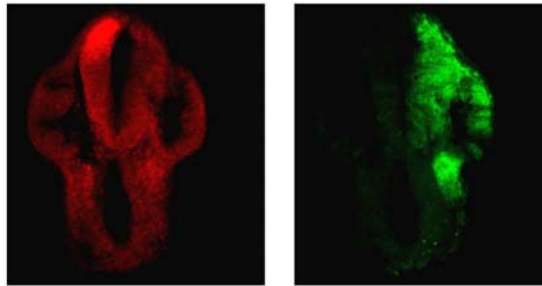


Die Rolle der Lef/Tcf-Transkriptionsfaktoren in der Gehirnentwicklung von *Xenopus laevis*



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
Martin Kunz
aus Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. Manfred Kappes
Referent: Prof. Dr. Doris Wedlich
Co-Referent: PD. Dr. Bernd Sures
Tag der mündlichen Prüfung: 11. – 15. Juli 2005

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde im Institut für molekulare Entwicklungs- und Zellphysiologie (Zoologie II) der Universität Karlsruhe in der Zeit von Juli 2002 bis Februar 2005 durchgeführt.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Martin Kunz, Mai 2005

Inhaltsverzeichnis

1.	<u>Einleitung</u>	7
1.1	Die Entwicklung des zentralen Nervensystems in Vertebraten	7
1.1.1	Neuralinduktion	8
1.1.2	Die dorso-ventrale Musterbildung des ZNS	10
1.1.3	Die antero-posteriore Musterbildung des ZNS	12
1.1.3.1	Vorderhirn	13
1.1.3.2	Mittelhirn und Isthmus-Organisator	14
1.1.3.3	Hinterhirn	17
1.2	Der Wnt/β-Catenin- oder kanonische Wnt-Signalweg	18
1.3	Die Lef/Tcf-Transkriptionsfaktoren	20
1.3.1	Lef/Tcf-Bindepartner	20
1.3.2	Isoformen der <i>Xenopus</i> Lef/Tcfs	23
1.3.3	Expressionsmuster der Lef/Tcfs und ihre Rolle in der Embryonalentwicklung	25
2.	<u>Zielsetzung</u>	29
3.	<u>Materialien</u>	30
4.	<u>Methoden</u>	40
4.1	Entwicklungsbiologische und Immunbiologische Methoden	40
4.1.1	Haltung von <i>Xenopus laevis</i>	40
4.1.2	Eiablage	40
4.1.3	Testisextraktion	41
4.1.4	<i>In vitro</i> Fertilisation	41
4.1.5	Entfernen der Gallerthülle	41
4.1.6	Mikroinjektion	41
4.1.7	Embryonenpflege	42
4.1.8	Präparation ektodermaler Explantate (animale Kappen)	42
4.1.9	Ganzkeimfärbung – Whole mount <i>in situ</i> -Hybridisierung	43

4.1.10	Embryoneneinbettung in Agarose und Anfertigen von Vibratomschnitten	46
4.1.11	Embryoneneinbettung in Technovit 8100	46
4.1.12	Methylenblau/Fuchsin-Färbung von Technovitschnitten	46
4.1.13	Indirekte Antikörperfärbung an Ganzkeimen, Gehirnen und Vibratomschnitten	46
4.2	Proteinbiochemische Methoden	48
4.2.1	Proteinextraktion aus Embryonen	48
4.2.2	Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese (SDS-PAGE)	48
4.2.3	Western Blot Analyse	50
4.3	Molekularbiologische und Mikrobiologische Methoden	51
4.3.1	Fällen von DNA und RNA	50
4.3.2	Aufreinigung von DNA und RNA mit Phenol/Chloroform	52
4.3.3	Aufreinigung von DNA und RNA über Säulen	52
4.3.4	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	52
4.3.5	Restriktionsanalyse von DNA	53
4.3.6	cDNA – Synthese mittels reverser Transkription	53
4.3.7	Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels PCR (Polymerase Kettenreaktion)	54
4.3.8	Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels pwo-PCR	54
4.3.9	Analytische Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA oder RNA	55
4.3.10	Präparative Gelelektrophorese	55
4.3.11	Dephosphorylierung linearer DNA am 5'-Ende	56
4.3.12	Ligation von DNA-Fragmenten	56
4.3.13	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	56
4.3.14	Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> Bakterien mit Plasmiden	57
4.3.15	Blau-Weiß-Selektionierung	57
4.3.16	Isolierung bakterieller Plasmid-DNA im Kleinmaßstab	58
4.3.17	Endotoxinfreie Isolierung bakterieller Plasmid-DNA im Großmaßstab	58
4.3.18	TELT-Plasmid-Präparation	59

