, ob in den Ansätzen I (Ansatz 1 + 2) und II (Ansatz 3 + 4) tatsächlich die differenziell exprimierten Gene selektiv amplifiziert wurden.

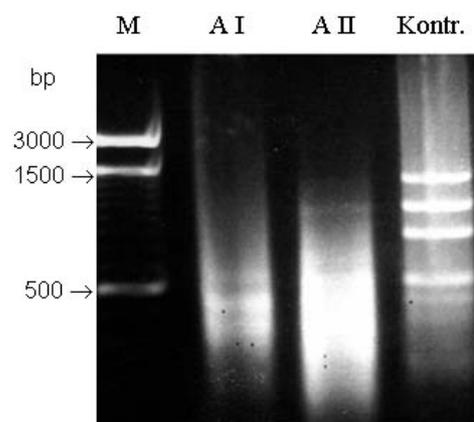


Abb. III-26: Testgel für den substraktiven Screen.

Als Marker wurde die 2-log-DNA-Leiter (New England Biolabs) verwendet. In die einzelnen Spuren wurden jeweils 5 µl der selektiv amplifizierten Gene enthaltenden DNA-Lösung aufgetragen. A(Ansatz) I enthielt die über Xnr-3 aktivierten Gene, A II die durch Xnr-3 reprimierten Gene. Die Positivkontrolle in der rechten Spur zeigte mit Fragmenten der Größe 600, 900, 1100 sowie 1300 Basenpaaren das erwartete Bandenmuster.

4.4.2 Anlegen einer cDNA-Bibliothek der selektiv exprimierten Gene

Anschließend wurden cDNA-Bibliotheken der selektiv exprimierten Gene angelegt. Als Ausgangsmaterial fungierten die Ansätze I und II des substraktiven Screens. In Ansatz I sind überwiegend Gene enthalten, die durch die Morpholino-Injektion reprimiert wurden, also über Xnr-3 aktivierte Gene. Im Gegensatz dazu wurden in Ansatz II Gene amplifiziert, deren Expression durch Xnr-3 reprimiert wird.

Beim Anlegen der cDNA-Bibliothek wurde wie in Abb. III-27 dargestellt vorgegangen. Nach Anfügen eines kurzen Poly-A-Stückes wurden die Fragmente in den pGEM-T-Vektor ligiert und in *E. coli* JM 109 transformiert. Die Bakterien wurden auf LB_{Amp}-Agarplatten (Ø: 145 mm) ausplattiert. Mittels Blau-Weiß-Selektionierung wurden positive weiße von negativen blauen Kolonien unterschieden. Die weißen Kolonien wurden gepickt und in Mikroplatten mit

96 Vertiefungen überführt. Auf diese Weise entstanden cDNA-Bibliothek I (aus Ansatz I) mit ca. 2000 Klonen sowie cDNA-Bibliothek II (aus Ansatz II) mit ca. 1500 Klonen. Die beiden Bibliotheken wurden als Bakteriendauerkulturen bei -80°C gelagert. Ebenfalls bei -80°C gelagert wurden die Reste der Transformationsansätze.

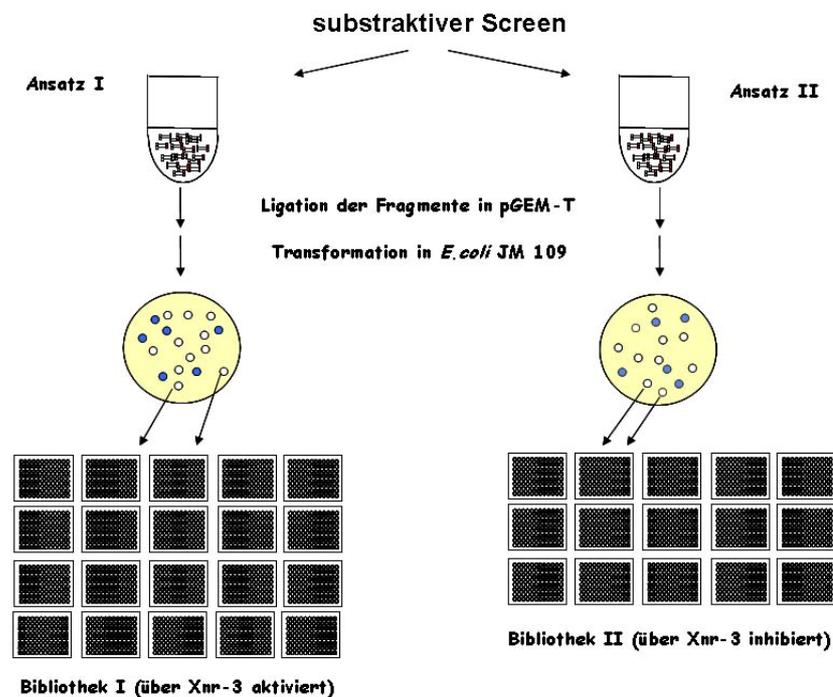


Abb. III-27: Vorgehen beim Anlegen der cDNA-Bibliotheken.

4.4.3 Identifizierung von Klonen mittels radioaktiver Hybridisierung

Es ist davon auszugehen, dass ein Teil der Klone Fragmente von Genen enthielt, die sowohl in Morpholino-injizierten als auch uninjizierten Embryonen vorhanden waren, also nicht differenziell exprimiert werden. Mittels radioaktiver Hybridisierung wurde der Versuch unternommen, diese ‚Falsch-Positiven‘ Klone zu identifizieren. Hierfür wurde die cDNA-Bibliothek des einen Ansatzes mit einer DNA-Sonde aus dem komplementären Ansatz hybridisiert. Die Klone, die in beiden Ansätzen enthalten sind, sollten dabei ein starkes Hybridisierungssignal zeigen und somit identifiziert werden.

Die radioaktive Markierung der Sonde erfolgte über eine PCR-Reaktion mittels $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -markiertem dCTP. Als DNA-Matrize diente Plasmid-DNA aus dem jeweils komplementären Ansatz, die aus den für die Erstellung der cDNA-Bibliotheken verwendeten Transformationsansätzen isoliert wurde. Als Primer wurden M13-Primer verwendet. Die Bindestellen für diese beiden Primer flankieren die Insertionsstelle für die Fragmente im pGEM-T-Vektor, so dass durch die PCR-Reaktion die einligierten Fragmente inklusive einem etwa 150 Basen langen Bereich aus der Vektorsequenz vervielfältigt wurden.

Zunächst wurde die cDNA-Bibliothek I mittels einer Sonde aus Ansatz II auf Falsch-Positive überprüft. Die DNA aus den Bakterien wurde über einen modifizierten ‚Filterabklatsch‘ auf

eine Nylonmembran übertragen, indem jeweils 5 µl Bakteriensuspension von jedem Klon analog zur Anordnung in den Platten in acht 12er-Reihen aufgetragen wurden.

Schon beim ersten Testversuch zeigte sich, dass das Hauptproblem bei der Hybridisierung darin bestand, eine hinreichend hohe Spezifität zu erreichen, so dass lediglich bei jenen Klonen ein Signal detektiert wurde, die tatsächlich ein zu einem Fragment aus der Sonden-Lösung homologes Fragment aufgenommen hatten. Stattdessen ergab jeder Klon nach der Hybridisierung ein deutliches Signal. Durch Veränderung der Temperatur sowie Modifikation von Hybridisierungs- und Waschpuffern konnte eine Verbesserung erzielt werden, dennoch war es nicht möglich, den Hintergrund vollständig zu eliminieren.

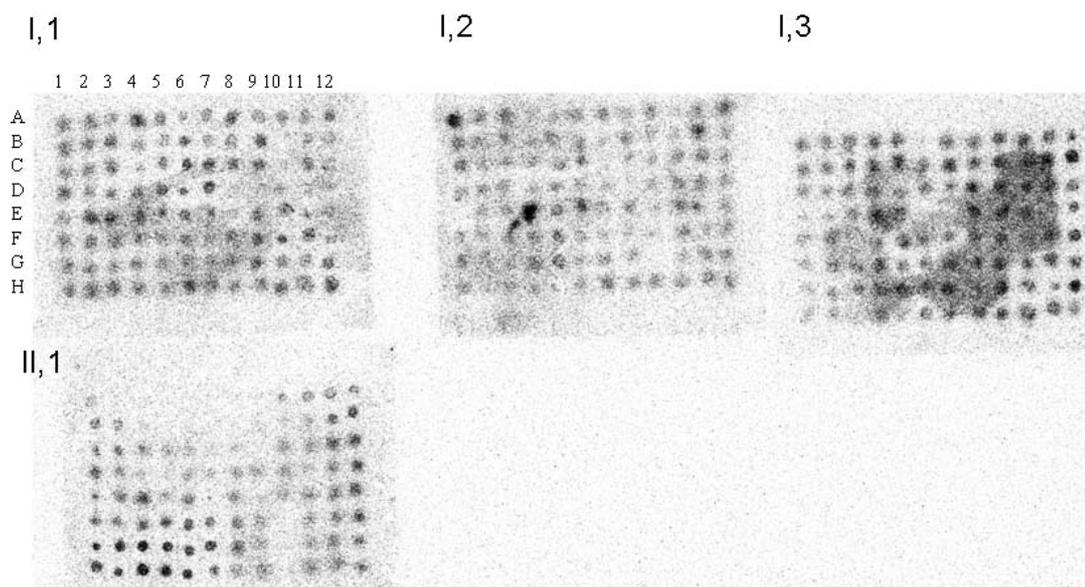


Abb. III-28: Versuch, mittels radioaktiver Hybridisierung ‚Falsch-Positive‘ Klone zu eliminieren.

Bakterien-DNA wurde über einen modifizierten ‚Filterabklatsch‘ auf eine Nylonmembran übertragen. Die Membranen wurden mit einer mittels [α - 32 P]-dCTP radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert und die Signale am *Phosphoimager* analysiert. In der oberen Reihe sind drei Membranen aus Bibliothek I (I,1; I,2; I,3) abgebildet, die untere Reihe zeigt eine Membran aus Bibliothek II (II,1).

Der Versuch der Identifizierung von ‚Falsch-Positiven‘ ist in Abb. III-28 dargestellt. Hierbei wurden drei Membranen aus Bibliothek I mit der Sonde aus Ansatz II hybridisiert. Diese sind in der oberen Reihe zu sehen. Obwohl die Hybridisierung bei nahezu allen Klonen ein Signal ergab, wiesen doch einige Klone ein deutlich stärkeres Signal auf, was besonders deutlich war bei Klonen A1 sowie E4 in der Membran I,2. Als Positivkontrolle wurde eine Membran mitgeführt, die aus der Bibliothek II stammte (II,1). Es wurde erwartet, dass die detektierten Signale bei dieser Membran deutlich stärker als im Fall der übrigen drei ausfallen. Dies war jedoch nicht der Fall.

Mögliche Ursachen für das unbefriedigende Ergebnis könnten zum einen darin begründet sein, dass aufgrund der Position der Primerbindestellen nicht zu vermeiden war, dass bei jedem Gen aus der Sonden-DNA zusätzlich ein etwa 150 Basenpaare langer Bereich aus dem Vektor amplifiziert wurde. Dieser in jedem Klon vorhandene homologe Abschnitt ist unter

Umständen ausreichend, um bei jedem Klon eine Anlagerung der Sonden-DNA an die auf der Membran befindlichen Plasmid-DNA zu bewirken. Möglicherweise liegt die Ursache auch darin, dass im Verlauf von PCR-Reaktionen kleinere Fragmente stärker amplifiziert werden als große, was zu einer Anreicherung von kleinen Fragmenten in der Sonden-DNA führte. Dies hätte zur Folge, dass ein kleines Fragment auf der Membran ein stärkeres Signal als ein größeres Fragment zeigte.

In einem weiteren Versuch wurde anstelle einer DNA- eine RNA-Sonde verwendet. Die radioaktive Markierung erfolgte mittels [α - 32 P]-markiertem UTP. Allerdings führte auch dies nicht zu einer Verbesserung der Ergebnisse.

Eine weitere mögliche Ursache für den starken Hintergrund liegt in der Verwendung von Bakteriensuspension als Ausgangsmaterial zur Herstellung der Hybridisierungsmembranen. Hierbei ist nicht gewährleistet, dass von jedem Klon dieselbe DNA-Menge auf die Membran aufgetragen wird. Um diese Fehlerquelle auszuschließen, wurde eine neue Hybridisierung mit einer DNA-Sonde aus Ansatz II durchgeführt, wobei im Prinzip wie oben beschrieben vorgegangen wurde. Im Unterschied zum ersten Versuch wurde jedoch anstelle von Bakteriensuspension jeweils 500 ng Plasmid-DNA auf die Nylonmembran aufgetragen. Es wurde eine Kontrollmembran mitgeführt, worauf die als Matrize zur Herstellung der Sonden verwendete Plasmid-DNA der Ansätze I und II in unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen wurden.

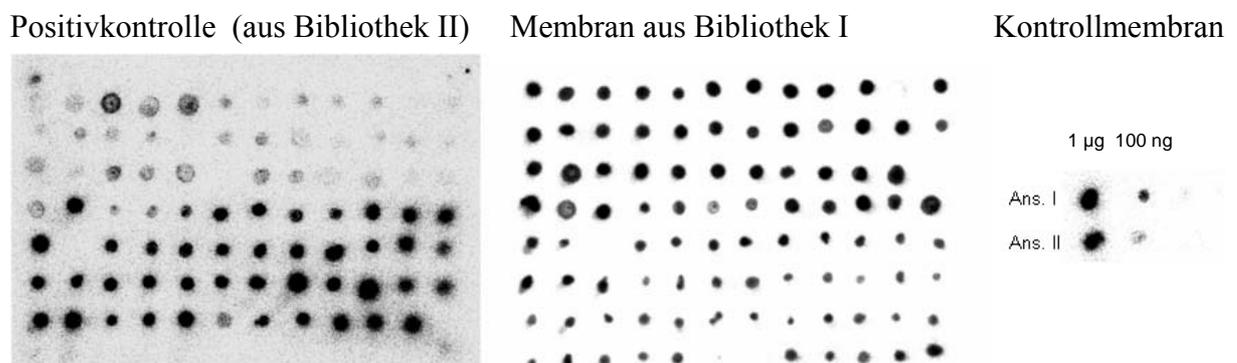


Abb. III-29: 2. Versuch zur Eliminierung von Falsch-Positiven.

Im Unterschied zum 1. Versuch (Abb. III-28) wurden jeweils 500 ng Plasmid-DNA anstelle von 5 μ l Bakteriensuspension auf die Membran aufgetragen. Zusätzlich wurde eine Kontrollmembran mitgeführt, auf die Plasmid-DNA aus den für die Erstellung der Bibliotheken verwendeten Transformationsansätzen in der Konzentration 1 μ g sowie 100 ng aufgetragen wurde.

Auch in diesem Fall war die Stärke der Signale bei der Membran aus Bibliothek I entgegen den Erwartungen nicht schwächer als bei der Positivkontrolle aus Bibliothek II. Auf der Kontrollmembran zeigte die Hybridisierung des komplementären Ansatzes (Ans. I) ebenfalls eine empfindlichere Reaktion als Ansatz II, aus dem die DNA-Sonde ursprünglich stammte, und der eigentlich maximale Signalintensität aufweisen müsste. Die Suche nach ‚Falsch-Positiven‘ auf diese Art führte zu keinem Ergebnis und wurde eingestellt.

4.4.4 Identifizierung von Klonen, die bekannte Zielgene von Xnr-3 enthielten

Parallel zur Identifizierung von ‚Falsch-Positiven‘ wurde versucht, über radioaktive Hybridisierung Klone zu identifizieren, die ein Fragment eines bereits bekannten Xnr-3-abhängig regulierten Gens enthielten. Aufgrund seiner Xnr-3-abhängigen Regulation sowie seines Auftretens während der Gastrulation wird angenommen, dass Xbra im Verlauf des substraktiven Screens amplifiziert wurde und demnach in einer Reihe von Klonen auftreten müsste.

Es wurden Membranen aus Bibliothek I mit einer mittels [α - 32 P]-dCTP radioaktiv markierten Xbra-DNA-Sonde hybridisiert. Die Sonde wurde ebenfalls durch PCR-Amplifikation hergestellt, als Matrize wurden 50 ng Xbra-Plasmid-DNA eingesetzt. Für die Herstellung der Membranen wurden analog zum 1. Hybridisierungsversuch 5 μ l Bakteriensuspension eingesetzt. Für die Hybridisierung wurden insgesamt 6 Membranen mit jeweils 96 Klonen hybridisiert. Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt Abb. III-30.

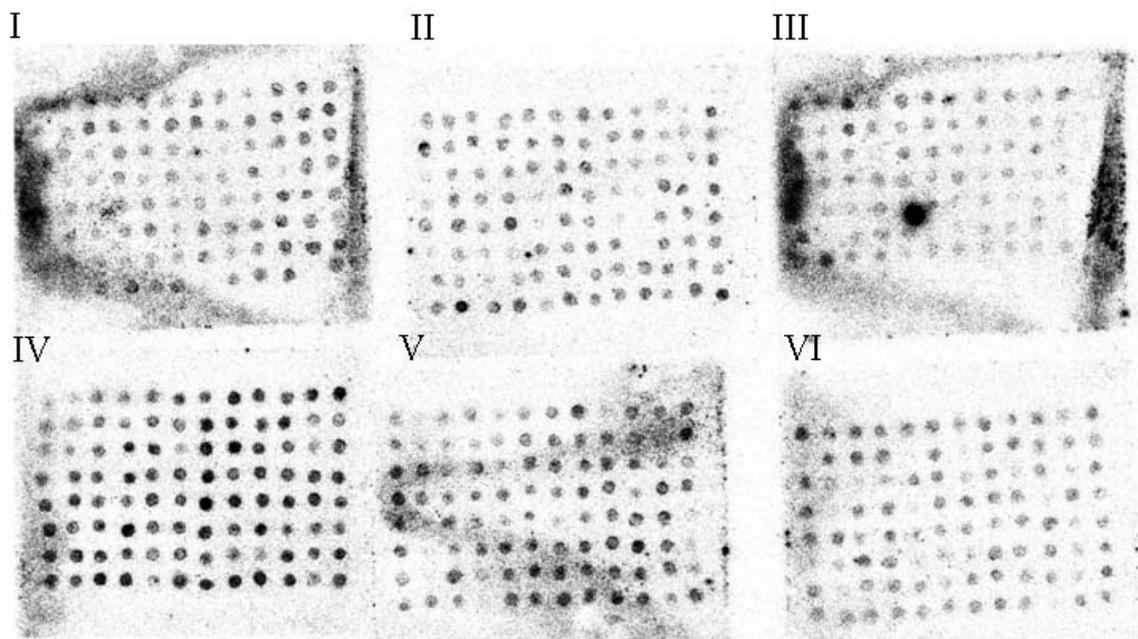


Abb. III-30: Radioaktive Hybridisierung zur Detektion von Xbra.

Auf die Membranen wurde von jedem Klon 5 μ l Bakteriensuspension aufgetragen und mittels ‚Filterabklatsch‘ die DNA isoliert. Die Xbra-Sonde wurde mittels PCR hergestellt und durch [α - 32 P]-dCTP radioaktiv markiert. Für die Hybridisierung wurden sechs zufällig ausgewählten Mikroplatten aus der cDNA-Bibliothek I herangezogen.

Es fällt auf, dass die Intensität des Signals bei Klon E5 aus Membran III um ein Vielfaches stärker war als bei sämtlichen übrigen Klonen. Es war somit sehr wahrscheinlich, dass dieser Klon ein Xbra-Fragment enthält. Allerdings handelt es sich bei III, E5 um den einzigen Klon unter den getesteten 574, bei dem die Hybridisierung ein eindeutiges positives Ergebnis brachte. Daher muss davon ausgegangen werden, dass dieser Ansatz nicht geeignet ist, um eine große Anzahl von Klonen zu identifizieren. Es wurde darauf verzichtet, das Vorhandensein von Xbra in Klon III, E5 zu verifizieren und die Hybridisierungsexperimente wurden eingestellt.

4.4.5 Identifizierung von Xnr-3-Zielgenen mittels Sequenzierung

Mittels Sequenzierung erhält man genaue Information über die Natur der in den Klonen enthaltenen cDNA-Fragmente. Da eine Sequenzierung sämtlicher Klone nicht durchführbar war, wurden zunächst drei Mikroplatten mit jeweils 96 Klonen ausgewählt. Dabei handelte es sich um zwei Platten aus Bibliothek I sowie eine Platte aus Bibliothek II.

Zunächst wurde aus sämtlichen 288 Klonen die Plasmid-DNA präpariert, die cDNA-Fragmente durch das Restriktionsenzym BstZI aus dem Vektor geschnitten und die Spaltpmuster anhand von Agarosegelelektrophorese analysiert. Für die Sequenzierungen, die von der Firma GATC durchgeführt wurden, wurden Klone ausgewählt, die ein Fragment mit einer Länge von mindestens 500 Basen aufgenommen hatten. Dies war sinnvoll, da ein großes Fragment eine detaillierte Aussage über das vorhandene Gen ermöglicht. 27 Klone aus Bibliothek I sowie 23 Klone aus Bibliothek II erfüllten diese Voraussetzung.

Die erhaltenen Sequenzen wurden unter Verwendung der Datenbank des *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) (<http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2>) auf Homologien zu bereits identifizierten Genen aus *Xenopus laevis* bzw. aus anderen Spezies überprüft. Die Sequenzen, zu denen keine Homologien gefunden wurden, wurden zusätzlich mit der Datenbank der *National Library of Medicine* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) verglichen. Wurde eine Übereinstimmung zu einem EST aus *Xenopus laevis* festgestellt, so wurden die Datenbanken mit Hilfe der kompletten Sequenz dieses EST erneut nach homologen Genen durchsucht.

Tab. III-3: Identität der Gene in den sequenzierten Klonen aus Bibliothek I

Klon	Gen bzw. EST	Spezies	Art des Proteins
1	hnRNP 2H9	<i>Homo sapiens</i> (75 % Übereinst.)	RNA-Bindeprotein
2	Ilf 3/ 4F-2/ CBTF	<i>Xenopus laevis</i>	Transkriptionsfaktor
3	Geminin H	<i>Xenopus laevis</i>	bifunktionales Kernprotein
4	<i>Keine Homologien</i>		
5	Ap-2rep	<i>Xenopus laevis</i>	DNA-Bindeprotein
6	Cytokeratin	<i>Xenopus laevis</i>	Intermediärfilament
7	Splicing Factor, arginin/serin-rich 2	<i>Xenopus laevis</i>	RNA-Bindeprotein
8	Id 2	<i>Xenopus laevis</i>	Inhibitor von Transkriptionsfaktoren
9	HMG-X	<i>Xenopus laevis</i>	DNA-Bindeprotein, Transkriptionsregulator
10	EST: XL 430117	<i>Xenopus laevis</i>	
11	XERH	<i>Xenopus laevis</i>	Cofaktor von Transkriptionsfaktor
12	<i>Keine Homologien</i>		
13	RGC-32	<i>Xenopus laevis</i>	zytoplasmatisches Protein
14	(= Klon 4)		
15	16S-rRNA	<i>Xenopus laevis</i>	
16	Myb 1	<i>Xenopus laevis</i>	Transkriptionsfaktor im Zellkern
17	LSM 8	<i>Homo sapiens</i> (85 % Übereinst.)	RNA-Bindeprotein

Die Analyse der Klone aus Bibliothek I erbrachte folgende Resultate: 10 Sequenzen wiesen keine ausreichende Qualität für eine Datenbankanalyse auf, da viele Basen nicht eindeutig identifiziert werden konnten. Die restlichen 17 Klone enthielten 16 verschiedene Gene, von denen 11 identisch mit bereits identifizierten und charakterisierten Genen aus *Xenopus laevis* waren. Tab. III-3 gibt eine Übersicht über die identifizierten Gene aus Bibliothek I:

Die Datenbankanalyse der 23 Sequenzen aus Bibliothek II ergab 14 verschiedene Gene, von denen sechs Klone ein Gen enthielten, das bereits in *Xenopus laevis* beschrieben wurde. Im Einzelnen wurden aus Bibliothek II folgende Gene identifiziert (Tab. III-4):

Tab. III-4: Identität der Gene in den sequenzierten Klonen aus Bibliothek II

Klon	Gen bzw. EST	Spezies	Art des Proteins/Funktion
1	ISWI	<i>Xenopus laevis</i>	DNA-Bindeprotein
2	(= Klon 1)		
3	p68 RNA-Helikase	<i>Xenopus laevis</i>	Aufschneiden von DNA-Doppelsträngen
4	EST: XL 404m07	<i>Xenopus laevis</i>	
5	Cytochrom-c-Oxidase UE I	<i>Xenopus laevis</i>	ATP-Gewinnung
6	DEAD box p46	<i>Homo sapiens</i> (80 % Übereinst.)	RNA-Helikase; Aufschneiden von DNA-Doppelsträngen
7	EST: XL 514o06	<i>Xenopus laevis</i>	
8	EST: XL 507a20	<i>Xenopus laevis</i>	
9	(= Klon 6)		
10	16S-rRNA	<i>Xenopus laevis</i>	
11	(= Klon 10)		
12	Srcyp	<i>Homo sapiens</i> (79 % Übereinst.)	RNA-Reifung + Proteinfaltung
13	Profilin 1	<i>Xenopus laevis</i>	RNA-Bindeprotein; Aktin-Polymerisierung
14	(= Klon13)		
15	(= Klon 4)		
16	HMG-X	<i>Xenopus laevis</i>	DNA-Bindeprotein, Transkriptionsregulator; Neuralinduktion
17	EST: XL 409124		
18	(= Klon 16)		
19	(= Klon 5)		
20	EF1 α	<i>Xenopus laevis</i>	Faktor für Translation
21	EST: XL 492n10	<i>Xenopus laevis</i>	

4.4.6 Geminin wird über Xnr-3 aktiviert

Wurde eine Homologie zu einem bereits charakterisierten Gen in *Xenopus laevis* festgestellt, so lag die Übereinstimmung der Nukleotidsequenz in allen Fällen bei mehr als 95 %, so dass an der Identität des sequenzierten Fragments kein Zweifel besteht. Auch die sehr hohen Übereinstimmungen zwischen 75 und 85 % mit den jeweiligen Genen aus dem Menschen deuten darauf hin, dass es sich tatsächlich um homologe Gene handelt.

Wurde eine Sequenz einem bekannten Gen zugeordnet, so konnte oftmals bereits eine Einschätzung darüber erfolgen, ob es sich bei dem vorliegenden Gen um ein potentielles Zielgen von Xnr-3 handelt.

Zunächst wurden die potentiellen Xnr-3-Zielgene aus Bibliothek I, also die Gene, die möglicherweise Xnr-3-abhängig aktiviert werden, einer genaueren Analyse unterzogen. Bei vier der 16 verschiedenen Gene, die mittels Sequenzierung identifiziert wurden, handelt es sich höchstwahrscheinlich um ‚Falsch-Positive‘. Das Vorhandensein der 16S-rRNA aus Klon 15 war die Folge einer nicht vollständigen Eliminierung von ribosomaler RNA bei der mRNA-Isolierung. Bei Klon 6 (Cytokeratin) und Klon 17 (LSM-Homolog) ist wegen der allgemeinen Funktion des Genprodukts nicht von einer Xnr-3-abhängigen Regulation auszugehen. Aufgrund seines Auftretens in den beiden komplementären Bibliotheken wurde HMG-X ebenfalls als potentielles Zielgen von Xnr-3 ausgeschlossen.

Tabelle III-5: potentielle über Xnr-3 aktivierte Gene, die über RT-PCR analysiert wurden

Klon	Gen bzw. EST	Funktion
1	hnRNP 2H9	Reifung von mRNA
2	Ilf 3/ 4F-2/ CBTF	Transkriptionsfaktor im frühen Embryo; mit Einfluss auf Achsenbildung
3	Geminin H	Neuralinduktion; hemmt mitotische Zellteilungen
4	<i>Keine Homologien</i>	
5	Ap-2rep	hemmt den Transkriptionsfaktor Ap-2; Differenzierung des Neuralgewebes
7	Splicing Factor arg./ser.rich 2	Reifung von mRNA
8	Id 2	Inhibitor von Transkriptionsfaktoren; Differenzierung des Neuralgewebes
10	EST: XL 430117	
11	XERH	Cofaktor von HNF-1; Mesoderminduktion
12	<i>Keine Homologien</i>	
13	RGC-32	Aktivierung von FGF-Faktoren
16	Myb 1	Transkriptionsfaktor im Zellkern

Mit den verbliebenen zwölf Genen, die in Tab. III-5 aufgelistet sind, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Hierzu wurden zunächst 500 pg Xnr-3-myc-mRNA bzw. 4 pmol Xnr-3-Morpholino dorsal injiziert. Die Wirksamkeit der Injektion wurde bei Xnr-3-Überexpression anhand der charakteristischen Ausbildung von fingerförmigen Fortsätzen, bei der Morpholino-Injektion anhand der Hemmung der Elongation in Keller-Explantaten verifiziert. Es wurden zu Beginn der Gastrulation sowie bei Erreichen von Stadium 11 aus allen drei Ansätzen (uninjiziert, Xnr-3-injiziert, MO-injiziert) jeweils 25 Embryonen entnommen und daraus die Gesamt-RNA isoliert. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben, welche als Matrize für die RT-PCR-Reaktion diente. Die benötigten Primer wurden unter Zuhilfenahme des Computerprogramms Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) synthetisiert. Es wurden 0,5 µl 1:3-verdünnter cDNA-Lösung für die PCR-Reaktion eingesetzt. Die PCR-Reaktion umfasste 30 Zyklen. Um die Amplifikation der spezifischen Genfragmente während der PCR-Reaktion zu überprüfen, wurden 12,5 µl eines 25 µl-Ansatzes mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

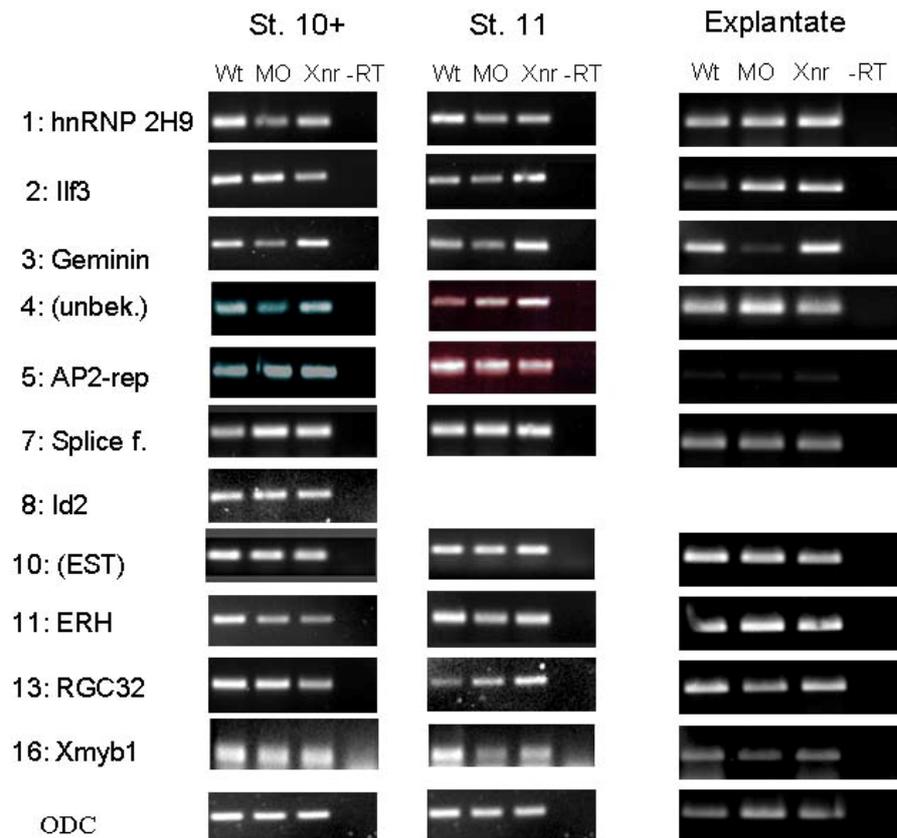


Abb. III-31: Geminin wird über Xnr-3 aktiviert.

Es wurden 500 pg Xnr-3-myc-mRNA (Xnr) sowie 4 pmol Xnr-3-MO (MO) dorsal injiziert. Die Embryonen wurden im Stadium 10,25 (linke Spalte) sowie Stadium 11 (Mitte) abgesammelt und cDNA für die RT-PCR-Reaktion hergestellt. Die PCR-Reaktion wurde wiederholt, wobei Keller-Explantate anstelle von ganzen Embryonen als Ausgangsmaterial dienten (rechts). Amplifikation von Id 2-mRNA gelang lediglich, wenn ganze Embryonen aus Stadium 10,25 verwendet wurden.

Im Fall von Klon 12 gelang es trotz Verwendung von zwei verschiedenen Primerpaaren nicht, das spezifische Genfragment zu amplifizieren.

Es wurde erwartet, dass zumindest ein Teil der getesteten Gene durch Xnr-3 Morpholino-Injektion in ihrer Expression gehemmt werden, während eine Überexpression von Xnr-3 eine Steigerung der Expression zur Folge haben sollte. Anhand der berechneten Fragmentgrößen wurde verifiziert, dass es sich bei den amplifizierten Fragmenten tatsächlich um das spezifische PCR-Produkt handelte. Es war jedoch offensichtlich (Abb. III-31), dass die Expression der Mehrzahl der potentiellen Xnr-3-Zielgene von einer Reprimierung sowie Überaktivierung von Xnr-3 unbeeinflusst bleibt. Lediglich Geminin zeigt die erwartete Veränderung im Expressionsverhalten. Dieses Ergebnis wurde anhand von zwei unabhängigen Versuchen bestätigt.

Um eine Aussage über eine eventuelle Aktivierung bzw. Reprimierung der Genexpression mittels RT-PCR zu treffen, ist es essentiell, dass sich die Amplifikation im exponentiellen Bereich befindet. Wie aus Abb. III-15 hervorgeht, findet ab einem bestimmten Zeitpunkt keine Amplifikation mehr statt. Werden zu viele PCR-Zyklen durchgeführt oder eine zu hohe Konzentration der cDNA-Matrize eingesetzt, so ist kein Unterschied in der Stärke der amplifizierten Banden mehr sichtbar.

Daher wurde die cDNA-Menge sowie die Anzahl der PCR-Zyklen variiert. Für die ersten Versuche wurden 0,5 µl der unverdünnten cDNA-Lösung, später eine 1:3-verdünnte Lösung verwendet. Die Zyklenzahl wurde im Bereich von 27 bis 35 Zyklen verändert. Hierbei wurde festgestellt, dass sich bei 1:3-verdünnter cDNA-Lösung und 27 PCR-Zyklen die Amplifikation der meisten Gene unterhalb der Nachweisgrenze befand, während bei 35 Zyklen bereits der lineare Amplifikationsbereich erreicht war. So war davon auszugehen, dass die Zyklenzahl von 30 und eine 1:3-verdünnte cDNA-Lösung geeignet sind, um eventuelle Unterschiede in der Expression der getesteten Gene zu detektieren.

Eine weitere Möglichkeit für die nicht festgestellte Xnr-3-abhängige Regulation bei 10 der 11 potentiellen Zielgenen könnte darin begründet sein, dass RNA aus ganzen Embryonen für die RT-PCR-Reaktion herangezogen wurde. Xnr-3 ist lediglich in einem kleinen Bereich des Embryos aktiv und beeinflusst daher nur in diesem Abschnitt die Genexpression. Um zu verhindern, dass Genexpression in anderen Bereichen des Embryos einen möglichen regulatorischen Effekt von Xnr-3 auf eines der getesteten Zielgene überdeckt, wurde der RT-PCR-Versuch unter Verwendung von Keller-Explantaten anstelle von ganzen Embryonen wiederholt. Durch die Präparation dieser Explantate wurde der Bereich des Embryos präpariert, in dem Xnr-3 aktiv ist.

Bei der Durchführung des Versuchs wurde weitgehend wie bei der ersten RT-PCR Analyse vorgegangen. Als Ausgangsmaterial dienten jeweils 25 Explantate aus uninjizierten, Xnr-3-Morpholino- sowie Xnr-3-injizierten Embryonen.

Die Verwendung von Explantaten hatte allerdings keine Veränderung in den Resultaten zur Folge. Abgesehen von Geminin schien die Expression keines der potentiellen Zielgene durch die Veränderung der Xnr-3-Aktivität deutlich erkennbar beeinflusst. Bei Klon 13 und 16 hatte die Reprimierung von Xnr-3 einen leichten Rückgang der Genexpression zur Folge, die Veränderung war jedoch zu schwach, um daraus eine tatsächliche Xnr-3-abhängige Regulation ableiten zu können. Somit musste davon ausgegangen werden, dass es sich lediglich bei Geminin um ein Zielgen von Xnr-3 handelt.

Es wurden weitere Versuche durchgeführt, um Klarheit über die Verbindungen zwischen Xnr-3 und Geminin zu bekommen.

4.4.7 Xnr-3 und Geminin agieren gemeinsam bei der Neuralinduktion

Zur Klärung der Frage, ob die Fähigkeit von Xnr-3 zur Neuralinduktion für die Aktivierung von Geminin verantwortlich ist, standen mit cmXnr-3 sowie einem Aktivin-Xnr-3-Fusionskonstrukt zwei Konstrukte zur Verfügung. cmXnr-3 ist nicht mehr in der Lage, die Prodomäne abzuspalten, hat jedoch neuralinduktives Potential. Im Gegensatz dazu ist das Fusionskonstrukt, das anstelle der Xnr-3-Prodomäne die Prodomäne von Aktivin enthält, unfähig, Genexpression neuraler Markergene zu induzieren (Hansen Ezal *et al.* 2000).

mRNA der beiden Konstrukte wurde dorsal in einer Konzentration von jeweils 500 pg injiziert. Außerdem wurden 4 pmol Xnr-3-Morpholino injiziert. Im Gegensatz zu den bisherigen Versuchen wurden animale Kappen präpariert, welche den Bereich enthalten, in

dem frühe Neuralentwicklung stattfindet. Aus diesen wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Expression von Geminin wurde mittels RT-PCR analysiert (Abb. III-32).

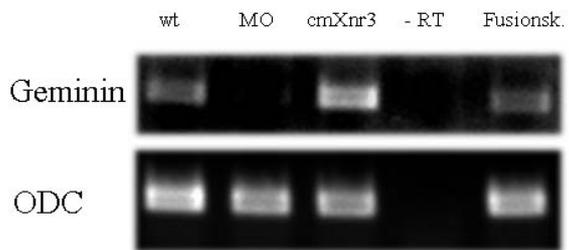


Abb. III-32: Die Fähigkeit von Xnr-3 zur Neuralinduktion beeinflusst die Geminin-Expression. Injiziert wurden je 500 pg cmXnr-3 und Aktivin-Xnr-3-Fusionskonstrukt sowie 4 pmol Xnr-3-MO. Mittels RT-PCR wurde der Einfluss der Injektionen auf die Geminin-Expression analysiert. ODC diente als Kontrolle.

Injektion von cmXnr-3 hatte eine deutliche Steigerung der Geminin-Expression zur Folge, während das Aktivin-Xnr-3-Fusionskonstrukt eher eine Reduzierung der Geminin-Expression, verglichen mit der uninjizierten Kontrolle, bewirkte. Injektion des Morpholinos reprimierte wie erwartet nahezu vollständig die Transkription. Dies deutete darauf hin, dass die Fähigkeit von Xnr-3 zur Neuralinduktion entscheidend für die Aktivierung von Geminin ist.

4.4.8 Überexpression von Geminin führt zu charakteristischen Defekten

Überaktivierung von Xnr-3 hat einen charakteristischen Phänotyp zur Folge, der durch mehrere fingerförmige Fortsätze an verschiedenen Stellen des Embryos gekennzeichnet ist (Smith *et al.* 1995).

Zunächst wurde untersucht, ob dieser Phänotyp durch die Injektion von aktivem Geminin reproduziert werden konnte. Hierzu wurde ein aktives Geminin-Konstrukt verwendet, das von M.W. Kirschner zur Verfügung gestellt wurde und bereits in Kroll *et al.* (1998) zur Analyse der Funktion von Geminin herangezogen wurde.

Neben seiner Funktion als Neuralinduktor beeinflusst Geminin außerdem die Zellteilungsaktivität (King *et al.* 1996, McGarry 2002). Aufgrund seiner Beteiligung an Zellteilungsvorgängen wurde entschieden, DNA anstelle von mRNA zu injizieren. Im Gegensatz zu mRNA, die bereits unmittelbar nach der Injektion translatiert wird, erfolgt die Expression von DNA erst mit Beginn der zygotischen Genexpression während der MBT, was verhindert, dass unspezifische Auswirkungen aufgrund der Aktivität des Genprodukts während der ersten Furchungsteilungen auftreten.

Bei den Analysen von Kroll *et al.* (1998) wurden 250 pg Plasmid-DNA eingesetzt. Dieser Wert diente als Anhaltspunkt. So wurde die injizierte Gesamtmenge zwischen 50 pg und 1 ng variiert. Injiziert wurde in die beiden dorsalen Blastomeren in Embryonen im Vierzellstadium. Die Embryonen wurden bei 15°C inkubiert und die Auswirkungen der Geminin-Überexpression zu verschiedenen Zeitpunkten beobachtet. Eine detaillierte Analyse wurde 68 bis 72 Stunden nach der Befruchtung durchgeführt, als die uninjizierten Kontrollembryonen Stadium 23 bis 24 erreicht hatten. Abb. III-33 A-C zeigen Aufnahmen, die zu diesem Zeitpunkt gemacht wurden.