4.3.19	<i>In vitro</i> Transkription von mRNA	59
4.3.20	Präparation von Gesamt-RNA	60
4.3.21	Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA	60
4.3.22	Substraktiver Screen	61
4.3.22.1	Anreicherung selektiv exprimierter Gene	61
4.3.22.2	Eliminierung falsch positiver Gene	64
4.3.22.2.1	Anlegen einer cDNA-Bibliothek der selektiv exprimierten Gene	64
4.3.22.2.2	Southern Blot	66
4.3.22.2.3	Dot Blot	66
4.3.22.2.4	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mittels PCR	67
4.3.22.2.5	Radioaktive Hybridisierung	68
5.	<u>Ergebnisse</u>	69
5.1	Charakterisierung der Morpholino-antisense-Oligonukleotide zum spezifischen knock-down von Xwnt-2b, XTcf-4 und XTcf-3	69
5.1.1	Umklonierung von XTcf-3 in pCS2myc-Vektor	70
5.1.2	Die Morpholino-Oligonukleotide unterdrücken spezifisch die Translation ihrer Zielgene	72
5.2	Xwnt-2b kontrolliert die XTcf-4 Expression	74
5.3	Die Wnt/β-Catenin-Signalkaskade reguliert die XTcf-4-Expression	76
5.4	XTcf-4 ist wichtig für die Entwicklung des Mittelhirnes	78
5.4.1	Der XTcf-4 knock-down führt zum Verlust von neuralem Gewebe im dorsalen Mittelhirn	79
5.4.2	XTcf-4 reguliert die Zellproliferation im dorsalen Mittelhirn	81
5.4.3	XTcf-4-Isoformen besitzen unterschiedliche Funktionen in der Entwicklung des Mittelhirnes	83
5.4.4	Die XTcf-4 Isoformen kontrollieren die Entwicklung unterschiedlicher Gehirnregionen	86
5.5	XTcf-4-Morpholino knock-down Embryonen zeigen ein abnormes Schwimmverhalten	88

5.6	Morphologische Ursachen des abnormen Schwimm- verhaltens	90
5.6.1	Der XTcf-4 knock-down führt zu einer Reduktion der Ohrvesikel	90
5.6.2	Der XTcf-4 knock-down resultiert in morphologischen Veränderungen der Somiten	92
5.7	Identifizierung unterschiedlicher Zielgene von XTcf-3 und XTcf-4 mittels substraktiver suppressiver Hybridisierung	94
5.7.1	Auswahl der RNA-Populationen für den substraktiven Screen	95
5.7.2	Mit substraktivem Screen werden Zielgene von XTcf-3 und XTcf-4 selektiv amplifiziert	99
6.	<u>Diskussion</u>	107
6.1	Der kanonische Wnt-Signalweg reguliert die XTcf-4 Expression	107
6.2	XTcf-4 reguliert die Entwicklung des Mittelhirnes	109
6.3	XTcf-4 Isoformen besitzen unterschiedliche Funktionen in der Entwicklung des Mittelhirnes	112
6.4	Der XTcf-4 knock-down führt zur Reduktion der Ohrvesikel	114
6.5	XTcf-4 wird in den Somiten exprimiert und der XTcf-4 knock- down führt zu Defekten in den Somiten	115
6.6	Der XTcf-4 knock-down führt zu einem ungewöhnlichen Schwimmverhalten	117
6.7	Identifizierung unterschiedlicher Zielgene von XTcf-3 und XTcf-4 mittels substraktiver suppressiver Hybridisierung	118
7.	<u>Zusammenfassung</u>	121
8.	<u>Literatur</u>	123
9.	<u>Anhang</u>	135
	Danksagung	135
	Publikationen	136
	Lebenslauf	137

1. Einleitung

1.1 Die Entwicklung des zentralen Nervensystems in Vertebraten

Alle Vertebraten teilen sich einen gemeinsamen Körperbauplan. Entlang der antero-posterioren (A-P) Achse bilden sich Kopf, Rumpf und Schwanz. In dorso-ventraler (D-V) Richtung unterscheidet man Rückgrat und Bauch und auch die asymmetrische Anordnung der Organe entlang der rechts-links Achse ist hochkonserviert. Eine gemeinsame Grundstruktur ist auch in der Organisation des Gehirns erkennbar. Dies basiert auf der Übereinstimmung im Ablauf morphogenetischer Bewegungen und in der Aktivierung derselben Signalkaskaden. Bereits in der Gastrulation werden die ersten Festlegungen für die spätere Struktur des Gehirns gelegt.

Im Verlauf der Gastrulation entsteht aus der einschichtigen Blastula ein dreischichtiger Keim. Auf der ventralen Seite bildet sich der Urdarm, der sich vom dorsal einwandernden Mesoderm trennt und durch seitliches Hochwachsen zum Darmrohr schließt. Das Mesoderm bildet einen „Mantel“, der sich zwischen Ektoderm und Entoderm schiebt. Das Ektoderm kompensiert die Invagination, indem es sich auf der Oberfläche des Keimes ausbreitet (Epibolie). Im Ektoderm unterscheidet man wiederum einen dorsalen und einen ventralen Teil. Das ventrale Ektoderm entwickelt sich zur Epidermis, wohingegen der dorsale Teil die Neuralplatte und später das zentrale Nervensystem bildet. Induziert wird die Differenzierung zum Neuroektoderm von Signalen aus dem einwandernden Mesoderm (Lumsden und Krumlauf, 1996). Diese Induktion erfolgt schon während der Gastrulation, wie Hans Spemann und Hilde Mangold in Freiburg in den zwanziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts anhand von Transplantationsexperimenten zeigen konnten. Dabei transplantierten sie die dorsale Blastoporuslippe einer frühen Molch-Gastrula in das ventrale Mesoderm einer Wirts-Gastrula desselben Stadiums. Die Zellen des Transplantates wirkten auf das benachbarte ventrale Mesoderm und veränderten dessen Differenzierung. Es entwickelte sich nun nicht zu epidermalem Gewebe, sondern bildete ein vollständiges zweites Nervensystem (Spemann und Mangold, 1924).

Der Prozess der Neuralentwicklung gliedert sich in verschiedene aufeinanderfolgende und teilweise überlappende Teilschritte: 1. Die Neuralinduktion während der Gastrulation wobei bereits die Positionsinformation in anterior-posteriorer Richtung festgelegt wird; 2. die Neurulation mit der schon die

dorsoventrale Musterung einhergeht und aus der das Neuralrohr hervorgeht; 3. die antero-posteriore Musterbildung mit der Gliederung in Vorderhirn (Prosencephalon), Mittelhirn (Mesencephalon) und Hinterhirn (Rhombencephalon) und 4. die Verfeinerung der A-P Musterung durch sekundäre Organisationszentren.

1.1.1 Neuralinduktion

Im Blastulastadium mustern zwei Organisationszentren den Embryo, von denen ersteres die Bildung des Gehirns prägt: Das BCNE (Blastula Chordin und Noggin Expression)-Zentrum im animalen Bereich der Blastula und das Nieuwkoop Zentrum im vegetalen Teil. Die Bildung beider Zentren beginnt direkt nach dem Midblastula-Übergang, d.h. zum Start der zygotischen Transkription und ist abhängig von einer β -Catenin Anreicherung auf der dorsalen Seite des Embryos (De Robertis und Kuroda, 2004) (Abb.1).