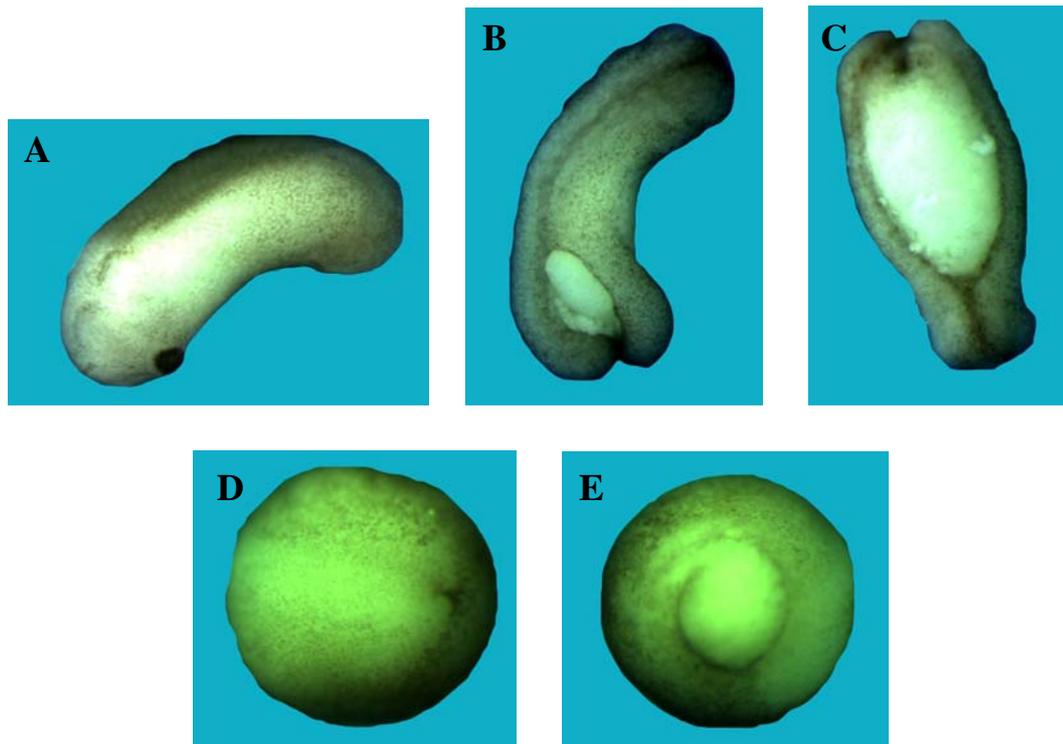


Abb. III-33: Geminin-Überexpression verursacht dorsale Missbildungen.

Embryonen, die dorsal mit 250 pg Geminin-DNA injiziert wurden, zeigten charakteristische Phänotypen. A: Wildtyp-Embryo im Stadium 24, ca. 70 Stunden nach Befruchtung B und C: injizierte Embryonen zum selben Zeitpunkt. Beide weisen offene Rücken auf. B zeigt eine milde, C eine gravierende Form dieses Phänotyps.

D: Wildtyp-Embryo im Stadium 12; E: Embryo, in den 250 pg Geminin injiziert wurden. Geminin-Injektion führte zu Problemen beim Schließen des Blastoporus.

Bei keiner der getesteten Konzentrationen bildeten die Geminin-injizierten Embryonen Fortsätze aus, die dem Phänotyp bei Xnr-3-Überaktivierung vergleichbar waren. Stattdessen wiesen die Mehrzahl der injizierten Embryonen Defekte in ihren dorsalen Strukturen auf. Dies äußerte sich in offenen Rücken, die in unterschiedlichen Schweregraden auftraten. Eine Auflistung der Häufigkeit der verschiedenen Phänotypen ist in Tab. III-6 aufgelistet.

Tab. III-6: Phänotypen bei Geminin-Überaktivierung.

	überlebend	normal	offene R. (schwer)	offene R. (leicht)	Wirbelsäule verkrümmt	unklar
50 pg	59/125 – 47 %	41	10	8		
100 pg	132/180 – 73 %	37	76	15		4
250 pg	153/300 – 51 %	59	52	16	19	7
500 pg	99/175 – 57 %	2	87	8	1	1
1 ng	41/125 – 33 %	12	26	1	2	

Die Ursache für die Beobachtung, dass eine Erhöhung der Konzentration teilweise eine höhere Überlebensrate zur Folge hatte, liegt möglicherweise in der unterschiedlichen Empfindlichkeit für die Mikroinjektionen von verschiedenen Gelegen begründet.

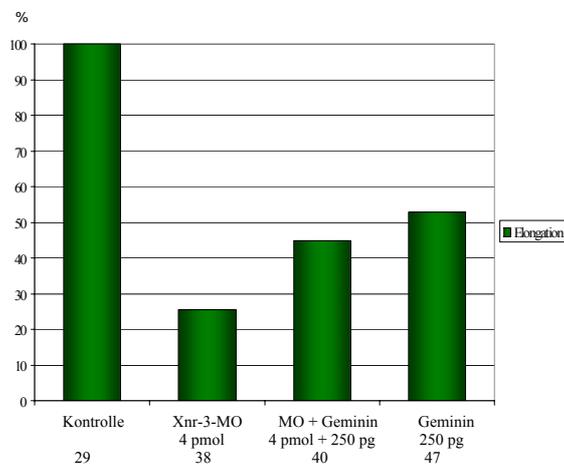
Ein offener Rücken entsteht, wenn das Neuralrohr im Verlauf der Neurulation nicht korrekt geschlossen werden kann. Die Ursachen hierfür können in einem gestörten Ablauf der Neuralentwicklung liegen. Allerdings kann das Entstehen von offenen Rücken auch darauf

zurückzuführen sein, dass bereits während der Gastrulation Störungen auftreten. Da die Embryonen bereits im Verlauf der Gastrulation in ihrer Entwicklung beeinträchtigt waren (Abb. III-33 D + E), ist zu vermuten, dass die beobachteten Defekte nicht ausschließlich auf Störungen in der Neuralentwicklung zurückzuführen sind.

4.4.9 Geminin kann Elongation in Explantaten nicht wieder herstellen

Zur Überprüfung, ob Geminin bei der Regulation der konvergenten Extension in einer linearen Signalkaskade unterhalb von Xnr-3 liegt, wurden 250 pg Geminin zusammen mit 4 pmol Xnr-3-Morpholino dorsal injiziert und anhand von Keller-Explantaten untersucht, ob Coinjektion von Geminin die Hemmung der Elongation der Explantate aufhob.

A:



B:

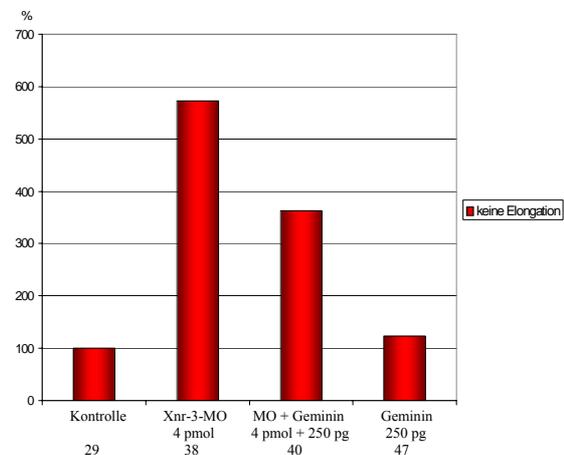


Abb. III-34: Geminin kann konvergente Extension in Keller-Explantaten nicht wieder herstellen.

A: Anteil der elongierten Explantate in den injizierten Explantaten relativ zur Kontrolle. B: Anteil der nicht-elongierten Explantate. In beiden Diagrammen wurde der Anteil aus der uninjizierten Kontrolle auf 100 % normiert.

In Abbildung III-34 A ist der Anteil der vollständig elongierten Keller-Explantate dargestellt. Coinjektion von Geminin führte zwar zu einer leichten Verbesserung der Elongation in den Explantaten, allerdings lag der Anteil immer noch um mehr als die Hälfte unter dem Wert aus der uninjizierten Kontrolle. Auch alleinige Injektion von 250 pg Geminin hatte einen deutlichen Rückgang in der Elongation der Explantate zur Folge. Wurden jedoch die Explantate berücksichtigt, die keinerlei Elongation aufwiesen, so stieg deren Anteil in den Morpholino-injizierten bzw. den coinjizierten Explantaten um das sechs- bzw. vierfache an, während Injektion von Geminin keine Steigerung der Klasse 0-Explantate verursachte.

Die Analyse der Explantate ergab, dass Überexpression von Geminin einen schwachen Rückgang der Elongation in Keller-Explantaten verursachte sowie bei Coinjektion mit Xnr-3-MO eine leichte Verbesserung der Elongation bewirkte. Beide Effekte waren jedoch nicht signifikant.

4.4.10 Geminin-Überexpression hat Explantate vom Typ 2x zur Folge

Bei Überexpression von Geminin wurde jedoch bei 13 der 18 vollständig elongierten Explantate der 2x-Phänotyp festgestellt, was einem Anteil von 72 % entspricht.

Um die Ursache für diese Störung genauer zu untersuchen, wurde eine *in situ* Hybridisierung durchgeführt. Hierzu wurden 250 pg Geminin-DNA dorsal injiziert. Für den Versuch wurden Albinos verwendet, da diese keine Pigmentzellen besitzen, die eine Färbung überdecken. Mittels Coinjektion des Fluoreszenzfarbstoffs mGFP wurde überprüft, ob in die beiden dorsalen Blastomeren injiziert wurde. Hierzu wurden die injizierten Embryonen zu Beginn der Gastrulation, als eine Unterscheidung zwischen dorsaler und ventraler Hemisphäre erstmals möglich war, unter dem Fluoreszenzstereomikroskop betrachtet. An der Stelle, an der GFP (und somit auch Geminin) injiziert wurde, war ein grünes Leuchten auszumachen. Nur Embryonen, bei denen gewährleistet war, dass die Injektion dorsal erfolgte, wurden für die Hybridisierung verwendet. Als Kontrolle dienten uninjizierte Embryonen.

Um den Einfluss der Geminin-Überexpression auf das einwandernde Mesoderm nachzuweisen, wurde das Expressionsmuster von Chordin betrachtet. Chordin tritt während der Gastrulation im axialen Bereich des einwandernden Gewebes auf. Hierfür stand eine Fluorescein-markierte Chordin-Sonde zur Verfügung. Das Expressionsmuster des Markergens wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten untersucht: zu Beginn der Gastrulation im Stadium 10,25 sowie gegen Ende dieses Entwicklungsabschnitts im Stadium 12,5.

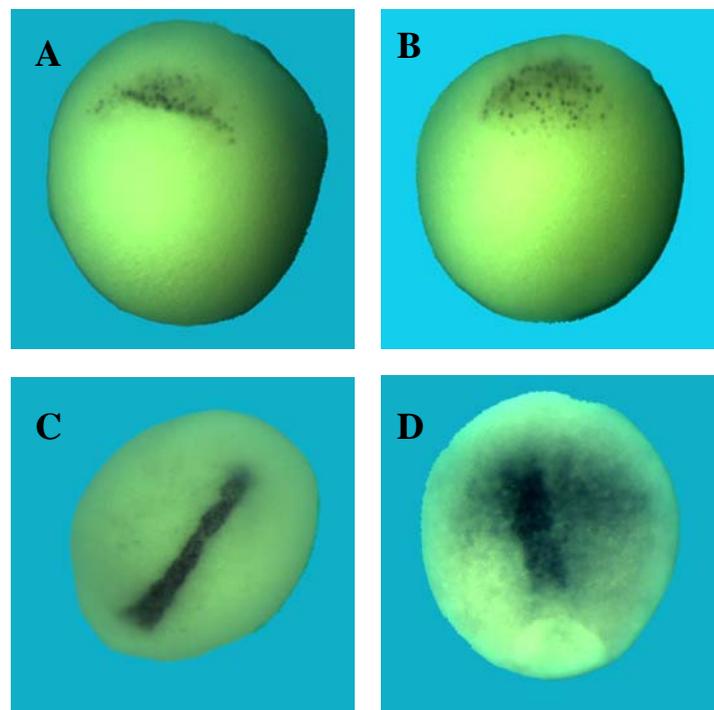


Abb. III-35: Geminin-Überexpression beeinflusst die Struktur des axialen Mesoderms.

Die Expression von Chordin als Marker für axiales Mesoderm, wurde mittels *in situ* Hybridisierung in Wildtyp- sowie Geminin-injizierten Embryonen analysiert. Hierfür wurde eine Fluorescein-markierte Chordin-Sonde verwendet. Es wurden 250 pg Geminin-DNA injiziert.

A: Wildtyp-Embryo, St. 10,25 B: Geminin-injiziert; St. 10,25 C: Wildtyp-Embryo; St. 12,5 D: Geminin-injiziert; St. 12,5

In Wildtypembryonen war Chordin im Stadium 10,25 auf eine scharfe Linie im Bereich des Blastoporus beschränkt (Abb. III-36 A). Bereits zu diesem Zeitpunkt war festzustellen, dass das Expressionsmuster von Chordin bei Geminin-Überaktivierung etwas breiter und konturloser war (Abb. III-36 B).

Zum Ende der Gastrulation beschrieb das Expressionsprofil von Chordin im uninjizierten Embryo einen schmalen Bereich, der sich entlang der dorsalen Mittellinie fast über die gesamte Länge des Embryos erstreckte. In den Geminin-injizierten Embryonen war das axiale Mesoderm deutlich verbreitert, in der Regel nicht scharf vom angrenzenden paraxialen Mesoderm abgegrenzt und häufig verkürzt.

4.4.11 Fehlende Konvergenz geht nicht auf erhöhte Zellteilungsaktivität zurück

Die Erkenntnisse aus den Explantaten und der *in situ* Hybridisierung warfen die Frage nach der Ursache für die Verbreiterung des einwandernden Mesoderms auf. Während der konvergenten Extensionsbewegung verändert das Gewebe lediglich seine Form, die Anzahl der Zellen sowie die Größe der Zellen bleibt konstant. Eine Verbreiterung des Gewebes ohne Verlust der Elongation deutet hingegen auf eine gesteigerte Anzahl an Zellen hin. Über eine Immunfärbung wurde überprüft, ob der Verlust der Konvergenz tatsächlich auf eine erhöhte Zellproliferation zurückzuführen war.

Neben seiner Funktion als Neuralinduktor agiert Geminin außerdem als instabiler Inhibitor der DNA-Replikation, der beim Übergang zwischen Meta- und Anaphase zerstört wird, so dass mitotische Zellteilungen stattfinden können, was eine Steigerung der Zellproliferation nach Geminin-Überaktivierung unwahrscheinlich macht (King *et al.* 1996). Erkenntnisse von McGarry (2002), nach denen Hemmung von Geminin eine reduzierte mitotische Teilungsaktivität zur Folge hat, lassen jedoch gegenteiliges vermuten.

Es wurde eine Immunfärbung durchgeführt, um Zellteilungsaktivität in uninjizierten und Geminin-injizierten Embryonen zu quantifizieren. Hierfür wurden zuvor in MEMFA fixierte und in Methanol aufbewahrte Keller-Explantate verwendet. Für die Immunfärbung wurden Kontroll-explantate der Klasse 2 sowie Explantate aus Geminin-injizierten Embryonen vom Typ 2x ausgewählt. Mittels eines Antikörper gegen phosphoryliertes H3 wurde dieses Protein, das in Zellen vorliegt, die sich gerade in einer mitotischen Teilungsphase befinden, angefärbt und nachgewiesen. Jeder Fleck markiert eine Zelle, die sich gerade teilt.

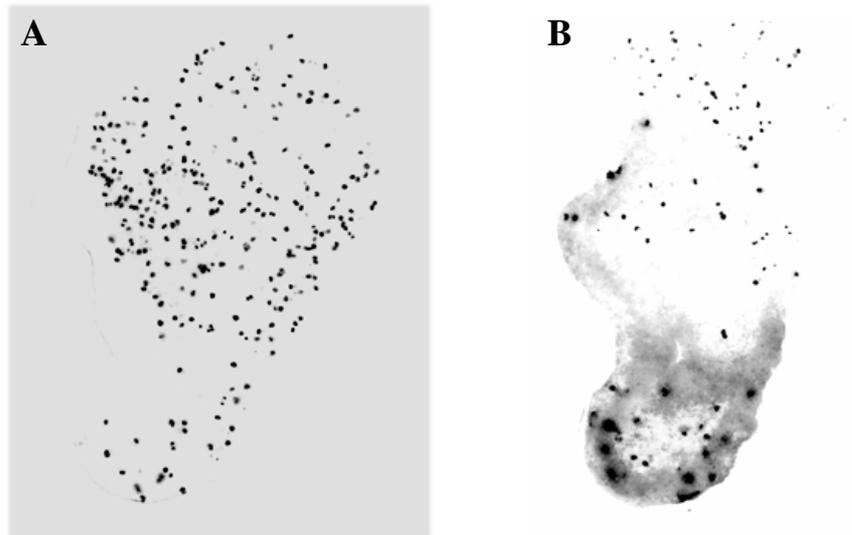


Abb. III-36: Fehlende Konstriktion ist nicht auf gesteigerte Zellproliferation zurückzuführen. Mit Explantaten der Klasse 2 aus uninjizierten Embryonen (A) sowie Explantaten aus Geminin-injizierten Embryonen der Klasse 2x (B) wurde eine Immunfärbung auf phospho-H3 durchgeführt. Die schwarzen Punkte markieren Zellen, die sich in einer mitotischen Teilungsphase befanden.

Die Auszählung wurde an fünf Explantaten aus uninjizierten Embryonen sowie vier Explantaten aus den Geminin-injizierten Embryonen vorgenommen. Dabei wurde im Fall der Kontrollprobe ein Mittelwert von 32,2 sich teilende Zellen, für die Geminin-injizierten ein Wert von 23,8 ermittelt. Obwohl die beiden Werte sich nicht signifikant unterschieden, wie die Durchführung eines studentschen t-Tests zum Signifikanzniveau von 95 % ergab, konnte dennoch ausgeschlossen werden, dass die Verbreiterung der Explantate bei Geminin-Überaktivierung auf eine erhöhte Zellproliferation zurückzuführen war.

IV DISKUSSION

1 Überaktivierung und Hemmung von Wnt-11 hemmt CE

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine detaillierte Analyse durchgeführt, um zu untersuchen, wie sich eine Veränderung der Aktivität des Wnt/PCP-Signalwegs auf konvergente Extensionsbewegung im einwandernden Mesoderm von *Xenopus laevis* auswirkt. Dies erfolgte mittels Mikroinjektion von Substanzen, die die Aktivität dieser Signalkaskade beeinflussen. Die Wanderungsbewegung des Mesoderms wurde anhand der Elongation von Keller-Explantaten untersucht.

Der Wnt/PCP-Signalweg wurde zunächst durch Injektion eines spezifischen gegen XWnt-11 gerichteten Morpholinos (Pandur *et al.* 2002) gehemmt sowie durch Injektion von mRNA eines aktiven XWnt-11-Konstrukts überaktiviert. Sowohl Hemmung als auch Überaktivierung zeigt einen negativen Effekt auf die Elongation von Keller-Explantaten, was eine Störung von konvergenter Extensionsbewegung anzeigt.

Der Wnt/PCP-Signalweg ist essentiell für konvergente Extension des Mesoderms im Verlauf der Gastrulation von Vertebraten, wie Untersuchungen in Zebrafisch und *Xenopus* zeigen. So waren in Zebrafisch-Mutanten, bei denen das für Wnt-11-codierende Genlokus (silberblick) ausgeschaltet war, Extensionsbewegungen im axialen Mesoderm unterbunden (Heisenberg *et al.* 2000). Injektion eines dominant-negativen XWnt-11-Konstrukts in Froschembryonen hatte eine Hemmung von konvergenter Extension in Keller-Explantaten, Explantaten aus animalen Kappen sowie in ganzen Embryonen zur Folge (Tada & Smith 2000).

Es existieren ebenfalls Hinweise, dass eine Überaktivierung des Wnt/PCP-Signalwegs konvergente Extensionsbewegung negativ beeinflusst. So hatte die Injektion von 200 pg XWnt-11-mRNA eine Hemmung in der Elongation von animalen Kappen zur Folge (Djiane *et al.* 2000). Torres *et al.* (1996) stellten nach Injektion von 1 ng eines aktiven XWnt-11-Konstrukts ebenfalls eine Hemmung der konvergenten Extension in Keller-Explantaten fest.