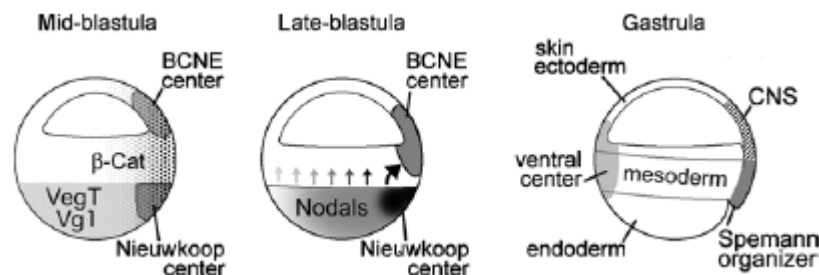


Abb.1: Formation der Organisationszentren in *Xenopus laevis*. Embryonen im Blastula-Stadium werden von zwei Signal-Zentren gemustert, dem BCNE (Blastula Chordin und Noggin Expression)-Zentrum im animalen- und dem Nieuwkoop-Zentrum im vegetalen Bereich. Das Vorhandensein von β -Catenin auf der dorsalen Seite des Embryos ist von entscheidender Bedeutung für die Bildung dieser beiden Organisatoren. Der Spemann-Organisator wird im dorsalen Mesoderm der Gastrula von Nodal- verwandten Signalen aus dem Nieuwkoop-Zentrum induziert (aus: de Robertis und Kuroda, 2004).

Das BCNE-Zentrum ist an der Ausbildung von anteriorem Neuralgewebe beteiligt und entwickelt sich später zu Vorder-, Mittel- und Nachhirn, Bodenplatte und Neuralrohr. Vom Nieuwkoop Zentrum dagegen gehen Signale aus, die im dorsalen Mesoderm der Gastrula den Spemann-Organisator induzieren (Abb.2). Die Verteilung von maternalem β -Catenin kontrolliert somit die Bildung dieser beiden Signalzentren (De Robertis und Kuroda, 2004).

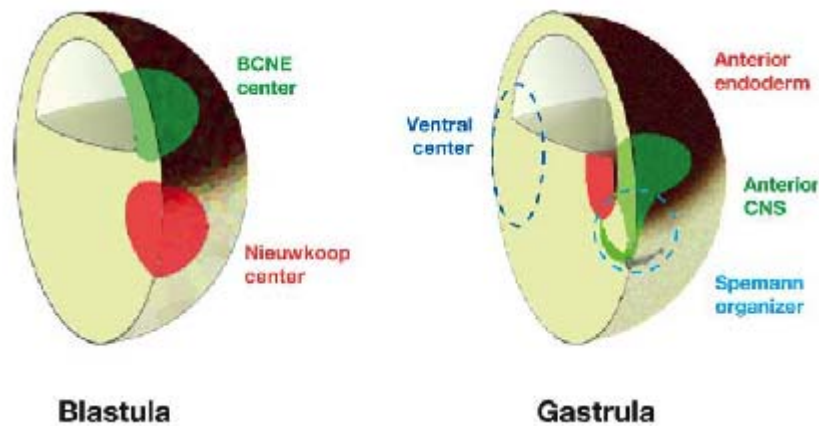


Abb.2: Die Signalzentren in Blastula- und Gastrula-Stadien formieren den Körperplan von *Xenopus*. Das BCNE-Zentrum in der Region der dorsalen animalen Kappe in Blastula-Stadien (links) und die Chorda-Region des Spemann Organizers in Gastrula-Stadien (rechts) entwickelt sich zum zukünftigen Gehirn und zur Bodenplatte. Zellen aus dem Nieuwkoop-Zentrum dagegen werden in Gastrula-Stadien zu anteriorem Entoderm (aus: de Robertis und Kuroda, 2004).