Obwohl aufgrund der veröffentlichten Daten erwartet wurde, dass sowohl Hemmung als auch Überaktivierung des Wnt/PCP-Signalwegs eine Hemmung von konvergenter Extension verursachen, war überraschend, dass bereits eine Menge von 4 pg ektopischer XWnt-11-mRNA die Elongation von Keller-Explantaten hemmt. Dies entspricht lediglich 1/50 bzw. 1/200 der von Djiane *et al.* bzw. Torres *et al.* eingesetzten Konzentrationen. Allerdings existieren bislang keine publizierten Daten, in denen erwähnt wird, wie sich Injektion derart geringer Mengen XWnt-11 auf konvergente Extension auswirkt.

Aus den Überexpressionsstudien ergibt sich, dass der Wnt/PCP-Signalweg nur dann in der Lage ist, konvergente Extension zu fördern, wenn seine Aktivität in einem sehr engen Rahmen reguliert wird. Eine geringfügige Störung des empfindlichen Gleichgewichts führt zu einer Inhibierung dieser Zellbewegungen.

Die Analyse der phänotypischen Auswirkungen nach XWnt-11-Überaktivierung ergab einen charakteristischen Phänotypen, der als „Schnecken-Phänotyp“ bezeichnet wurde. Er ist

gekennzeichnet durch eine starke Verkürzung der antero-posterioren Körperachse, vor allem auf der dorsalen Seite. Tada & Smith (2000) beobachteten nach Injektion eines dominant-negativen XWnt-11-Konstrukts dieselben Auswirkungen. Vergleichbare Phänotypen wurden von Yokota *et al.* (2003) bei Hemmung von Xnr-3 durch Morpholino-Injektion sowie im Fall einer Inhibierung von Dishevelled mittels Injektion eines dominant-negativen Konstrukts (Wallingford & Harland 2000) beobachtet und sind in allen Fällen auf Störungen in der konvergenten Extensionsbewegung zurückzuführen.

Somit wurden die Ergebnisse aus Keller-Explantaten, dass konvergente Extensionsbewegung nach Überaktivierung des Wnt/PCP-Signalwegs gestört ist, in ganzen Embryonen bestätigt. Die phänotypischen Auswirkungen traten jedoch erst bei einer injizierten mRNA-Menge von 125 pg auf, was der 30-fachen Menge der für die Hemmung der konvergenten Extension in Explantaten erforderlichen Menge entspricht.

Bei Injektion eines gegen XPAPC gerichteten Morpholinos ist ebenfalls eine Störung der konvergenten Extensionsbewegung in Explantaten festzustellen, phänotypische Auswirkungen in ganzen Embryonen sind jedoch nicht auszumachen. In diesem Fall liegt das daran, dass zwar durchaus Beeinträchtigungen in der Struktur des Mesoderms auftreten, diese jedoch nicht schwerwiegend genug sind, um im ganzen Embryo von außen sichtbare Spuren zu hinterlassen (Unterseher *et al.* 2004). Es wurde nicht untersucht, ob Injektion einer geringen Menge XWnt-11-mRNA mikroskopisch sichtbare Störungen in der mesodermalen Struktur hervorruft.

In Explantaten wird der Verlauf von konvergenter Extensionsbewegung lediglich bis zum Stadium 12-13 verfolgt. Die phänotypischen Auswirkungen wurden jedoch im Stadium 26 analysiert. Es ist denkbar, dass bei Injektion einer XWnt-11-Konzentration zwischen 4 und 125 pg die injizierte RNA im Verlauf der Embryonalentwicklung so weit abgebaut wurde, dass das Ausmaß der Überexpression mit der Zeit schwach wird, um konvergente Extension negativ zu beeinflussen.

In einem weiteren Versuch wurde die Aktivität des Wnt/PCP-Signalwegs auf weiteren Ebenen moduliert. Als essentielle Komponenten dieser Signalkaskade für konvergente Extension in *Xenopus* wurden der Rezeptor Xfz 7 (Djiane *et al.* 2000, Winklbauer *et al.* 2001), Dishevelled (Tada & Smith 2000) sowie die kleinen GTPasen RhoA und Rac 1 (Habas *et al.* 2003) identifiziert. Durch Injektion von dominant-negativen Konstrukten oder spezifischen Morpholinos wurden diese Effektoren inhibiert. Überaktivierung erfolgte mittels Injektion von (konstitutiv-) aktiven Konstrukten.

Sowohl Hemmung als auch Überaktivierung des Wnt/PCP-Signalwegs hemmte in allen Fällen die Elongation von Keller-Explantaten. Somit wurde zum einen gezeigt, dass auf sämtlichen untersuchten Stufen eine ausbalancierte Aktivität der an der Signalweiterleitung beteiligten Komponenten erforderlich ist, um konvergente Extension zu ermöglichen. Außerdem wurden die Erkenntnisse aus der Literatur bestätigt, dass Xfz 7, Dishevelled, RhoA sowie Rac 1 essentielle Bestandteile des Wnt/PCP-Signalwegs in *Xenopus* sind.

2 XPAPC als Bindeglied zwischen Zelladhäsion und Signaltransduktion

2.1 Einfluss von RhoA und Rac 1 auf den 2x-Phänotyp

Obwohl alle getesteten Komponenten des Wnt/PCP-Signalwegs bei Modulation ihrer Aktivität die erwartete signifikante Hemmung in der Elongation der Keller-Explantate zur Folge haben, wurden Unterschiede in der Auswirkung auf konvergente Extension festgestellt. Insbesondere eine Veränderung der Aktivität der kleinen GTPasen RhoA und Rac 1 führte zu unterschiedlichen Ergebnissen. So wiesen bei Hemmung von RhoA mehr als die Hälfte der vollständig elongierten Explantate einen bislang noch nicht beschriebenen 2x-Phänotypen auf. Die Explantate der Klasse 2x sind dadurch gekennzeichnet, dass Elongation in ihnen nicht beeinträchtigt ist, während sie im Vergleich mit den Klasse 2-Explantaten deutlich verbreitert sind. Dieser Phänotyp ist hingegen bei Überexpression von RhoA äußerst selten. Im Gegensatz zu RhoA hat Überaktivierung von Rac 1 einen höheren Anteil von Explantaten der Klasse 2x zur Folge als eine Inhibierung der kleinen GTPase.

Diese Resultate werfen folgende Fragen auf:

Ist in den Explantaten vom Typ 2x eine selektive Hemmung der Konstriktion gegeben?

Die Tatsache, dass lediglich die Konvergenz, nicht jedoch die Extension in den 2x-Explantaten beeinträchtigt ist, deutet auf eine selektive Hemmung der Konstriktion hin. Dies stünde jedoch im Gegensatz zu der von R. Keller postulierten Definition von konvergenter Extension, nach der Konvergenz und Extension gekoppelt sind.

Beruhet das Auftreten der Explantate vom 2x-Typ auf einer antagonistischen Regulation von RhoA und Rac 1? Welche molekularen Mechanismen liegen einer solchen Regulation zugrunde?

Das gegensätzliche Auftreten des 2x-Phänotyps spricht für eine antagonistische Wirkung der beiden GTPasen. Dies steht im Gegensatz zu einem von Habas *et al.* (2003) entworfenen Modell, nach dem angenommen wird, dass RhoA und Rac 1 unabhängig voneinander über spezifische Effektoren bei der Steuerung von konvergenter Extensionsbewegung in *Xenopus* agieren. Dagegen fanden Tahinci & Symes (2003) durchaus Redundanzen zwischen RhoA und Rac 1. Aus Experimenten in Zellkulturen von Säugerzellen existieren hingegen recht detaillierte Hinweise auf eine antagonistische Regulation der beiden GTPasen (Wang *et al.* 2003, Vial *et al.* 2003, De Wever *et al.* 2004).

Welche zellulären Vorgänge sind die Grundlage für den 2x-Phänotyp?

2.2 In 2x-Explantaten ist selektiv die Konstriktion gehemmt

Parallel zur Analyse des Wnt/PCP-Signalwegs wurden weitere Injektionsexperimente durchgeführt, in denen das Protocadherin XPAPC durch Injektion eines spezifischen Morpholinos bzw. eines dominant-negativen Konstrukts reprimiert wurde. Die Analyse von Keller-Explantaten ergab, dass hierbei ebenfalls der 2x-Phänotyp auftrat. Die Durchführung von *time lapse* Videoaufnahmen ergab, dass bei Hemmung von XPAPC die meisten Zellen nicht in der Lage sind, sich entlang der mediolateralen Achse anzuordnen, was eine koordinierte Wanderung zur dorsalen Mittellinie und somit selektiv Konstriktion im Rahmen von konvergenter Extension verhindert, während die Elongation nicht beeinträchtigt ist.

Hinweise, dass die Definition für konvergente Extension von Keller *et al.* (2000), wonach Konvergenz und Extension gekoppelt sind, nicht uneingeschränkt gilt, erbrachten Erkenntnisse aus Fischen. Bereits vor 12 Jahren wurde festgestellt, dass Konvergenz und Extension während Gastrulationsbewegungen des Prachtkärpflings (Gatt. *Fundulus*) zeitlich voneinander getrennt ablaufen (Trinkaus *et al.* 1992). Aus Versuchen im Zebrafisch ging hervor, dass Elongation der Zellen sowie deren koordinierte Anordnung im Gewebe, zwei wichtige Voraussetzungen für den Ablauf von konvergenter Extension, unabhängig voneinander ablaufen (Marlow *et al.* 2002). In Zebrafisch-*no tail*-Mutanten, in denen der Transkriptionsfaktor Brachyury funktionslos ist, ist Konvergenz, nicht jedoch Elongation beeinträchtigt. Dies spricht ebenfalls dafür, dass die Prozesse im Verlauf der konvergenten Extensionsbewegung unabhängig voneinander ablaufen können (Glickman *et al.* 2003).

Es existieren jedoch prinzipielle Unterschiede im Ablauf von konvergenter Extension im Mesoderm von Fisch und Frosch. Zum einen stellen die wandernden mesodermalen Zellen im Fisch keine geschlossene Einheit dar, wie das im Frosch der Fall ist. Außerdem führt die aktive Wanderung von lateralen mesodermalen Zellen in dorsale Richtung zu einer Verschmälerung des Gewebes, ohne eine Auswirkung auf die Elongation zu haben. Eine derartige Wanderungsbewegung existiert im Frosch nicht. Außerdem kann Konvergenz und Extension in Fischen zeitlich getrennt voneinander ablaufen (zusammengefasst in Myers *et al.* 2002b). Somit können aus der Situation in Fischen nicht unbedingt Rückschlüsse auf die Situation in *Xenopus* gezogen werden.

Das Auftreten der 2x-Explantate sowie die diesem Phänotypen zugrunde liegenden Störungen in den Wanderungsbewegungen der Zellen liefern allerdings starke Hinweise, dass Konvergenz und Extension bei der konvergenten Extensionsbewegung des einwandernden Mesoderms in *Xenopus* unabhängig voneinander ablaufen können. Bislang ist jedoch zu wenig über die genauen Mechanismen bekannt, die dieser Bewegung im Frosch zugrunde liegen, um eine generelle Trennung von Konvergenz und Extension zu postulieren.

2.3 XPAPC wirkt antagonistisch auf Rho und Rac

Die Feststellung, dass koordinierte Zellpolarität im einwandernden Mesoderm nach Hemmung von XPAPC beeinträchtigt ist, entspricht den Defekten, die bei Störungen im PCP-Signalweg in *Drosophila* auftreten (Axelrod *et al.* 1998). Daher wurde vermutet, dass ein Zusammenhang zwischen XPAPC und dem zum *Drosophila*-PCP-Signalweg homologen Wnt/PCP-Weg in Vertebraten besteht. Hierfür spricht auch die Beobachtung, dass Hemmung von XPAPC und Hemmung von RhoA, einem Effektor dieser Signalkaskade, dieselben phänotypischen Auswirkungen in Keller-Explantaten zeigen.

Wie mittels Coinjektionsexperimenten nachgewiesen wurde, ist XPAPC jedoch kein Bestandteil des Wnt/PCP-Signalwegs, da das Protocadherin in Keller-Explantaten eine Hemmung des Wnt/PCP-Wegs nicht ausgleichen kann und im Gegenzug die Hemmung der Konstriktion nach Reprimierung von XPAPC nicht durch Coinjektion von aktiven Komponenten dieses Signalwegs aufgehoben wird. Mittels Analyse von Keller-Explantaten sowie Immunpräzipitationen wurde jedoch gezeigt, dass das Protocadherin in der Lage ist, mit RhoA zu interagieren und es zu aktivieren. Im Gegensatz dazu hat XPAPC einen hemmenden Einfluss auf Rac 1. Aktivierung von RhoA über XPAPC führt zur Aktivierung von JNK.

Aus diesen Erkenntnissen wurde ein Modell entwickelt, das in Abb. IV-1 dargestellt ist und beschreibt, über welchen Signalweg XPAPC Zellpolarität im Rahmen von konvergenter Extension steuert. Dieser Signalweg besitzt dieselben Effektoren wie der Wnt/PCP-Signalweg. Im Gegensatz zum Wnt-Weg, wo die Aktivierung von JNK über Rac 1 erfolgt, während RhoA die Kinase ROK aktiviert (Habas *et al.* 2003), wird im XPAPC-Signalweg JNK über RhoA aktiviert. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass RhoA und Rac 1 durch XPAPC in antagonistischer Weise reguliert werden, während der Wnt/PCP-Signalweg auf beide kleinen GTPasen aktivierend wirkt.

Aufgrund der vorliegenden Daten ist davon auszugehen, dass der Wnt/PCP-Signalweg und XPAPC bei der Signalweiterleitung nicht innerhalb einer Signalkaskade agieren. Inwieweit funktionelle Zusammenhänge zwischen dem Wnt/PCP-Signalweg und dem XPAPC-Signalweg bestehen, ist unklar. Abb. IV-1 erklärt zum einen das Auftreten der Explantate vom Typ 2x bei Hemmung von XPAPC sowie RhoA. Zum anderen liefert es eine Erklärung für die antagonistische Wirkung der kleinen GTPasen RhoA und Rac 1. Dieses Modell liefert außerdem eine Beschreibung, über welche molekularen Mechanismen selektive Regulation der Konstriktion im Rahmen von konvergenter Extension stattfinden könnte.

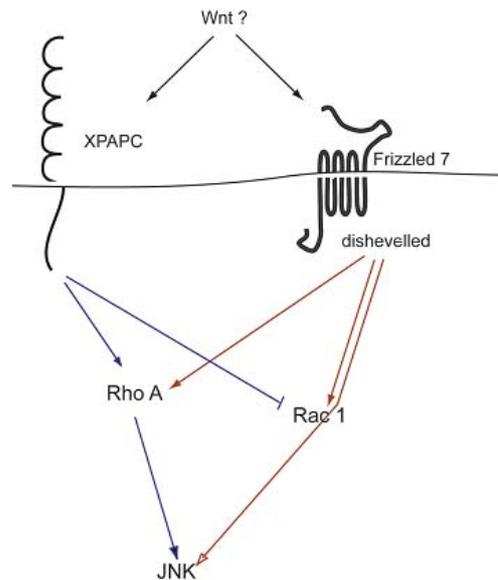


Abb. IV-1: Gegenüberstellung des neu identifizierten Signalwegs und des Wnt/PCP-Signalwegs (aus Unterseher *et al.* 2004). Die Abläufe im Wnt/PCP-Signalweg sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet, der neue Signalweg ist blau eingezeichnet.

In Epithelzellen von Nerzen aktiviert Rac 1 den Faktor Smurf 1, der als Regulator von TGF β -Signalweiterleitung bekannt ist (Kuratomi *et al.* 2004). Dies hat eine Degradierung von RhoA zur Folge (Wang *et al.* 2003). Aus Beobachtungen in Tumorzellen wird ein Mechanismus vorgeschlagen, nach dem Frat-1, ein Zielgen des MAP-Kinase-Signalwegs, durch negative Beeinflussung der Rho-Aktivität zur Aktivierung von Rac 1 beiträgt und somit die Mobilität der Tumorzellen fördert (Vial *et al.* 2003).

Signalaktivierung über MAP-Kinase-Signalwege existiert ebenfalls im frühen *Xenopus*-Embryo, wobei diese Signalkaskaden hauptsächlich für Mesoderminduktion sowie die Bildung von posterioren Strukturen wichtig sind (Hartley *et al.* 1994). Mitglieder der FGF-Familie wie FGF-2, -3, -4 und -9 sind außerdem in Gastrulationsbewegungen involviert (Slack *et al.* 1996). Allerdings existieren keine Hinweise, dass FGFs bei der Regulation von konvergenter Extension in *Xenopus* mit den kleinen GTPasen RhoA oder Rac 1 in Wechselwirkungen treten. Somit wird angenommen, dass die Mechanismen, die der antagonistische Regulation von RhoA und Rac 1 über XPAPC zugrunde liegen, sich prinzipiell von denen unterscheiden, die in Säugerzellen beobachtet wurden.

Inhibierung von RhoA hatte im Gegensatz zur Hemmung von XPAPC ebenfalls eine negative Auswirkung auf die Elongation der Explantate. Dies ist dadurch erklärbar, dass bei Hemmung von RhoA sämtliche Signalkaskaden inhibiert werden, in die RhoA involviert ist. So fördert RhoA konvergente Extension in *Xenopus* über die Aktivierung von ROK (Habas *et al.* 2003). Song *et al.* (2003) beschrieben, dass eine direkte Aktivierung von RhoA über die Kinase PKA ebenfalls notwendig für diese Gewebewegungen ist. Bei Inhibierung von XPAPC ist lediglich die RhoA-abhängige Aktivierung von JNK beeinträchtigt, während sämtliche anderen Signalkaskaden, in die RhoA involviert ist, ablaufen können, was Elongation im Verlauf von konvergenter Extension gewährleistet.

2.4 Einfluss von XPAPC sowie der kleinen GTPasen auf zelluläre Prozesse

Die Vermutung, dass XPAPC sowohl als Zelladhäsionsmolekül als auch als Signalmolekül fungiert, geht auf Experimente von Kim *et al.* (1998) zurück. Eine Reprimierung von XPAPC durch Injektion von Deletionsmutanten hatte eine Hemmung der konvergenten Extensionsbewegung in animalen Kappen zur Folge. Da eine Veränderung der Zelladhäsionsfähigkeit als Ursache für diesen Effekt ausgeschlossen wurde, nahmen Kim *et al.* an, dass XPAPC ebenfalls eine Rolle in den an konvergenter Extension beteiligten Signalkaskaden einnimmt.

Abweichend von den Resultaten von Kim *et al.* war in Keller-Explantaten keine Hemmung der Elongation feststellbar, wenn XPAPC durch Injektion eines dominant negativen Konstrukts bzw. durch Morpholino-Injektion funktionslos war.

In animalen Kappen wird durch Zugabe von Mesoderminduktoren wie Aktivin das ektodermale Gewebe dazu angeregt, sich in Mesoderm umzubilden. Obwohl TGF β -Faktoren wie Aktivin ausreichend sind, um mesodermales Gewebe zu induzieren, hängt die weitere Strukturierung und Differenzierung des Mesoderms von weiteren Faktoren ab, die in animalen Kappen nicht präsent sind. In Keller-Explantaten hat die Induktion von Mesoderm sowie die Bildung des Spemann-Organisators bereits endogen stattgefunden. Aus diesem Grund bestehen zwischen den beiden Systemen grundlegende Unterschiede, so dass abweichende Ergebnisse nicht ungewöhnlich sind.

Die Tatsache, dass Injektion von M-XPAPC, in welchem ein Großteil der zytoplasmatischen Domäne deletiert ist, Elongation von Keller-Explantaten leicht inhibierte, geht möglicherweise auf eine von Kim *et al.* beobachtete Steigerung der Zelladhäsionsfähigkeit nach M-XPAPC-Überexpression zurück.

Wichtig für das Verständnis der genauen Abläufe von konvergenter Extensionsbewegung ist die Kenntnis von den Mechanismen, die den zellulären Vorgängen bei dieser Zellbewegung, nämlich Modulation der Zelladhäsionsfähigkeit sowie des Zytoskeletts, zugrunde liegen.

Für konvergente Extension ist sowohl Zell-Zell-Adhäsion als auch Zell-Matrix-Adhäsion bedeutend (Davidson *et al.* 2002). Es wurde beschrieben, dass die für die Zell-Matrix-Adhäsion wesentliche Interaktion von Fibronectin und Integrin einen Einfluss auf Cadherin-gesteuerte Zelladhäsion ausübt (Marsden & DeSimone 2003). JNK, der Effektor der über XPAPC aktivierten Signalkaskade, die für die Fähigkeit zur Konstriktion bedeutend ist, wurde bereits als essentiell für konvergente Extension beschrieben (Yamanaka *et al.* 2002). JNK ist in die Steuerung der Zell-Matrix-Adhäsion involviert, indem es in der Lage ist, Paxillin, einen Bestandteil in Fokaladhäsionen, zu phosphorylieren und hierdurch Zell-Matrix-Adhäsion zu fördern (Huang *et al.* 2003). Auf diese Weise schafft die über das Zelladhäsionsmolekül XPAPC aktivierte Signalkaskade die Voraussetzungen, um Zellmigration und Zell-Matrix-Adhäsion zu koordinieren.

RhoA und Rac 1 sind beide verantwortlich für die Bildung und die Aktivität der Zellfortsätze, die für die Vorgänge bei Zellinterkalation bedeutend sind (Keller 2002). Allerdings weisen sie

Unterschiede in der Steuerung des Zellverhaltens auf. So fördert Rac 1 Zelladhäsion an den *adherens junctions*, während RhoA eher Zellbeweglichkeit erhöht (zusammengefasst in Kaibuchi 1999). Eine weitere Grundvoraussetzung für konvergente Extension ist eine Modulation des Zytoskeletts, um die Etablierung einer bipolaren Zellpolarität zu gewährleisten, was für gerichtete Zellinterkalation und damit koordinierte Wanderungsbewegungen erforderlich ist (Keller 2002). Durch die Bildung von *stress fibers* ist RhoA in der Lage, derartige Veränderungen im Aktinzytoskelett zu bewirken (Kaibuchi *et al.* 1999).

Auf diese Weise schaffen die kleinen GTPasen die zellulären Voraussetzungen für die Fähigkeit der Zellen, im Rahmen von konvergenter Extension koordiniert zu wandern. Insbesondere die besondere Rolle, die RhoA bei diesen Vorgängen spielt, dürfte essentiell für die Ausbildung von koordinierter Zellpolarität zur Gewährleistung von Konstriktion sein.

3 Wechselwirkungen zwischen kanonischem und Wnt/PCP-Signalweg

3.1 Xnr-3 und XWnt-11 agieren nicht in einer linearen Kaskade

Wie der Wnt/PCP-Signalweg ist auch der kanonische Wnt-Signalweg essentiell für konvergente Extension in *Xenopus*, indem er über die Aktivierung des Zielgens Xnr-3 diese Zellbewegung fördert (Kühl *et al.* 2001). Neben der Aufklärung von Zusammenhängen zwischen Signaltransduktion und den konvergenter Extension zugrunde liegenden zellulären Prozessen ist ebenfalls eine Vorstellung darüber, wie die verschiedenen beteiligten Signalkaskaden interagieren, essentiell für das Verständnis dieses Prozesses.

Es gilt als gesichert, dass die drei an konvergenter Extension beteiligten Signalkaskaden miteinander in Wechselwirkung treten. Dank der Erkenntnisse von Kühl *et al.* (2001) existiert eine detaillierte Vorstellung, wie Interaktion zwischen dem kanonischen und dem Wnt/Ca²⁺-Signalweg abläuft. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob der kanonische und der Wnt/PCP-Signalweg ebenfalls miteinander interagieren.

Mittels RT-PCR-Experimenten wiesen Yokota *et al.* (2003) nach, dass die Expression des Transkriptionsfaktors Xbra, der bedeutend für Gastrulationsbewegungen sowie für die Differenzierung des posterioren Mesoderms und des Notochords ist, durch Überexpression von Xnr-3 aktiviert wird. Weitere Hinweise für eine Xnr-3-abhängige Regulation von Xbra erbrachte die Feststellung, dass Expression von Xbra in der dorsalen Mittellinie bei Funktionslosigkeit von Xnr-3 reprimiert ist. XWnt-11 wurde in einer anderen Publikation (Tada & Smith 2000) als direktes Zielgen von Xbra identifiziert.

Zusammengefasst lassen die Erkenntnisse aus den beiden Publikationen vermuten, dass Xnr-3 und XWnt-11 Komponenten einer linearen Signalkaskade darstellen, wobei Xnr-3 über Xbra die Aktivierung von XWnt-11 bewirkt. Dies lässt darauf schließen, dass der Wnt/PCP-Weg bei der Steuerung von konvergenter Extension unterhalb des kanonischen Signalwegs agiert.

In Echtzeit-RT-PCR-Experimenten hatte die Hemmung des kanonischen Wnt-Signalwegs durch Injektion eines X Lef-1 bzw. Xnr-3-Morpholinos jedoch keinen Einfluss auf die Expression von XWnt-11. Eine Analyse von Keller-Explantaten ergab, dass eine durch Injektion eines X Lef-1 - bzw. Xnr-3-Morpholinos hervorgerufene Hemmung der Elongation in den Explantaten nicht durch Coinjektion von XWnt-11 wieder aufgehoben werden konnte. Die eingesetzte XWnt-11-Konzentration wurde zwischen 4 pg und 500 pg variiert, wodurch sichergestellt wurde, dass eine Überaktivierung des Wnt/PCP-Signalwegs nach XWnt-11-Coinjektion nicht eine Wiederherstellung der konvergenten Extension verhindert.

Die Erkenntnisse aus der PCR-Reaktion sowie die Analyse der Keller-Explantate sprechen gegen die Hypothese, wonach Xnr-3 innerhalb einer linearen Signalkaskade den Liganden XWnt-11 und somit den Wnt/PCP-Signalweg aktiviert.

3.2 Kanonischer und Wnt/PCP-Signalweg konkurrieren um Dishevelled

Um die Frage zu klären, ob Wnt/PCP- und kanonischer Wnt-Signalweg unabhängig voneinander agieren oder ob Interaktionen zwischen ihnen bestehen, wurden weitere Injektionsexperimente durchgeführt. Dabei wurden beide Signalwege parallel aktiviert, indem XWnt-11-mRNA zusammen mit mRNA verschiedener Komponenten des kanonischen Wnt-Signalwegs coinjiziert wurde. Es zeigte sich, dass Coinjektion von X Lef-1 sowie Xnr-3 zusammen mit XWnt-11 keinen positiven Effekt auf die Elongation der Explantate hat. Coinjektion von XWnt-8 sowie β -Catenin hingegen ist in der Lage, die Hemmung der Elongation aufzuheben.

Aus diesen Resultaten lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen: Eine Interaktion zwischen den beiden Signalwegen ist wahrscheinlich. Die Tatsache, dass Überaktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs erforderlich ist, um die negativen Auswirkungen von XWnt-11-Überaktivierung aufzuheben, spricht dafür, dass eine Konkurrenzsituation um einen Effektor besteht. Da Coinjektion von aktivem X Lef-1 sowie Xnr-3 keine positiven Auswirkungen hat, ist eine Interaktion unterhalb von β -Catenin nicht anzunehmen und daher ein direkter Zusammenhang zwischen dem Wnt/PCP-Signalweg und Xnr-3 bzw. X Lef-1 unwahrscheinlich.

Am wahrscheinlichsten ist eine Interaktion zwischen den beiden Signalwegen auf der Ebene von Dishevelled. Dieses Protein ist sowohl ein Bestandteil des Wnt/PCP- als auch des kanonischen Wnt-Signalwegs. Es besitzt mit der DEP-, der DIX- sowie der PDZ-Domäne drei Domänen, an denen eine Interaktion mit einer Vielzahl von Partnern stattfinden kann. Ein Modell zur Wirkungsweise von Dishevelled geht davon aus, dass das Protein im Zentrum eines großen, variabel zusammengesetzten Multienzymkomplexes steht, wobei über spezifische Effektoren geregelt wird, welche Prozesse aktiviert werden (zusammengefasst in Wharton 2003). Neben der Anwesenheit von spezifischen Interaktionspartnern spielt die subzelluläre Lokalisation von Dishevelled ebenfalls eine Rolle bei der Steuerung von selektiven Signalantworten, wobei dies für Vertebraten und Evertrebraten gleichermaßen gilt.

In *Drosophila* ist der Rezeptor Fz 1 in der Lage, sowohl den PCP-Signalweg als auch den kanonischen Wnt-Signalweg zu aktivieren, während Fz 2 ausschließlich im kanonischen Signalweg agiert. Die subzelluläre Lokalisation von Fz 1 entscheidet darüber, welcher Signalweg aktiviert wird. Lagert sich der Rezeptor am apikalen Ende der Zelle an, so wird der PCP-Signalweg aktiviert, während Aktivierung des Wg/Wnt-Signalwegs entlang der basal-apikalen Achse der Zelle stattfindet. Eine Konzentration von Fz 1 auf der apikalen Seite hat eine Hemmung des kanonischen Wnt-Wegs zur Folge. Dabei zieht apikal lokalisiertes Fz 1 das Protein Dishevelled zur apikalen Seite, wo es für den kanonischen Wnt-Signalweg nicht mehr zur Verfügung steht (Wu *et al.* 2004).

Aus Untersuchungen von Axelrod *et al.* (1998) geht hervor, dass in *Xenopus* eine Lokalisation von Dishevelled an der Zellmembran essentiell für eine Aktivierung des Wnt/PCP-Signalwegs ist, während das Protein bei Inaktivierung dieses Signalwegs ausschließlich in zytoplasmatischen Vesikeln vorliegt. Wallingford *et al.* (2000) stellten anhand von Analysen an animalen Kappen fest, dass eine Lokalisation von Dishevelled an der Zellmembran essentiell für konvergente Extensionsbewegung ist.

In der Literatur existieren Hinweise, dass auch in *Xenopus* der für die Aktivierung des Wnt/PCP-Signalwegs verantwortliche Frizzled-Rezeptor Xfz 7 für die Lokalisierung von Dishevelled an der Membran verantwortlich ist. Dieser Rezeptor besitzt eine PDZ-Bindesequenz (Holmen *et al.* 2002). Eine Bindung von Dishevelled mit Xfz 7 über seine DEP-Domäne stünde im Einklang mit der Tatsache, dass die DEP-Domäne essentiell für das Wirken von Dishevelled im Wnt/PCP-Signalweg ist (Wallingford *et al.* 2000). Eine wichtige Rolle für die Anlagerung von Dishevelled an der Zellmembran spielt möglicherweise das zur HSPG-Familie gehörige extrazelluläre Membranprotein *Xenopus* Glypican 4 (XGly 4). Es wurde festgestellt, dass XGly 4 mit Xfz 7 in Interaktion tritt. Außerdem hat Inhibierung von XGly 4 zur Folge, dass sich Dishevelled nicht mehr an die Membran anlagern kann (Ohkawara *et al.* 2003).

Eine genauere Analyse zur Lokalisation von Dishevelled bei unterschiedlicher Aktivität des Wnt/PCP- sowie des kanonischen Wnt-Signalwegs ergab ein differenzierteres Bild als von Axelrod *et al.* (1998) bzw. Wallingford *et al.* (2000) formuliert (A. Schambony, persönliche Kommunikation). Im Wildtyp-Zustand besteht ein Gleichgewicht zwischen membranständigem und zytoplasmatischem Dishevelled. Eine Überaktivierung des Wnt/PCP-Signalwegs hat eine Konzentration von Dishevelled an der Membran zur Folge, während parallele Überaktivierung des Wnt/PCP- sowie des kanonischen Wnt-Signalwegs zur Wiederherstellung des Wildtyp-Zustandes führt.

Widersprüche zu den Erkenntnissen von Axelrod *et al.* und Wallingford *et al.* (2000) bestehen darin, dass eine Überaktivierung des Wnt/PCP-Signalwegs keine hemmende Auswirkung auf die konvergente Extension zeigen dürfte, wenn eine Lokalisierung von Dishevelled an der Zellmembran konvergente Extension fördern würde. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse aus der Analyse der Keller-Explantate und unterstützt durch die Erkenntnisse zur subzellulären Lokalisation von Dishevelled wird folgendes erweitertes Modell zur Interaktion von Wnt/PCP- und kanonischem Wnt-Signalweg vorgeschlagen (Abb. IV-2):

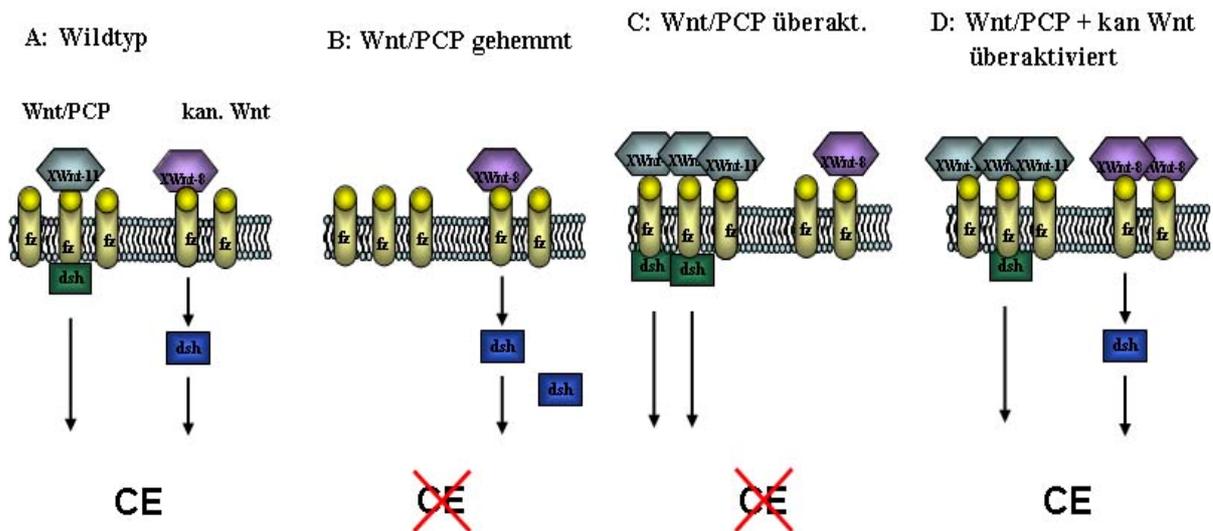


Abb. IV-2: kanonischer Wnt-Weg und Wnt/PCP-Signalweg konkurrieren um Dishevelled.

A: Wildtyp-Zustand B: Wnt/PCP-Signalweg gehemmt C: Wnt/PCP-Signalweg überaktiviert D: Parallele Überaktivierung von Wnt/PCP- und kanonischem Wnt-Signalweg. Der Wnt/PCP-Signalweg ist in jeder Teilabbildung links, der kanonische Wnt-Weg rechts dargestellt. Die blaue Farbe repräsentiert zytosolatisches Dishevelled, membrangebundenes Dishevelled ist grün gekennzeichnet. Aktivität eines Signalweg wird durch Pfeile signalisiert. CE steht für konvergente Extension (*convergent extension*).

Im Wildtyp-Zustand besteht ein ausgewogenes Verhältnis zwischen membrangebundenem und im Zytoplasma vorliegendem Dishevelled. Während bei Hemmung des Wnt/PCP-Signalwegs sämtliche Dishevelled-Moleküle im Zytoplasma vorliegen, so führt Überaktivierung der Signalkaskade zu einer Konzentration von Dishevelled an der Membran. Sowohl Überaktivierung als auch Reprimierung der Signalkaskade führt zu einer Inhibition von konvergenter Extension. Im Fall einer Überaktivierung des Wnt/PCP-Signalwegs liegt dies daran, dass Dishevelled dem kanonischen Wnt-Signalweg nicht mehr zur Verfügung steht. Das Protein bindet in diesem Signalweg über den Cofaktor Frat-1 die Kinase GSK 3 β , wodurch verhindert wird, dass GSK 3 β den β -Catenin-Degradationskomplex aktivieren kann (zusammengefasst in Polakis 2000). Fehlt Dishevelled im kanonischen Wnt-Signalweg, so wird β -Catenin degradiert, der Signalweg ist inaktiv und konvergente Extension wird inhibiert. Durch parallele Überaktivierung von beiden Signalwegen wird sichergestellt, dass genügend Dishevelled für den kanonischen Wnt-Signalweg rekrutiert wird, so dass nun beide Signalwege aktiv sind und konvergente Extension stattfinden kann.

Nach diesem Modell herrscht demnach eine Konkurrenzsituation zwischen dem Wnt/PCP- und dem kanonischen Wnt-Signalweg um das in der Zelle vorhandene Dishevelled. Nur wenn ein Gleichgewicht zwischen membrangebundenem und zytosolatischem Dishevelled besteht und hierdurch die Funktionsfähigkeit von beiden Signalwegen gewährleistet ist, dann findet konvergente Extension statt.

Neben einer Erklärung der Resultate aus den Coinjektionsexperimenten liefert dieses Modell ebenfalls einen Mechanismus, worauf die beobachtete Inhibition von konvergenter Extension bei Überaktivierung des Wnt/PCP-Signalwegs zurückzuführen sein könnte.

4 Xnr-3

4.1 Bestätigung der essentiellen Rolle von Xnr-3 bei konvergenter Extension

Das zur TGF β -Superfamilie gehörige Xnr-3 ist ein direktes Zielgen des kanonischen Wnt-Signalwegs (McKendry *et al.* 1997) und ist essentiell für konvergente Extension (Kühl *et al.* 2001). Bislang ist jedoch relativ wenig bekannt, über welche Effektoren dieses Protein konvergente Extension fördert. Nach den gewonnenen Daten scheint unwahrscheinlich, dass dies über eine Aktivierung des Wnt/PCP-Signalwegs geschieht.

Ein wichtiges Hilfsmittel, um die Funktionsweise von Xnr-3 bei der Förderung von konvergenter Extension zu untersuchen, ist der Einsatz eines Morpholino-Oligonukleotids, mit dem die Translation von Xnr-3 spezifisch gehemmt wird. Hierzu wurde ein neues Morpholino synthetisiert, das zunächst auf seine Funktionalität und Spezifität überprüft wurde. Dies erfolgte anhand der beobachteten Phänotypen, mittels Analyse der Elongation von Keller-Explantaten sowie *in vitro* durch Westernblot-Analyse.

Als charakteristische Phänotypen nach Injektion des spezifischen Xnr-3-Morpholinos traten offene Rücken, eine verkürzte antero-posteriore Körperachse sowie Reduktion von anterioren Strukturen auf. Eine vergleichbare Analyse der phänotypischen Auswirkungen einer Xnr-3-Morpholino-Injektion erbrachten dieselben Phänotypen (Yokota *et al.* 2003). Offene Rücken stellen einen unspezifischen Phänotyp dar, der auf eine fehlende Differenzierung des Notochords oder auf spezifische Defekte bei der Bildung des Neuralrohrs hindeutet. Allerdings handelt es sich bei diesem Phänotypen häufig auch um eine sekundäre Auswirkung von gestörter konvergenter Extension (Wallingford & Harland 2000). Eine verkürzte antero-posteriore Körperachse ist nach Wallingford & Harland eine spezifische Folge von Störungen in der konvergenten Extensionsbewegung des Mesoderms. Bei der Reduktion von anterioren Strukturen liegt jedoch kein unmittelbarer Zusammenhang zur Beeinträchtigung von konvergenter Extension vor. Dieser Phänotyp wurde auch nicht beobachtet, wenn konvergente Extension durch Hemmung bzw. Überaktivierung des Wnt/PCP-Signalwegs gestört ist (Tada & Smith 2000, Wallingford & Harland 2000, diese Arbeit). Nach Yokota *et al.* (2003) wird vorgeschlagen, dass die Hemmung antagonistischer Strukturen bei Inhibierung von Xnr-3 auf den Antagonismus zwischen BMP-4 und Xnr-3 zurückzuführen ist. Im Gegensatz zum Wildtypzustand, wo Xnr-3 BMP-4 durch direkte Bindung inhibiert (Hansen *et al.* 1997), hat das Fehlen von Xnr-3 eine Überaktivierung von BMP-4 zur Folge. Es wurde bereits zuvor gezeigt, dass Überaktivierung von BMP-4 zu einem Verlust von anterioren Strukturen führt (Jones *et al.* 1996).

Im Unterschied zu den von Yokota *et al.* (2003) beschriebenen phänotypischen Auswirkungen trat hier bei Injektion des Xnr-3-Morpholinos in keinem Fall die bereits als „Schnecken-Phänotyp“ charakterisierte extreme Verkürzung der dorsalen Seite auf. Eine mögliche Erklärung liegt darin, dass unter Umständen in unterschiedliche Bereiche des Embryos injiziert wurde.

Im Verlauf der Injektionsexperimente wurde festgestellt, dass Morpholinos ihre Wirkung auf konvergente Extension nur entfalten, wenn sie in die dorsale Marginalzone injiziert werden, wo später die Steuerung von Wanderungsbewegungen des Mesoderms über den Spemann-Organisator erfolgt. Dies wurde damit erklärt, dass die Fähigkeit der Morpholinos, sich in der injizierten Zelle auszubreiten, geringer als bei mRNA ist. Nach Experimenten von Wallingford und Harland (2000) führt im Achtzellstadium Injektion in den Bereich des Äquators, aus dem sich später dorsales Mesoderm bildet, wie in unserem Fall, zu einer Verkürzung der anterior-posterioren Körperachse. Injektion in den animalen Bereich, aus dem das Neuroektoderm hervorgeht, hat aufgrund von Störungen in der konvergenten Extension des dorsalen Ektoderms die bei Yokota *et al.* beobachtete extreme Verkürzung der dorsalen Seite zur Folge.