In *Xenopus laevis* konnte der Mechanismus, durch welchen der Spemann-Organisator neurales Schicksal in benachbartes Gewebe induziert, unter anderem mithilfe von animalen Kappen-Explantaten untersucht werden. Dabei handelt es sich um ektodermales Gewebe vom Blastocoeldach später Blastula-Embryonen. Kultiviert man diese Explantate *in vitro*, so entwickeln sie sich zu epidermalem Gewebe. Dissoziiert man sie jedoch in einzelne Zellen, so erhalten diese nach Reaggregation neuronalen Charakter (Grunz und Tacke, 1989). Dies waren die ersten Hinweise, dass zwischen frühen Ektodermzellen Signale ausgetauscht werden, die eine Differenzierung in Neuralgewebe unterdrücken. Badet man die dissoziierten Zellen in einer BMP4 (Bone Morphogenetic Protein)-haltigen Lösung, erhalten sie wiederum epidermalen Charakter (Wilson und Hemmati-Brivanlou, 1995). Setzt man intakte animale Kappen einem BMP-Inhibitor aus, entwickeln sie sich zu Neuralgewebe (Hemmati-Brivanlou und Melton, 1997). Somit unterdrücken BMP-Signale die Tendenz von Ektodermzellen, sich zu Neuralzellen zu differenzieren. Im *Xenopus* Embryo ist BMP zunächst ubiquitär exprimiert, verschwindet aber im Bereich der prospektiven Neuralplatte, sobald in der Gastrulation der Organisator entsteht. Die Bmp-Inhibitoren chordin, noggin und follistatin werden im Spemann-Organisator exprimiert, konkurrieren mit BMP um die Rezeptorbindung und inhibieren damit die BMP-Signaltransduktionskaskade (Zimmermann et al. 1996, Piccolo et al. 1996). Sie sind in der Lage, in animalen Kappen neurale Markergene zu induzieren (Sasai et al. 1995, Hemmati-Brivanlou et al. 1994, Lamb et al. 1993). Außerdem ist der Spemann-Organisator die Quelle der Wnt-Inhibitoren Frzb1 (frizzled-related protein), Crescent

und Dickkopf-1, der Nodal-Inhibitoren Lefty/Antivin, die alle als Wachstumsfaktor-Antagonisten wirken sowie von Cerberus, einem Inhibitor von BMPs, Xnrs (*Xenopus nodal-related*) und Xwnt-8. Aufgrund ihrer posteriorisierenden Fähigkeit kommen Retinolsäure, Wnt-3A und die bFgfs (basische Fibroblasten-Wachstumsfaktoren), als Aktivatoren in Frage (Stern, 2001).

Arbeiten an anderen Modellorganismen haben gezeigt, dass sowohl Fgf- als auch Wnt-Signale an der Neuralinduktion beteiligt sind. Im Hühnchen beispielsweise induzieren Fgf-Signale die Expression von neuronalen Markergenen, wohingegen Chordin und Noggin dazu nicht in der Lage sind. In animalen Kappen von *Xenopus* agieren Fgfs als Neuralinduktoren (Harland, 2000), ebenso induzieren Wnt-Antagonisten neurale Markergene (Glinka et al. 1997). Jedoch ist die Rolle von Fgf noch unklar, da einerseits ein intaktes Fgf-Signal für die Neuralinduktion notwendig ist (Hongo et al., 1999), andererseits aber Studien an dieser Funktion zweifeln lassen (Kroll und Amaya, 1996). Wahrscheinlich besitzt es die Funktion eines frühen Aktivators für Neuralgewebe, der dann bei der anschließenden Transformation von anteriorem in caudales Neuroektoderm die Rolle eines Kofaktors innehat (Stern, 2001).

1.1.2 Die dorso-ventrale Musterbildung des zentralen Nervensystems

Die anfängliche Musterung entlang der medio-lateralen Achse im dorsalen Ektoderm erfolgt noch im Stadium der offenen Neuralplatte. Mediale Zellen, die später den ventralen Teil des Neuralrohres, die Bodenplatte bilden, werden aus der Chorda (axiales Mesoderm), die als Organisationszentrum wirkt, von Sonic hedgehog (Shh), chordin, noggin und follistatin (Wessely und de Robertis, 2002) und aus den Somiten von Retinolsäure spezifiziert (Gilbert, 2000). Shh wirkt in diesem Fall als Morphogen und kann abhängig von der Konzentration die Zellen in unterschiedliche Schicksale dirigieren. So induzieren hohe Shh-Konzentrationen (10^{-8} M) überwiegend Bodenplatte, während sich bei niedrigeren Konzentrationen (10^{-9} M) Motoneuronen bilden. Entfernt man die Chorda oder blockiert Signale aus ihr, werden die Zellen des Neuralrohres dorsalisiert (Altmann und Brivanlou, 2001).

Lateral gelegene Zellen, die nach der Neurulation zu dorsalen Strukturen wie der dorso-lateralen Zellpopulation der Neuralleisten, der Deckenplatte oder den dorsalen

Neuronen differenzieren, werden von BMPs, Wnts und Fgf aus der benachbarten Epidermis dorsalisiert (Lee und Jessell, 1999, Tsuda et al. 2002).