Die Ergebnisse aus der Analyse der phänotypischen Auswirkungen sowie die Tatsache, dass Injektion des Xnr-3-Morpholinos in Keller-Explantaten eine Hemmung der Elongation zur Folge hatte, bestätigten die Erwartungen, dass die Inhibierung von Xnr-3 negative Auswirkungen auf konvergente Extensionsbewegung zur Folge hat. Somit wurde die Funktionalität des Morpholinos nachgewiesen. Die Tatsache, dass Xnr-3-Coinjektion die Inhibierung von konvergenter Extension in Keller-Explantaten sowie in ganzen Embryonen aufheben konnte, zeigt, dass das Morpholino Xnr-3 spezifisch inhibiert. Funktionalität und Spezifität des Morpholinos wurden *in vitro* durch Westernblot-Analyse verifiziert.

4.2 Die Regulation von Xnr-3 im Vergleich zu Siamois und Twin

Bislang wurden drei Organisator-Gene als Zielgene des Wnt/-Catenin-Signalwegs identifiziert, die im frühen *Xenopus*-Embryo aktiv sind: Xnr-3 sowie die beiden eng verwandten Transkriptionsfaktoren Siamois und Twin. Bei allen drei Genen wurde nachgewiesen, dass sie direkt durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg über Lef/TCF-Transkriptionsfaktoren aktiviert werden (Brannon & Kimelman 1996, Laurent *et al.* 1997, McKendry *et al.* 1997).

Mittels Echtzeit-RT-PCR wurde die Veränderung der Expression dieser drei Zielgene nach Modulation der Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs miteinander verglichen. Dabei hatte Überaktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch Injektion von XWnt-8 sowie β -Catenin in allen drei Fällen eine deutliche Aktivierung der Expression zur Folge, wodurch bestätigt wurde, dass es sich bei allen drei Genen um Zielgene des kanonischen Wnt-Signalwegs handelt. Allerdings fiel die Aktivierung der Siamois- und Xnr-3-Expression wesentlich stärker aus als dies bei Twin der Fall war. Hemmung des Signalwegs durch Injektion eines XLef-1-Morpholinos hatte einen Rückgang der Twin- sowie der Xnr-3-Expression um mehr als zwei Drittel zur Folge, während die Expression von Siamois kaum beeinflusst wurde.

In der Promotorregion von Xnr-3 wurde ein Lef/TCF-Bindemotiv identifiziert und *in vitro* nachgewiesen, dass der Transkriptionsfaktor XLef-1 mit dem Promotor in Interaktion tritt (McKendry *et al.* 1997). Eine Promotoranalyse des Transkriptionsfaktors Twin mit derselben

Methode erbrachte das gleiche Resultat (Laurent *et al.* 1997). Auch im Promotor von Siamois befindet sich ein Bindemotiv für Lef/TCF-Transkriptionsfaktoren. Im Unterschied zu den beiden anderen Genen wurde bei Siamois eine Aktivierung über Tcf-3 festgestellt (Fan *et al.* 1998). Normalerweise fungiert Tcf-3 als Transkriptionsrepressor (zusammengefasst in Bienz 1998). Bei Anwesenheit von β -Catenin ist der Transkriptionsfaktor jedoch in der Lage, Expression von Zielgenen wie Siamois zu aktivieren (Brannon *et al.* 1997). Dies erfolgt jedoch nicht durch direkte Interaktion, sondern über den Cofaktor XCtBP. (Brannon *et al.* 1999). Weitere Hinweise darauf, dass Siamois im Gegensatz zu Xnr-3 kein direktes Zielgen von XLef-1 ist, erbrachten Analysen von Keller-Explantaten. Daraus ging hervor, dass Xnr-3, nicht aber Siamois, konvergente Extension nach Injektion eines dominant-negativen Lef-1-Konstrukts wieder herstellen konnte (Kühl *et al.* 2001).

Die Resultate aus der RT-PCR-Reaktion bestätigen die Hinweise aus der Literatur, wonach Xnr-3 und Twin direkt über den Transkriptionsfaktor XLef-1 aktiviert werden, während dieser Faktor scheinbar nicht notwendig ist, um Siamois zu aktivieren.

Eine Ursache für die deutlich schwächere Aktivierung der Twin-Expression bei Überaktivierung des Signalwegs könnte darin liegen, dass die Induzierbarkeit des Twin-Promoters durch Lef/TCF-Signale deutlich unter der des Siamois- bzw. Xnr3-Promoters liegt. Zur genaueren Analyse der Unterschiede in der Lef/TCF-abhängigen Regulation dieser drei Gene wäre es erforderlich, die Veränderung der Genexpression bei Überexpression bzw. Reprimierung von weiteren Mitgliedern der Lef/TCF-Transkriptionsfaktoren mittels Echtzeit RT-PCR zu bestimmen. Hierbei wäre zum Beispiel von Interesse, inwieweit andere Faktoren der Lef/TCF-Familie wie Tcf-1 und Tcf-4, die ebenfalls im Verlauf der Gastrulation in *Xenopus* aktiv sind, die Expression dieser drei Gene beeinflussen. Da die Regulation von Xnr-3, Siamois und Twin nur am Rande von Interesse für diese Arbeit war, wurde allerdings auf eine detaillierte Untersuchung verzichtet.

4.3 Suche nach Xnr-3-Zielgenen mittels substraktivem Screen

Obwohl als gesichert gilt, dass Xnr-3 sowohl bei der Neuralinduktion als auch bei der Förderung von konvergenter Extension eine wichtige Rolle einnimmt, ist relativ wenig bekannt, über welche Mechanismen und Effektoren Xnr-3 wirkt. Obwohl beschrieben wurde, dass Xnr-3 einen positiven Einfluss auf die Expression von mesodermalen (Chordin, Gooseoid) sowie neuralen Markern wie Engrailed 2 und N-CAM hat (Yokota *et al.* 2003), ist nichts über den zugrunde liegenden Mechanismus bekannt. Einzig im Fall des durch Xnr-3 aktivierten Transkriptionsfaktors Xbra existiert eine konkrete Vorstellung, wie Xnr-3 die Regulation von Xbra aktiviert (Yokota *et al.* 2003). Allerdings wurde bislang noch kein direktes Zielgen von Xnr-3 identifiziert.

Mittels eines substraktiven Screens wurde versucht, weitere über Xnr-3 regulierten Gene aufzuspüren, wobei die Identifizierung eines direkten Zielgens die aufschlussreichsten Erkenntnisse über die Wirkungsweise von Xnr-3 liefern würde. Die Grundlage dieses Ansatzes war, Gene, deren Expression durch Xnr-3 beeinflusst wird, selektiv zu

amplifizieren. Im Anschluss wurden zwei cDNA-Bibliotheken angelegt. Bibliothek I besteht aus etwa 2000 Klonen, die über Xnr-3 aktivierte Gene enthalten. In Bibliothek II sind Gene vertreten, die durch Xnr-3 reprimiert werden. Diese Bibliothek verfügt über ca. 1500 Klone.

Das Ziel beim Durchsuchen einer DNA-Bibliothek nach bestimmten Genen besteht darin, durch Wahl geeigneter Methoden so viele Gene wie möglich auszuschließen, um sich für eine genauere Analyse auf wenige Gene konzentrieren zu können.

Es ist davon auszugehen, dass Gene in den angelegten Bibliotheken vorhanden sind, die nicht Xnr-3-abhängig reguliert werden. Es wurde versucht, solche ‚Falsch-Positiven‘ mittels radioaktiver Hybridisierung zu detektieren, wofür DNA- bzw. RNA-Sonden aus dem komplementären Ansatz verwendet wurden. Die ‚Falsch-Positiven‘ sollten durch ein stärkeres Hybridisierungssignal von den gesuchten Klonen mit differentiell exprimierten Genen unterscheidbar sein. Allerdings ergaben alle getesteten Klone ein nahezu gleich starkes Signal.

Die Hybridisierung erfolgte im Prinzip wie bei der Durchführung eines gleichartigen substraktiven Screens mit Ösophaguskarzinom-Zelllinien (von Stein *et al.* 1997). Auch in dieser Publikation wurde das Problem von starken Hintergrundsignalen beschrieben. Von Stein *et al.* lösten dieses Problem, indem sie das in den Klonen enthaltene cDNA-Fragment mittels Kolonie-PCR amplifizierten, wodurch spezifische Bindung begünstigt werden. Im Verlauf dieser Arbeit wurde versucht, durch Hybridisierung von isolierter Plasmid-DNA unspezifische Bindungen zu vermeiden, was jedoch nicht gelang.

Die fehlende Spezifität könnte darin begründet sein, dass nach wie vor störende genomische Bakterien-DNA in der Probe enthalten war. Eine weitere denkbare Ursache wäre, dass aufgrund der Position der Primer bzw. der Bindestelle für die RNA-Polymerase nicht zu vermeiden war, dass ein Abschnitt des Vektors mit amplifiziert wurde. Dieser Bereich hatte im Fall der DNA-Sonde eine Gesamtlänge von 150 Basen, bei der Herstellung der RNA-Sonde wurden ungefähr 100 Basen Vektorsequenz mit amplifiziert. Möglicherweise sind diese Bereiche aus der Sondenlösung in der Lage, an homologe Abschnitte in der auf der Membran befindlichen Plasmid-DNA aus den Klonen zu binden, was zu einem Hybridisierungssignal bei sämtlichen Klonen führt.

Ein weiterer Ansatz bestand darin, Klone zu identifizieren, die bereits bekannte Xnr-3-abhängig regulierte Gene wie Xbra, N-CAM oder Engrailed 2 enthielten. Engrailed 2 sowie N-CAM werden in *Xenopus* erst im Verlauf der Neurulation exprimiert (Eizema *et al.* 1994, Kintner & Melton 1987) und sind daher in der cDNA-Bibliothek aus einem frühen Gastrulationsstadium nicht nachweisbar. Xbra hingegen ist bereits während der Gastrulation aktiv. So wurde angenommen, dass Xbra aufgrund seiner Xnr-3-abhängigen Aktivierung im Verlauf des substraktiven Screens amplifiziert wurde und demnach in einer Anzahl von Klonen auftreten müsste.

Allerdings wurde mittels radioaktiver Hybridisierung von 574 verschiedenen Klonen lediglich einer identifiziert, der höchstwahrscheinlich ein Xbra-Fragment enthielt. Es wurde zwar publiziert, dass bei Analyse mittels Echtzeit-RT-PCR die Inhibierung von Xnr-3 durch

Morpholino-Injektion keine negative Auswirkung auf die Xbra-Expression hat (Yokota *et al.* 2003), allerdings wurde dieser Versuch mit mRNA aus ganzen Embryonen durchgeführt. Allerdings umfasst das Expressionsmuster von Xbra während der Gastrula weite Bereiche des Embryos, in denen Xnr-3 nicht aktiv ist, so dass selbst im Fall einer Herunterregulation nach wie vor Xbra-Expression nachweisbar ist. Dieser Versuch wurde unter Verwendung von Keller-Explantaten anstelle von ganzen Embryonen wiederholt (Klein 2004), wodurch weitgehend der Bereich des Embryos isoliert wurde, in dem Xnr-3 aktiv ist. Allerdings erbrachte auch dieser Versuchsansatz keine Reduktion der Xbra-Expression nach Injektion des Xnr-3-Morpholinos. Dies würde erklären, warum lediglich einer von 574 Klonen ein Fragment dieses Gens enthielt.

Eine weitere Möglichkeit, Informationen über die in den Klonen enthaltenen Fragmente zu erhalten, besteht in einer Sequenzierung. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass mittels Datenbankrecherche eine exakte Information über die in der DNA-Bibliothek enthaltenen Gene erhalten werden kann, falls die Sequenz Homologien zu einem bereits beschriebenen Gen aufweist. Da es nicht möglich war, im Rahmen dieser Arbeit sämtliche Klone aus der cDNA-Bibliothek zu sequenzieren, wurden zunächst 27 Klone aus Bibliothek I sowie 23 Klone aus Bibliothek II sequenziert.

Eine genauere Analyse wurde zunächst mit den sequenzierten, über Xnr-3 aktivierten Genen aus Bibliothek I durchgeführt. Dabei handelt es sich um 16 verschiedene Gene. 10 davon codieren für Proteine, die bereits in *Xenopus* identifiziert und charakterisiert wurden. 2 Klone weisen Homologien zu Genen aus *Homo sapiens* auf, 1 Klon ist homolog zu einem EST in *Xenopus*, zu 2 Klonen wurden keine Homologien in den Datenbanken gefunden. Ein Klon enthält 16 S-rRNA. Dies ist eine Folge der unvollständigen Eliminierung ribosomaler RNA im Verlauf der mRNA-Isolierung, somit kommt dieser Klon für eine detailliertere Analyse nicht in Frage.

Bei neun der bekannten Gene erscheint aufgrund ihrer Funktion, Regulation sowie Expression wahrscheinlich, dass es sich um Xnr-3-abhängig regulierte Gene handelt. Dazu zählt hnRNP 2H9, für das eine Funktion bei der frühen Neuralentwicklung in der Maus nachgewiesen wurde (Mahe *et al.* 2000). Eine weitere Eigenschaft, die auf eine Xnr-3-abhängige Regulierung hindeutet, ist die Funktion als Mesoderminduktor, wie sie für XERH in *Xenopus* vorgeschlagen wird (Vignali *et al.* 2000) oder eine Funktion bei der dorsalen Musterung während der frühen Embryonalentwicklung in *Xenopus* wie im Fall von Ilf 3 (Sykes *et al.* 1998). Ein weiteres potentiell Zielgen ist der Transkriptionsfaktor AP-2rep, der ein mit dem von Xnr-3 überlappendes Expressionsmuster während der Gastrulation in *Xenopus* aufweist (Gotoh *et al.* 2003). Bei zwei der identifizierten Gene handelt es sich wie Xnr-3 um Neuralinduktoren, deren Funktion vermutlich auf einem Antagonismus zu BMP-Faktoren beruht: Id 2 (Martinsen & Bronner-Fraser 1998) sowie Geminin (Kroll *et al.* 1998).

4.4 Geminin ist ein Zielgen von Xnr-3

Mittels RT-PCR wurde analysiert, ob Xnr-3 die Expression der neun potentiellen Zielgene sowie der drei sequenzierten Gene, über die keine Hinweise zu Homologien existieren, aktivierte. Dabei wurde lediglich im Fall von Geminin eine eindeutige Aktivierung über Xnr-3 festgestellt. Auch die Verwendung von Keller-Explantaten anstelle von ganzen Embryonen führte nicht dazu, dass weitere getestete Gene eine deutlich-sichtbare Xnr-3-abhängige Regulation zeigten.

Allerdings lag im Fall von Klon 13 (RGC 32) und 16 (XMyb 1) eine leichte Herunterregulation in den Explantaten aus Morpholino-injizierten Embryonen vor. RGC 32 wurde bislang im Menschen und in der Ratte beschrieben und ist vor allem aus dem Grund von Interesse, da bei der Aktivierung des Gens FGF-Faktoren eine Rolle spielen (Badea *et al.* 1998). Bei dem Gen XMyb 1 handelt es sich um einen Transkriptionsaktivator im Zellkern, der während der gesamten frühen Embryonalentwicklung von *Xenopus* präsent ist (Bouwmeester *et al.* 1992). Allerdings sind die Erkenntnisse über dieses Gen zu spärlich, um Aussagen über die Möglichkeit einer Xnr-3-abhängigen Regulation zu treffen.

Eine Echtzeit-RT-PCR würde aufgrund ihrer Empfindlichkeit genaue Aussagen darüber erlauben, ob diese beiden Gene Xnr-3-abhängig reguliert werden. Darauf wurde jedoch verzichtet. Stattdessen wurde Geminin, das einzige Gen, das eine eindeutige Xnr-3-abhängige Regulation aufwies, einer genaueren Analyse unterzogen.

Bei neun der zwölf mittels RT-PCR untersuchten potentiellen Xnr-3-Zielgene war nicht davon auszugehen, dass es sich hierbei tatsächlich um Zielgene von Xnr-3 handelt. Unsicherheit besteht bei RGC 32 und Xmyb 1. Somit liegt der Anteil der tatsächlich Xnr-3-abhängig regulierten Gene bei 8 – 25 %. Dies scheint relativ wenig, da im Verlauf des substraktiven Screens ausschließlich jene Genfragmente amplifiziert werden sollten, die differentiell exprimiert werden. Allerdings ist der Anteil von ‚Falsch-Positiven‘ bei vergleichbaren Versuchen ähnlich hoch. So wurden bei einem substraktiven Screen zur Untersuchung von differentieller Genexpression in metastasierenden und nicht-metastasierenden Krebszellen mit derselben Methode 88,5 % der – in diesem Fall über radioaktive Hybridisierung – überprüften Klone als ‚Falsch-Positive‘ identifiziert. In einem weiteren Versuch, bei dem mittels substraktivem Screen für die frühe mesodermale Entwicklung in *Drosophila* wichtige Gene identifiziert werden sollten, lag der Anteil der tatsächlich differentiell exprimierten Gene bei weniger als 5 % (Casal & Leptin 1996).

Eine Alternative zu einem substraktiven Screen, wie er im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, besteht in einer Mikroarray-Hybridisierung. Hierbei werden die beiden unterschiedlichen Proben fluoreszenzmarkiert und auf zwei identische Mikrochips aufgebracht, auf denen Oligonukleotide von sämtlichen relevanten Genen fixiert wurden. Das Ausmaß der Expression eines bestimmten Gens kann anhand der Stärke des Fluoreszenzsignals abgelesen werden. Über ein spezielles Computerprogramm können Unterschiede in den Fluoreszenzsignalen und damit differentielle Genexpression in den

beiden Vergleichsproben detektiert werden. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass innerhalb kürzester Zeit eine gesamte DNA-Bibliothek auf Unterschiede in der Genexpression untersucht werden kann. Allerdings stand kein Chip mit Genen aus der frühen Gastrulation von *Xenopus laevis* zur Verfügung.

4.5 Xnr-3 fördert über Geminin die Neuralentwicklung

Mittels Injektion eines aktiven Geminin-Konstrukts (Kroll *et al.* 1998) wurde untersucht, welche Auswirkung Überaktivierung von Geminin zeigt.

Eine Analyse von Keller-Explantaten ergab, dass Geminin-Überexpression eine geringe Auswirkung auf die Elongation der Explantate hat. Allerdings wiesen mehr als 70 % der vollständig elongierten Explantate den 2x-Phänotypen auf. Eine Untersuchung der Struktur des axialen Mesoderms nach Geminin-Überaktivierung erfolgte mittels *in situ* Hybridisierung, wobei Chordin als Marker diente. Das Expressionsmuster von Chordin war durch die Injektion von Geminin deutlich verbreitert.

Eine Hemmung der Konstriktion in Keller-Explantaten sowie eine Verbreiterung des axialen Mesoderms sind ebenfalls bei Inhibierung von XPAPC zu beobachten und sind in diesem Fall auf eine selektive Inhibierung der Konstriktion als Folge von fehlender Koordination der Zellpolarität zurückzuführen. Allerdings existieren keine Hinweise, dass Geminin in die Mechanismen, die zur Ausbildung von koordinierter Zellpolarität führen, eingebunden ist, so dass dies als Ursache für den 2x-Phänotyp eher unwahrscheinlich ist.

Als zweite mögliche Ursache kommt eine gesteigerte Zellproliferation in Betracht. Geminin wurde zwar als Inhibitor der DNA-Replikation beschrieben, was eher dafür spricht, dass Geminin Zellproliferation entgegen wirkt (King *et al.* 1996), allerdings zeigten die Untersuchungen von McGarry (2002), dass Reprimierung von Geminin mittels eines spezifischen Morpholinos eine negative Auswirkung auf die DNA-Replikation hat. Eine Immunfärbung gegen phosphoryliertes H3 ergab, dass Überaktivierung von Geminin Zellproliferation nicht fördert und dies somit als Ursache für das Auftreten der Explantate vom Typ 2x ebenfalls ausscheidet.

Die Expression von Chordin erstreckte sich bei Geminin-Überaktivierung über einen Großteil der dorsalen Hemisphäre, was eine Steigerung der Chordin-Expression vermuten läßt. Eine gesteigerte Chordin-Expression und eine damit verbundene Verbreiterung des dorsalen Mesoderms würde das Auftreten der 2x-Explantate erklären. Die beobachteten Schwierigkeiten beim Schließen des Blastoporus nach Geminin-Überexpression können ebenfalls auf unkontrollierte Chordin-Expression zurückgeführt werden

Coinjektion von Geminin war nicht in der Lage, Hemmung von konvergenter Extension bei Injektion des Xnr-3-Morpholinos in Keller-Explantaten aufzuheben. Dies spricht dagegen, dass Geminin ein Effektor von Xnr-3 bei der Förderung von konvergenter Extension ist.