Die Mitglieder der Wnt-Superfamilie nehmen hauptsächlich Einfluss auf die Spezifikation der Neuralleistenzellen. Dabei sind sie sowohl an der Determination des Zellschicksals als auch an der Expansion dorsaler Vorläuferzellen im Neuralrohr durch Proliferation beteiligt. In neuralisierten animalen Kappen induzieren überexprimiertes Wnt-1, Wnt-3a oder Wnt-7 die Expression von Neuralleistemarkern und dorsalen Neuralmarkergenen (Saint-Jeannet et al. 1997, Chang und Hemmati-Brivanlou, 1998). Bis jetzt ist es unklar, wie BMPs und Wnts bei der Musterung des dorsalen Neuralrohres zusammenwirken, aber es scheint möglich, dass beide Signale beim Abstimmen der zeitlichen und räumlichen Kompetenz der Empfängerzellen zusammenarbeiten.

Wichtig für die Festlegung dorsalen Zellschicksals, Neuralleistenbildung und für das Schließen des Neuralrohres sind die von der Shh-Repression auf den dorsalen Bereich des Neuralrohres beschränkten paired box Transkriptionsfaktoren Pax3 und Pax7 (Koblar et al. 1999). Die D-V-Musterung im späteren Vorder- und Hinterhirn wird von ventralisierendem Shh aus der Prächordalplatte und der Chorda und von den dorsalisierenden BMPs und Fgfs aus der Epidermis bestimmt (Muhr et al. 1997). Im Falle des Hinterhirns, als größte Quelle für Neuralleistenzellen, gibt es eine direkte Verbindung zwischen den einzelnen Rhombomeren und den zugehörigen cranialen Neuralleistenzellen, welche durch BMP4 reguliert wird (Altmann und Brivanlou, 2001).

Über die dorso-ventrale Musterung des Mittelhirnes ist wenig bekannt, es werden aber dieselben Mechanismen wie in Vorder- und Hinterhirn angenommen. Außerdem könnten im Mittelhirn auch Mitglieder der Wnt Superfamilie entscheidend Einfluss auf dessen Gliederung nehmen (Altmann und Brivanlou, 2001).

Zusammengefasst wird die Musterung entlang der medio-lateralen (M-L) Achse während des Neuralplattenstadiums und in dorso-ventraler (D-V) Richtung während und nach dem Schließen des Neuralrohres von zwei entgegengesetzten Signalgradienten vorangetrieben. Aus der Chorda wird von Shh dorsales Schicksal unterdrückt und ventrales Schicksal gefördert. Dorsalisierende Signale durch BMPs und Wnts kommen zunächst aus der Grenze zwischen neuralem und nichtneurealem Ektoderm und später aus der Deckenplatte.

Als interessantes Phänomen wird die Inversion des Expressionsmusters von D-V-Mustergenen in der Evolution zwischen *Drosophila* und Vertebraten beschrieben. Dabei sind homologe Gene aus dem dorsalen Neuralrohr von *Drosophila* in *Xenopus* im ventralen Teil exprimiert. In *Drosophila* ventral exprimierte Marker erscheinen im Vertebraten-Neuralrohr dorsal (De Robertis und Kuroda, 2004) (Abb. 3).