Aufgrund der Tatsache, dass beide Gene als Neuralinduktoren wirken, wurde erwartet, dass die beiden Proteine bei diesem Prozess zusammenwirken. Mit cm Xnr-3 stand ein Konstrukt zur Verfügung (Hansen Ezal *et al.* 2000), das nicht zur Förderung von konvergenter

Extension befähigt ist, während die Induktion der Neuralentwicklung nicht beeinträchtigt ist. Ein Aktivin-Xnr-3-Fusionsprotein, bei dem die Xnr-3-Prodomäne durch die Aktivin-Prodomäne ersetzt wurde, zeigt hingegen kein induktives Potential für Neuralgewebe (Hansen Ezal *et al.* 2000). Während Injektion von cm Xnr-3 zu einer starken Steigerung der Geminin-Expression führte, hatte das Aktivin-Xnr-3-Fusionsprotein eher den gegenteiligen Effekt. Dies bestätigte die Vermutung, dass Xnr-3 über Geminin die Neuralinduktion fördert.

Bislang ist unklar, über welchen Mechanismus die Neuralinduktion über Xnr-3 erfolgt. Eine Weiterleitung von Signalen zur Entwicklung der Neuralplatte durch eingewandertes mesodermales Gewebe kommt für Xnr-3 nicht in Betracht, da die Expression von Xnr-3 stoppt, sobald das Mesoderm ins Innere des Embryos eingewandert ist (Smith *et al.* 1995). Allerdings deuten Erkenntnisse von Droniach *et al.* (1992) darauf hin, dass Neuralinduktion ebenfalls über ein vom Spemann-Organisator ausgehendes planares Signal erfolgen kann. Möglicherweise induziert Xnr-3 auf diesem Wege die Expression von Geminin und fördert so die Induktion von neuralen Strukturen.

Bei Chordin handelt es sich um ein sekretiertes Protein, das zu Beginn der Gastrulation im Spemann-Organisator und später im axialen Mesoderm exprimiert wird. Es hat dorsalisierende Wirkung und trägt somit zur dorso-ventralen Musterbildung im Embryo bei (Sasai *et al.* 1994). Daneben besitzt es jedoch auch neural-induzierendes Potenzial, was wie bei Xnr-3 und Geminin darauf zurückzuführen ist, dass Chordin endogenes BMP-4 im dorsalen Bereich reprimiert (Sasai *et al.* 1995). Im Gegensatz zu Geminin, dessen antagonistische Wirkung zu BMP-4 darauf beruht, dass es im Ektoderm neurales Gewebe auf Kosten von Epidermis induziert, ist Chordin in der Lage, BMP-4 direkt zu binden und somit zu deaktivieren (Piccolo *et al.* 1996). Chordin ist außerdem in der Lage, die Expression von Geminin zu induzieren (Kroll *et al.* 1998), was vermutlich über den vertikalen Signalweg erfolgt, über den mesodermales Gewebe Neuralinduktion bewerkstelligt (Hemmati-Brivanlou *et al.* 1990). Bislang wurde nicht beobachtet, dass Signale auch auf dem umgekehrten Weg vom Ektoderm zum Mesoderm wirken können.

Für die vorgeschlagene wechselseitige positive Beeinflussung zwischen Chordin und Geminin erscheint daher ein indirekter Mechanismus eher wahrscheinlich. Chordin wird durch einen weiteren BMP-Faktor, die Protease BMP 1 degradiert (Wardle *et al.* 1999). Es wird angenommen, dass die antagonistische Wirkung von Geminin auf BMP-Signale aufgrund seiner Eigenschaft, neurales Gewebe auf Kosten von Epidermis zu induzieren, zu einer Förderung der Chordin-Expression führt.

Zur genaueren Beurteilung der Wirkungsweise von Geminin, insbesondere die Klärung der Frage, ob Geminin tatsächlich eine positive Wirkung auf Chordin-Expression besitzt, wäre jedoch eine Analyse der Auswirkungen erforderlich, die Hemmung von Geminin durch Injektion eines dominant negativen Konstrukts bzw. eines spezifischen Morpholinos hat.

Von Interesse wäre außerdem, zu klären, ob es sich bei Geminin um ein direktes Zielgen von Xnr-3 handelt, was bedeuten würde, dass Induktion der Geminin-Expression auch in Abwesenheit von Proteinsynthese funktioniert.

V Zusammenfassung

Konvergente Extensionsbewegung im einwandernden Mesoderm im Verlauf der Gastrulation von Vertebraten wird durch den kanonischen und die beiden nicht kanonischen Wnt-Signalwege auf molekularer Ebene gesteuert. Intensive Untersuchungen über den Einfluss der Wnt-Signalwege auf konvergente Extension wurden im Glatten Krallenfrosch *Xenopus laevis* angestellt. Dabei sind sowohl der kanonische Wnt-Signalweg als auch der nicht-kanonische Wnt/PCP-Signalweg essentiell für konvergente Extension im Mesoderm von *Xenopus*. Im Gegensatz zum kanonischen Wnt-Weg hat im Fall des Wnt/PCP-Wegs auch eine Überaktivierung negativen Einfluss auf diese Gewebewanderung.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des Wnt/PCP-Wegs sowie des kanonischen Wnt-Signalwegs bei der konvergenten Extension des einwandernden mesodermalen Gewebes in *Xenopus* näher zu untersuchen. Dabei wurde eine detaillierte Analyse durchgeführt, wie sich Veränderung der Aktivität des Wnt/PCP-Signalwegs auf diese Zellbewegungen auswirkt. Außerdem war von Interesse, ob und auf welche Weise Interaktionen zwischen dem Wnt/PCP- und dem kanonischen Wnt-Signalweg bestehen. Einen weiteren Schwerpunkt bildete Xnr-3, ein Zielgen des kanonischen Wnt-Signalwegs, das essentiell für konvergente Ausdehnung ist (Kühl *et al.* 2001). Bislang wurden noch keine direkten Zielgene von Xnr-3 beschrieben. Mittels eines substraktiven Screens wurde versucht, für die Förderung der konvergenten Extension wichtige Xnr-3 Zielgene zu identifizieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine detaillierte Analyse zu den Auswirkungen einer Veränderung der Aktivität des Wnt/PCP-Signalwegs auf konvergente Extension durchgeführt. Dies erfolgte mittels Mikroinjektion von Substanzen, die die Aktivität dieser Signalkaskade beeinflussten. Die Wanderungsbewegung des Mesoderms wurde anhand der Elongation von Keller-Explantaten untersucht.

Bereits eine Überexpression von 4 pg XWnt-11-mRNA hat eine Hemmung der konvergenten Extension zur Folge. Der Wnt/PCP-Signalweg ist somit nur in der Lage, konvergente Extension zu fördern, wenn sich die Aktivität der Kaskade in einem engen Bereich bewegt. Hemmung des Wnt/PCP-Signalwegs durch Injektion eines dominant-negativen Konstrukts der kleinen GTPase RhoA führt zu einem bislang noch nicht beschriebenen Phänotypen in den Explantaten, der mit 2x bezeichnet wurde. Dieser ist dadurch gekennzeichnet, dass die Fähigkeit zur Elongation nicht beeinträchtigt ist, während der Fortsatz der 2x-Explantate im Vergleich zu den Klasse 2-Explantaten signifikant verbreitert ist.

Bei Hemmung des paraxialen Protocadherins XPAPC durch Injektion eines spezifischen Morpholinos tritt dieser 2x-Phänotyp ebenfalls gehäuft auf. Dies ist auf eine selektive Inhibierung der Konstriktion im Rahmen von konvergenter Extensionsbewegung zurückzuführen, welche koordinierte Zellpolarität und damit eine geordnete Wanderung der Zellen zur dorsalen Mittellinie verhindert. XPAPC ist in der Lage, innerhalb einer linearen Signalkaskade RhoA und JNK zu aktivieren. Dieser Signalweg ist essentiell für die

Etablierung von Zellpolarität und somit auch für Konstriktion während konvergenter Extensionsbewegung des einwandernden Mesoderms.

Der Wnt/PCP-Signalweg interagiert mit dem kanonischen Wnt-Signalweg. Die auf den Erkenntnissen von Tada & Smith (2000) sowie Yokota *et al.* (2003) beruhende Hypothese, dass sich der Wnt/PCP-Signalweg unterhalb des kanonischen Wnt-Signalwegs befände, kann nicht bestätigt werden, da zum einen Hemmung des kanonischen Wnt-Signalwegs in Echtzeit-RT-PCR-Experimenten keine Auswirkung auf die Expression von XWnt-11 hat und außerdem Elongation von Keller-Explantaten nach Hemmung des kanonischen Wnt-Signalwegs durch Coinjektion von XWnt-11 nicht wieder hergestellt werden kann. Stattdessen deuten Coinjektionsexperimente, bei denen beide Signalwege überaktiviert wurden, darauf hin, dass die beiden Signalwege auf der Ebene von Dishevelled interagieren, wobei eine Konkurrenz um diesen Effektor besteht.

Bei der Suche nach Zielgenen von Xnr-3 mittels substraktivem Screen, Anlegen einer cDNA-Bibliothek sowie Sequenzierung von 50 Klonen aus dieser Bibliothek wurde der Neuralinduktor Geminin identifiziert. RT-PCR-Experimente belegen, dass Xnr-3 die Expression von Geminin fördert. Für die Aktivierung von Geminin ist die Fähigkeit von Xnr-3 zur Neuralinduktion, was eine weitere Funktion des Proteins darstellt (Hansen *et al.* 1997), essentiell. Geminin als Zielgen von Xnr-3 scheint zwar keine Bedeutung bei der Förderung von konvergenter Extension einzunehmen, allerdings liefert die Identifizierung dieses Zielgens einen Hinweis darauf, nach welchem Mechanismus Neuralinduktion über Xnr-3 erfolgen könnte.

VI Literatur

- Adler, P.N.** 1992. The genetic control of tissue polarity in *Drosophila*. *BioEssays* **14**, 735-741.
- Adler, P.N., Taylor, J. and Charlton, J.** 2000. The domineering non-autonomy of frizzled and van Gogh clones in the *Drosophila* wing is a consequence of a disruption in local signalling. *Mech. Dev.* **96**, 197-207.
- Albert, I.** 2004. Funktion und Regulation von *Xenopus laevis* Lef-1 während der Gastrulation. Diplomarbeit am Zoologischen Institut II der Universität Karlsruhe.
- Angst, B.D., Marcozzi, C. and Magee, A.I.** 2001. The cadherin superfamily. *J. Cell Sci.* **114**, 625-626.
- Axelrod, J.D., Miller, J.R., Shulman, J.M., Moon, R.T. and Perrimon, N.** 1998. Differential recruitment of dishevelled provides signalling specificity in the planar cell polarity and wingless signalling pathways. *Genes Dev.* **12**, 2610-2622.
- Badea, T.C., Niculescu, F.I., Soane, L., Shin, M.L. and Rus, H.** 1998. Molecular cloning and characterization of RGC-32, a novel gene induced by complement activation in oligodendrocytes *J. Biol. Chem.* **273**, 26977-26981.
- Behrens, J., von Kries, J.P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. and Birchmeiner, W.** 1996. Functional interaction of β -Catenin with the transcription factor Lef-1. *Nature* **382**, 638-642.
- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C.H., Hsieh, J.C., Wang, Y., Macke, J.P., Andrew, D., Nathans, J. and Nusse, R.** 1996. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a wingless receptor. *Nature* **382**, 225-230.
- Bienz, M.** 1998. TCF: transcriptional activator or repressor? *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 366-372.
- Birnboim, C.A. and Dooley, J.A.** 1979. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Bode, P. and Bode, H.** 1984. Formation of pattern in regenerating tissue pieces of *Hydra attenuate*. III. The shaping of the body column. *Dev. Biol.* **106**, 315-325.

- Bouwmeester, T., Güehmann, S., El-Baradi, T., Kalkbrenner, F., van Wijk, I., Moelling, K. and Pieler, T.** 1992. Molecular cloning, expression and in vitro functional characterization of Myb-related proteins in *Xenopus*. *Mech. Dev.* **37**, 57-68.
- Brannon, M., Brown, J.D., Bates, R., Kimelman, D. and Moon, R.T.** 1999. XCtBP is a XTcf-3 co-repressor with roles throughout *Xenopus* development. *Development* **126**, 3159-3170.
- Brannon, M., Gomperts, M., Sumoy, L., Moon, R.T. and Kimelman, D.** 1997. A β -Catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes Dev.* **11**, 2359-2370.
- Brannon, M. and Kimelman, D.** 1996. Activation of siamois by the Wnt pathway. *Dev. Biol.* **180**, 344-347.
- Carreira-Barbosa, F., Concha, M.L., Takeuchi, M., Ueno, N., Wilson, S.W. and Tada, M.** 2003. Prickle 1 regulates cell movements during gastrulation and neuronal migration in Zebrafish. *Development* **130**, 4037-4046.
- Casal, J. and Leptin, M.** 1996. Identification of novel genes in *Drosophila* reveals the complex regulation of early gene activity in the mesoderm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10327-10332.
- Dahl, E., Koseki, H. and Balling, R.** 1997. Pax genes and organogenesis. *Bioessays* **19**, 755-765.
- Darken, R.S., Scola, A.M., Rakeman, A.S., Das, G., Mlodzik, M. and Wilson, P.A.** 2002. The planar polarity gene strabismus regulates convergent extension movements in *Xenopus*. *EMBO J.* **21**, 976-985.
- Darribere, T., Yamada, K.M., Johnson, K.E. and Boucaut, J.C.** 1988. The 140-kDa fibronectin receptor complex is required for mesodermal cell adhesion during gastrulation in the amphibian *Pleurodeles waltlii*. *Dev. Biol.* **126**, 182-194.
- Davidson, L.A., Hoffstrom, B.G., Keller, R. and DeSimone, D.W.** 2002. Mesendoderm extension and mantle closure in *Xenopus laevis* gastrulation: combined roles for integrin $\alpha(5)\beta(1)$, fibronectin, and tissue geometry. *Dev. Biol.* **242**, 109-129.

- De Wever, O., Nguyen, Q.D., Van Hoorde, L., Bracke, M., Bruyneel, E., Gespach, C. and Mareel, M.** 2004. Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *EASEB J.* **18**, 1016-1018.
- Djiane, A., Riou, J.-F., Umbhauer, M., Boucaut, J.C. and Shi, D.-L.** 2000. Role of frizzled 7 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Development* **125**, 2687-2700.
- Droniach, T., Phillips, C.R. and Gerhart, J.C.** 1992. Planar induction of anteroposterior pattern in the developing central nervous system of *Xenopus laevis*. *Science* **257**, 542-545.
- Du, S.J., Purcell, S.M., Christian, J.L., McGrew, L.L. and Moon, R.T.** 1995. Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2625-2634.
- Eizema, K., Koster, J.G., Stegeman, B.I., Baarends, W.M., Lanser, P.H. and Destree, O.H.** 1994. Comparative analysis of Engrailed-1 and Wnt-1 expression in the developing central nervous system of *Xenopus laevis*. *Int. J. Biol.* **38**, 623-632.
- Fan, M.J., Grüning, W., Walz, G. and Sokol, S.Y.** 1998. Wnt signalling and transcriptional control of siamois in *Xenopus* embryos. *Dev. Biol.* **95**, 5626-5631.
- Fanto, M. and McNeill, H.** 2004. Planar polarity from flies to vertebrates. *J. Cell Science* **117**, 527-533.
- Frank, M. and Kemler, R.** 2002. Protocadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 557-562.
- George, E.L., Georges-Labouesse, E.N., Patel-King, R.S., Rayburn, H. and Hynes, R.O.** 1993. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* **119**, 1079-1091.
- Glickman, N.S., Kimmel, C.B., Jones, M.A. and Adams, R.J.** 2003. Shaping the zebrafish notochord. *Development* **130**, 873-887.
- Gotoh, M., Izutsu, Y. and Maeno, M.** 2003. Complementary expression of AP-2 and Ap-2rep in ectodermal derivatives of *Xenopus* embryos. *Dev. Genes Evol.* **213**, 363-367.
- Gubb, D., Green, C., Huen, D., Coulson, D., Johnson, G., Tree, D., Collier, S. and Roote, J.** 1999. The balance between isoforms of the prickle LIM domain protein is critical for planar polarity in *Drosophila* imaginal discs. *Genes Dev.* **13**, 2315-2327.

- Habas, R., Dawid, I.B. and He, X.** 2002. Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signalling is required for vertebrate gastrulation. *Genes & Dev.* **17**, 295-309.
- Habas, R., Kato, Y. and He, X.** 2001. Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel formin homology protein Daam1. *Cell* **107**, 843-854.
- Hall, A.** 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509–514.
- Hansen Ezal, C., Marion, C.D. and Smith, W.C.** 2000. Primary structure requirements for *Xenopus* nodal-related 3 and a comparison with regions required by *Xenopus* nodal-related 2. *J. Biol. Chem.* **275**, 14124-14131.
- Hansen, C.S., Marion, C.D., Steele, K., George, S. and Smith, W.C.** 1997. Direct neural induction and selective inhibition of mesoderm and epidermis inducers by Xnr-3. *Development* **124**, 483-492.
- Harrisson, F., Van Nassauw, L., Van Hoof, J. and Foidart, J.M.** 1993. Microinjection of antifibronectin antibodies in the chicken blastoderm: inhibition of mesoblast cell migration but not of cell ingression at the primitive streak. *Anat. Rec.* **236**, 685-696.
- Hartley, R.S., Lewellyn, A.L. and Maller, J.L.** 1994. MAP kinase is activated during mesoderm induction in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **163**, 521-524.
- Heasman, J.** 2002. Morpholino oligos: making sense of antisense? *Dev. Biol.* **243**, 209-214.
- Heisenberg, C-P, Tada, M., Rauch, G-J, Saúde, L., Concha, M.L., Geisler, R., Stemple, D.L., Smith, J.C. and Wilson, S.W.** 2000. Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* **405**, 76-81.
- Hemmati-Brivanlou, A., Stewart, R.M. and Harland, R.M.** 1990. Region-specific neural induction of an engrailed protein by anterior notochord in *Xenopus*. *Science* **250**, 800-802.
- Holmen, S.L., Salic, A., Zylstra, C.R., Kirschner, M.W. and Williams, B.O.** 2002. A novel set of Wnt-Frizzled fusion proteins identifies receptor components that activate β -Catenin-dependent signalling. *J. Biol. Chem.* **277**, 34727-34735.
- Huang, C., Rajfur, Z., Borchers, C., Schaller, M.D. and Jacobson, K.** 2003. JNK phosphorylates paxilin and regulates cell migration. *Nature* **424**, 219-223.

- Huelsken, J. and Behrens, J.** 2002. The Wnt signalling pathway. *J. Cell Sci.* **115**, 3977-3978.
- Hukriede, N.A., Tsang, T.E., Habas, R., Khoo, P.-L., Steiner, K., Weeks, D.L., Tam, P.P.L. and Dawid, I.B.** 2003. Conserved requirement of Lim1 function for cell movements during gastrulation. *Dev. Cell* **4**, 83-94.
- Irvine, K.D. and Wieschaus, E.** 1994. Cell intercalation during *Drosophila* germband extension and its regulation by pair-rule segmentation genes. *Development* **120**, 827-841.
- Isaacs, H.V., Pownall, M.E. and Slack, J.M.** 1994. eFGF regulates Xbra expression during *Xenopus* gastrulation. *EMBO J.* **13**, 4469-4481.
- Itoh, K., Antipova, A., Ratcliffe, M.J. and Sokol, S.** 2000. Interaction of dishevelled and *Xenopus* axin-related protein is required for Wnt signal transduction. *Mol. Cell Biol.* **20**, 2228-2238.
- Jones, C.M., Dale, L., Hogan, B.L.M., Wright, C.V.E. and Smith, J.C.** 1996. Bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) acts during gastrula stages to cause ventralization of *Xenopus* embryos. *Development* **122**, 1545-1554.
- Jones, C.M., Kuehn, M.R., Hogan, B.L., Smith, J.C. and Wright, C.V.** 1995. Nodal-related signals induce axial mesoderm and dorsalize mesoderm during gastrulation. *Development* **121**, 3651-3662.
- Joseph, E.M. and Melton, D.A.** 1997. Xnr-4: a *Xenopus* nodal-related gene expressed in the spemann organizer. *Dev. Biol.* **184**, 367-372.
- Kaibuchi, K., Kuroda, S. and Amano, M.** 1999. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 459-486.
- Keller, R.** 1991. Early embryonic development of *Xenopus laevis*. *Methods Cell Biol.* **36**, 61-113.
- Keller, R.** 2002. Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. *Science* **298**, 1950-1954.
- Keller, R., Davidson, L., Edlund, A., Elul, T., Ezin, M., Shook, D. and Skoglund, P.** 2000. Mechanisms of convergence and extension by cell intercalation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **355**, 897-922.

- Kemler, R.** 1992. Classical cadherins. *Semin. Cell Biol.* **3**, 149-155.
- Kilian, B., Mansukoski, H., Carreira Barbosa, F., Ulrich, F., Tada, M. und Heisenberg, C.-P.** 2003. The role of Ppt/Wnt5 in regulating cell shape and movement during zebrafish gastrulation. *Mech. Dev.* **120**, 467-476.
- Kim, S.-H., Jen, W.-C., De Robertis, E.M. and Kintner, C.** 2000. The protocadherin PAPC establishes segmental boundaries during somitogenesis in *Xenopus* embryos. *Curr. Biol.* **10**, 821-830
- Kim, S.-H., Yamamoto, A., Bouwmeester, T., Agius, E. and De Robertis, E.M.** 1998. The role of paraxial protocadherin in selective adhesion and cell movements of the mesoderm during *Xenopus* gastrulation. *Development* **125**, 4682-4691.
- King, R.W., Deshaies, R.J., Peters, J.M. and Kirschner, M.W.** 1996. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* **274**, 1652-1659.
- Kintner, C.R. and Melton, D.A.** 1987. Expression of *Xenopus* N-CAM RNA in ectoderm is an early response to neural induction. *Development* **99**, 311-325.
- Klein, E.** 2004. Einfluß und Funktion von *Xenopus nodal related 3* auf die konvergente Extensionsbewegung während der Gastrulation von *Xenopus laevis*. Diplomarbeit am Zoologischen Institut II der Universität Karlsruhe.
- Kofron, M., Demel, T., Xanthos, J., Lohr, J., Sun, B., Sive, H., Osada, S., Wright, C., Wylie, C. and Heasman, J.** 1999. Mesoderm induction in *Xenopus* is a zygotic event regulated by maternal VegT via TGF- β growth factors. *Development* **126**, 5759-5770.
- Krasnow, R.E., Wong, L.L. and Adler, P.N.** 1995. Dishevelled is a component of the frizzled signalling pathway in *Drosophila*. *Development* **121**, 4095-4102.
- Kroll, K.L., Salic, A.N., Evans, L.M. and Kirschner, M.W.** 1998. Geminin, a neuralizing molecule that demarcates the future neural plate at the onset of gastrulation. *Development* **125**, 3247-3258.
- Kühl, M., Geis, K., Sheldahl, L.C., Pukrop, T., Moon, R.T. and Wedlich, D.** 2001. Antagonistic regulation of convergent extension movements in *Xenopus* by Wnt/ β -catenin and Wnt/ Ca^{2+} signalling. *Mech. Dev.* **106**, 61-76.

- Kühl, M., Sheldahl, L.C., Malbon, C.C. and Moon, R.T.** 2000. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J. Biol. Chem.* **274**, 129-134.
- Kuratomi, G., Komuro, A., Goto, K., Shinozaki, M., Miyazawa, K., Miyazono, K. and Imamura T.** 2004. Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2 (NEDD4-2) negatively regulates transforming growth factor β (TGF β) signaling by inducing ubiquitin-mediated degradation of Smad 2 and TGF β type I receptor. *Biochem J.* (in press)
- Laurent, M.N., Blitz, I.L. Hashimoto, C., Rothbacher, U. and Cho, K.W.Y.** 1997. The *Xenopus* homeobox gene twin mediates Wnt induction of gooseoid in establishment of Spemann's organizer. *Development* **124**, 4905-4916.
- Mahe, D., Fischer, N., Decimo, D. and Fuchs, J.P.** 2000. Spatiotemporal regulation of hnRNP M and 2H9 gene expression during mouse embryonic development. *Biochim. Biophys. Acta.* **1492**, 414-424.
- Marsden, M. and DeSimone, D.W.** 2001. Regulation of cell polarity, radial intercalation and epiboly in *Xenopus*: novel roles for integrin and fibronectin. *Development* **128**, 3635-3647.
- Marsden, M. and DeSimone, D.W.** 2003. Integrin-ECM interactions regulate cadherin-dependent cell adhesion and are required for convergent extension in *Xenopus*. *Curr. Biol.* **13**, 1182-1191.
- Martinsen, B.J. and Bronner-Fraser, M.** 1998. Neural crest specification regulated by the helix-loop-helix repressor Id2. *Science* **281**, 988-991.
- McGarry, T.** 2002. Geminin deficiency causes a Chk1-dependent G2 arrest in *Xenopus*. *Mol. Biol. Cell* **13**, 3662-3671.
- McKendry, R., Hsu, S.C., Harland, R. and Grosschedl, R.** 1997. Lef-1/TCF proteins mediate Wnt-inducible transcription from the *Xenopus nodal related 3* promoter. *Dev. Biol.* **192**, 420-431.
- Medina, A., Reintsch, W. and Steinbeisser, H.** 2000. *Xenopus* frizzled 7 can act in canonical and non-canonical Wnt signaling pathways: implications on early patterning and morphogenesis. *Mech. Dev.* **92**, 227-237.
- Medina, A., Swain, R.K., Kuerner, K.M. and Steinbeisser, H.** 2004. *Xenopus* paraxial protocadherin has signaling functions and is involved in tissue separation. *EMBO J.* **16**, 3249-3258.

Miller, J.R. 2001. The Wnts. *Genome Biol.* **3**, 3001.1-3001.15.

Miller, J.R., Rowning, B.A., Larabell, C.A., Yang-Snyder, J.A., Bates, R.L., and Moon, R.T. 1999. Establishment of the dorsal-ventral axis in *Xenopus* embryos coincides with the dorsal enrichment of dishevelled that is dependent on cortical rotation. *J. Cell Biol.* **146**, 427-438.

Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V. Barker, N., Clevers, H., Vorgelstein, B. and Kienzler, K.W. 1997. Activation of beta-catenin-Tcf signalling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* **275**, 1787-1790.

Myers, D.C., Sepich, D.S. and Solnica-Krezel, L. 2002a. BMP activity gradient regulates convergent extension during zebrafish gastrulation. *Dev. Biol.* **243**, 81-98.

Myers, D.C., Sepich, D.S. and Solnica-Krezel, L. 2002b. Convergence and extension in vertebrate gastrulae: cell movements according to or in search of identity? *Trends in Gen.* **18**, 447-455.

Nieuwkoop, P.D. and Faber, J. 1967. Normtabelle von *Xenopus laevis*. Elsevier North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Nusse, R. and Varnus, HE. 1982. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* **31**, 99-109.

Ohkawara, B., Yamamoto, T.S., Tada, M. and Ueno, N. 2003. Role of glypican 4 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Development* **130**, 2129-2138.

Pandur, P., Läsche, M., Eisenberg, L.M. and Kühl, M. 2001. Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis. *Nature* **418**, 636-641.

Park, M. and Moon, R.T. 2002. The planar cell-polarity gene *stbm* regulates cell behaviour and cell fate in vertebrate embryos. *Nat. Cell Biol.* **4**, 20-25.

Penton, A., Wodarz, A. and Nusse, R. 2002. A mutational analysis of dishevelled in *Drosophila* defines novel domains in the dishevelled protein as well as suppressing alleles of axin. *Genetics* **161**, 747-762.

Penzo-Mendèz, A., Umbhauer, M., Djiane, A., Boucaut, J.C. and Riou, J.F. 2003. Activation of $G_{\beta\gamma}$ signalling downstream of Wnt-11/Xfz7 regulates Cdc42 activity during *Xenopus* gastrulation. *Dev. Biol.* **257**, 302-314.

- Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B. and De Robertis, E.M.** 1996. Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP 4. *Cell* **86**, 589-598.
- Polakis, P.** The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta* **3**, 127-147.
- Rhee, J., Takahashi, Y., Saga, Y. Wilson-Rawls, J. and Rawls, A.** 2003. The protocadherin PAPC is involved in the organization of the epithelium along the segmental border during mouse somitogenesis. *Dev. Biol.* **254**, 248-261.
- Roose, J., Huls, G., van Beest, M., Moerer, P., van der Horn, K., Goldschmeding, R., Logtenberg, T., Clevers, H.** 1999. Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin Tcf-4 target Tcf-1. *Science* **285**, 1923-1926.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning – a laboratory manual. Second edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- Saneyoshi, T.S., Kume, Y., Amasaki, Y. and Mikoshiba, K.** 2002. The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos. *Nature* **417**, 295-299.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H. and De Robertis, E.M.** 1995. Regulation of neural induction by the Chd and BMP-4 antagonistic patterning signals in *Xenopus*. *Nature* **376**, 333-336.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L.K. and De Robertis, E.M.** 1994. *Xenopus* Chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell*. **79**, 779-790.
- Sausedo, R.A. and Schoenwolf, G.C.** 1993. Cell behaviours underlying notochord formation and extension in avian embryos: quantitative and immunocytochemical studies. *Anat Rec.* **237**, 58-70.
- Sausedo, R.A. and Schoenwolf, G.C.** 1994. Quantitative analyses of cell behaviours underlying notochord formation and extension in mouse embryos. *Anat Rec.* **239**, 103-112.
- Schier, A.F.** 2003. Nodal signaling in vertebrate development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**, 589-621.

- Schwarz-Romond, T., Asbrand, C., Bakkers, J., Kühl, M., Schaeffer, H-J, Huelsken, J., Behrens, J., Hammerschmidt, M. and Birchmeier, W.** 2002. The ankyrin repeat protein diversin recruits casein kinase I ϵ to the β -catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signalling. *Genes & Dev.* **16**, 2073-2084.
- Sheldahl, L.C., Slusarski, D.C., Pandur, P., Miller, J.R., Kühl, M. and Moon, R.T.** 2003. Dishevelled activates Ca²⁺ flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. *J. Cell. Biol.* **161**, 769-777.
- Schohl, A. and Fagotto, F.** 2002. β -Catenin, MAPK and Smad signalling during early *Xenopus* development. *Development* **129**, 37-52.
- Slack, J.M., Isaacs H.V., Song, J., Durbin, L. and Pownall, M.E.** 1996. The role of fibroblast growth factors in early *Xenopus* development. *Biochem. Soc. Symp.* **62**, 1-12.
- Smith, J.C. and Tata, J.R.** 1991. *Xenopus* cell lines. *Methods cell. biol.* **36**, 635-654.
- Smith, W.C., McKendry, R., Ribisi, S. and Harland, R.M.** 1995. A *nodal*-related gene defines a physical and functional domain within the spemann organizer. *Cell* **82**, 37-46.
- Song, B.H., Choi, S.C. and Han, J.K.** 2003. Local activation of protein kinase A inhibits morphogenetic movements during *Xenopus* gastrulation. *Dev. Dyn.* **227**, 91-103.
- Summerton, J. and Weller, D.** 1997. Morpholino antisense oligomers: design, preparation and properties. *Antisense Nuc. Acid Drug Dev.* **7**, 187-195.
- Sykes, T.G., Rodaway, A.R.F., Walmsley, M.E. and Patient, R.K.** 1998. Suppression of GATA factor activity causes axis duplication in *Xenopus*. *Development* **125**, 4595-4605.
- Tada, M. and Smith, J.C.** 2000. XWnt 11 is a target of *Xenopus* brachyury: regulation of gastrulation movements via Dishevelled, but not through the canonical Wnt pathway. *Development* **127**, 2227-2238.
- Tahinci, E. and Symes, K.** 2003. Distinct functions of Rho and Rac are required for convergent extension during *Xenopus* gastrulation. *Dev. Biol.* **259**, 318-335.
- Takahashi, S., Yokota, C., Takano, K., Tanegashima, K., Onuma, Y., Goto, J.-I. and Asashima, M.** 2000. Two novel *nodal*-related genes initiate early inductive events in *Xenopus* Nieuwkoop center. *Development* **127**, 5319-5329.

- Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J.P and He, X.** 2000. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* **407**, 530-535.
- Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z. and He, X.** 2004. A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell*. **13**, 149-156.
- Tolwinski, N.S., Wehrli, M., Rives, A., Erdeniz, N., DiNardo, S. and Wieschaus, E.** 2003. Wg/Wnt signal can be transmitted through arrow/LRP 5,6 and axin independently of Zw3/GSK3 β activity. *Dev. Cell* **4**, 407-418.
- Topol, L., Jiang, X., Choi, H., Garrett-Beal, L. Carolan, P.J. and Yang, Y.** 2003. Wnt-5A inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent β -catenin degradation. *J. Cell Biol.* **162**, 899-908.
- Torres, M.A., Yang-Snyder, J., Purcell, S.M., DeMarais, A.A., McGrew, L.L. and Moon, R.T.** 1996. Activities of the Wnt-1 class of secreted signalling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J. Cell Biol.* **133**, 1123-1137.
- Tree, D.R., Shulman, J.M., Rousset, R., Scott, M.P., Gubb, D. and Axelrod, J.D.** 2002. Prickle mediates feedback amplification to generate asymmetric planar cell polarity signalling. *Cell* **109**, 371-381.
- Trinkaus, JP, Trinkaus, M. and Fink, R.D.** 1992. On the convergent cell movements of gastrulation in *Fundulus*. *J. Exp. Zool.* **261**, 40-61.
- Unterseher, F., Hefele, J.A., Giehl, K., De Robertis, E.M., Wedlich, D. and Schambony, A.** 2004. Paraxial protocadherin coordinates cell polarity during convergent extension via Rho A and JNK. *EMBO J.* **23**, 3259-3269.
- Veeman, M.T., Axelrod, J.D. and Moon, R.T.** 2003. A second canon: functions and mechanisms of β -catenin-independent Wnt signalling. *Dev. Cell* **5**, 367-377.
- Vignali, R., Poggi, L., Madeddu, F. and Barsacchi, G.** 2000. HNF (beat) is required for mesoderm induction in the *Xenopus* embryo. *Development* **127**, 1455-1465.
- Von Stein, O.D., Thies, W.-G. and Hofmann, M.** 1997. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nuc. Ac. Res.* **25**, 2598-2602.

- Wallingford, J.B. and Harland, R.M.** 2001. *Xenopus* Dishevelled signalling regulates both neural and mesodermal convergent extension: parallel forces elongating the body axis. *Development* **128**, 2581-2592.
- Wallingford, J.B., Rowning, B.A., Vogeli, K.M., Rothbacher, U., Fraser, S.E. and Harland, R.M.** 2000. Dishevelled controls cell polarity during *Xenopus* gastrulation. *Nature* **405**, 81-85.
- Wang, H.R., Zhang, Y., Ozdamar, B., Ogunjimi, A.A., Alexandrova, E., Thomsen, G.H. and Wrana, J.L.** 2003. Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science* **302**, 1690-1691.
- Wardle, F.C., Welch, J.V. and Dale, L.** 1999. Bone morphogenetic protein 1 regulates dorsal-ventral patterning in early *Xenopus* embryos by degrading chordin, a BMP4 antagonist. *Mech. Dev.* **86**, 75-85.
- Wharton Jr., K.A.** 2003. Runnin' with the Dvl: proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction. *Dev. Biol.* **253**, 1-17.
- Winklbauer, R., Medina, A., Swain, R.K. and Steinbeisser, H.** 2001. Frizzled-7 signaling controls tissue separation during *Xenopus* gastrulation. *Nature* **413**, 856-860.
- Wolda, S.L., Moody, C.J. and Moon, R.T.** 1993. Overlapping expression of XWnt-3A and XWnt-1 in neural tissue of *Xenopus laevis* embryos. *Dev. Biol.* **155**, 46-57.
- Wolpert, L.** 1999. *Entwicklungsbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin.
- Wu, J., Klein, T.J. and Mlodzik, M.** 2004. Subcellular localization of frizzled receptors, mediated by their cytoplasmic tails, regulates signaling pathway specificity. *PLoS Biol.* **7**, 1004-1014.
- Wünnenberg-Stapleton, K., Blitz, I.L., Hashimoto, C. and Cho, K.W.Y.** 1999. Involvement of the small GTPases XRhoA and XRnd 1 in cell adhesion and head formation in early *Xenopus* development. *Development* **126**, 5339-5351.
- Yamamoto, A., Amacher, S.L., Kim S.H., Geissert, D., Kimmer, C.B. and De Robertis, E.M.** 1998. Zebrafish paraxial protocadherin is a downstream target of spidetail involved in morphogenesis of gastrula mesoderm. *Development* **125**, 3389-3397.

Yamamoto, A., Kemp, C., Bachiller, D., Geissert, D. and De Robertis, E.M. 2000. Mouse paraxial protocadherin is expressed in trunk mesoderm and is not essential for mouse development. *Genesis* **27**, 49-57.

Yamanaka, H., Moriguchi, T., Masuyama, N., Kusakabe, M., Hanafusa, H., Takada, R., Takada, S. and Nishida, E. 2002. JNK functions in the non-canonical Wnt pathway to regulate convergent extension movements in vertebrates. *EMBO Rep.* **3**, 69-75.

Yokota, C., Kofron, M., Zuck, M., Houston, D.W., Isaacs, H., Asashima, M., C.C. Wylie and Heasman, J. 2003. A novel role for a *nodal*-related protein; Xnr-3 regulates convergent extension movements via the FGF receptor. *Development* **130**, 2199-2212.

Zhou, X., Sasaki, H., Lowe, L., Hogan, B.L., Kuehn, M.R. 1993. Nodal is a new TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* **361**, 543-547.

VII ANHANG

1 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Doris Wedlich für die Möglichkeit, in ihrem Institut meine Doktorarbeit auf dem interessanten Gebiet der Entwicklungsbiologie anzufertigen. Ihre wertvollen Tipps trugen sehr zum Fortschritt der Arbeit bei.

Spezieller Dank gebührt Frau Dr. Alexandra Schambony für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, für die exzellente wissenschaftliche Betreuung und dafür, dass auch die angenehmen Seiten des Laboralltags nicht zu kurz kamen. Und nicht zuletzt natürlich für das Schneiden von unzähligen Keller-Explantaten.

Ich danke Mareen Welzel und Melanie Hill für ihre Unterstützung bei der Präparation von Keller-Explantaten sowie bei der radioaktiven Hybridisierung.

Den weiteren Mitgliedern der „AG Schambony“ Isabelle Albert, Thorsten Gnad, Jörg Hefele, Eva Klein und Claudia Winter danke ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft und für die gute Stimmung bei der Arbeit.

Ich danke allen anderen Mitarbeitern des Instituts für eine angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Herrn PD Dr. Bernd Sures danke ich für die Übernahme des Koreferats.

2 Publikationen

Veröffentlichungen

- **Unterseher, F., Hefele, J.A., Giehl, K., De Robertis, E.M., Wedlich, D. and Schambony, A.** 2004. Paraxial protocadherin coordinates cell polarity during convergent extension via Rho A and JNK. *EMBO J.* **23**, 3259-3269.
- **Unterseher, F. und Schambony, A.** 2004. Wnt-Signale bewegen Zellen. *BIOSpektrum* 10. Jahrg. 1/04. 96-98.

Poster

- **Unterseher, F., Schambony, A. and Wedlich, D.:** A system to characterize the role of Xnr-3 during convergent extension movement. 4th GfE-School. Günzburg, Oktober 2002.
- **Schambony, A., Unterseher, F. and Wedlich, D.:** The role of Wnt-signalling and cadherins in convergent extension movements. DGZ – annual meeting of cell biology and development. Bonn, März, 2003.

3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 19. August 1973
 Geburtsort: Malsch
 Familienstand: ledig

Ausbildung

1980 bis 1984	Grundschule Oberndorf
1984 bis 1993	Tulla-Gymnasium Rastatt
17. Mai 1993	Abschluss der Schulzeit mit Abitur
1993 bis 1994	Zivildienst bei der Arbeiterwohlfahrt Rastatt
1994 bis 1995	Chemie-Studium an der Universität Heidelberg
1995 bis 2001	Biologie-Studium an der Universität Karlsruhe
11.1998 – 01.1999	Parasitologisches Projektpraktikum in Bolivien
01.2001 – 09.2001	Diplomarbeit am Mikrobiologischen Institut „Untersuchungen zur Regulation der Transkription von <i>nosA</i> in <i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC14405 sowie zur biologischen Funktion des Proteins“
17. Sept. 2001	erfolgreicher Abschluss des Studiums.
seit März 2002	Promotion am Zoologischen Institut II der Universität Karlsruhe im Bereich molekulare Entwicklungs- und Zellphysiologie „Einfluss der Wnt-Signalwege auf die konvergente Ausdehnung des Mesoderms im Verlauf der Gastrulation von <i>Xenopus laevis</i> “