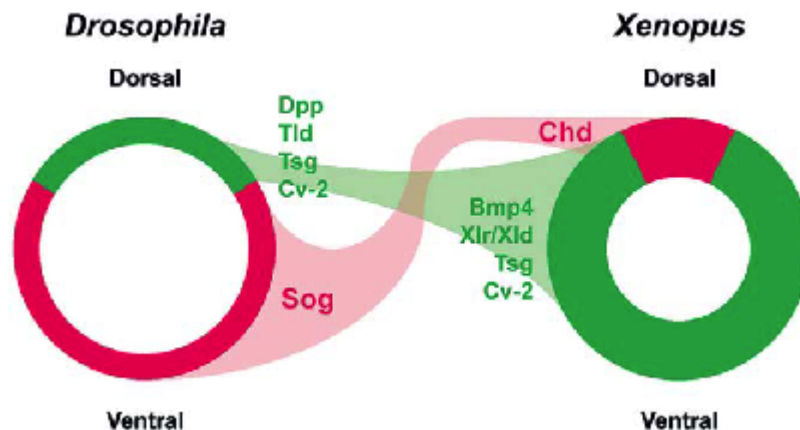


Abb.3: Inversion der Expressionsmuster konservierter extrazellulärer Regulatoren, die in die dorso-ventrale Musterung involviert sind. Beispielsweise wird das Vertebraten-Homolog zum ventral exprimierten *Drosophila* *Sog* (Short gastrulation), *Chd* (Chordin) in *Xenopus* dorsal exprimiert. Die in *Drosophila* dorsal exprimierten Gene *Dpp* (Dipeptidyl peptidase) und *Tld* (Tolloid) sind homolog zu *BMP4* und *Xlr* (X-linked lymphocyte-regulated)/*Xld* (Xolloid) in *Xenopus* (aus: de Robertis und Kuroda, 2004).

1.1.3 Die antero-posteriore Musterbildung des ZNS

Die erste grobe antero-posteriore Musterung erfolgt sehr bald nach der Neuralinduktion im offenen Neuralplattenstadium. Dabei wird in den Neuralzellen abhängig von der Position entlang der A-P-Achse die Expression von positionsspezifischen Genen induziert.

Mit der Expression von *Pax6* im späteren Vorderhirn (Prosencephalon) und posterioren Hinterhirn (Myelencephalon) und *Pax2* und *Pax5* im dazwischenliegenden Mittelhirn (Mesencephalon) und anterioren Hinterhirn (Metencephalon) wird die Neuralplatte in drei Bereiche, Vorder-, Mittel- und Hinterhirn gegliedert (Gilbert, 2000).

Die Tatsache, dass Spemann-Organisator-Transplantate aus frühen Gastrulae nahezu den kompletten Satz an anterioren und posterioren Markern induzieren, während Transplantate aus späteren Gastrulastadien überwiegend posteriore Neuralgene induzieren, führte zu dem Zwei-Stufen-Modell von Nieuwkoop: Im

Aktivierungsschritt wird die Neuralisation induziert und gleichzeitig anteriores Schicksal (Vorderhirn) festgelegt. Der nachfolgende Transformationsschritt besitzt keine neuralinduzierende Aktivitäten, stattdessen impliziert er caudales Schicksal (Mittelhirn, Hinterhirn und Rückenmark) über Fgf, Wnt und Retinolsäure. Stern (2001) erweiterte dieses Modell um einen Stabilisationsschritt, wobei sich die Zellen nach der Aktivierung zu Neuralgewebe differenzieren.

Die frühe Neuralplatte in *Xenopus* wird zusätzlich von einem Wnt/ β -Catenin-Signalgradienten transformiert (Kiecker und Niehrs, 2001). Einerseits wirken Mitglieder der Wnt-Familie wie Wnt-3a und Wnt-8 aus dem Chordamesoderm und lateroventralen Mesoderm posteriorisierend, andererseits üben Wnt-Antagonisten aus dem anterioren Neuroektoderm und Mesendoderm ventralisierenden Einfluss aus.

1.1.3.1 Vorderhirn

Schon bei den Kieferlosen (Agnatha) lässt sich eine Untergliederung des Vorderhirns in das der Nase zugeordnete anteriore Telencephalon und das die Augen versorgende posteriore Diencephalon erkennen. Diese Bereiche werden in dem sogenannten Prosomer-Modell in 6 transverse Prosomere gegliedert (Rubenstein und Puelles, 1994). Dabei bilden die Prosomere P1 und P2 das Diencephalon und die Prosomere P3 bis P6 das Telencephalon (Abb. 4). Untersuchungen am Huhn zeigten, dass das Prosomer P1 zusätzlich in zwei Untereinheiten (D3 und D4) unterteilt ist (Rubenstein und Shimamura, 1997). Dieses Modell wird gestützt von dem Expressionsmuster zahlreicher Homöobox-Gene und Mitgliedern verschiedener Signalwege, deren Expressionsgrenzen mit den Prosomergrenzen identisch sind.

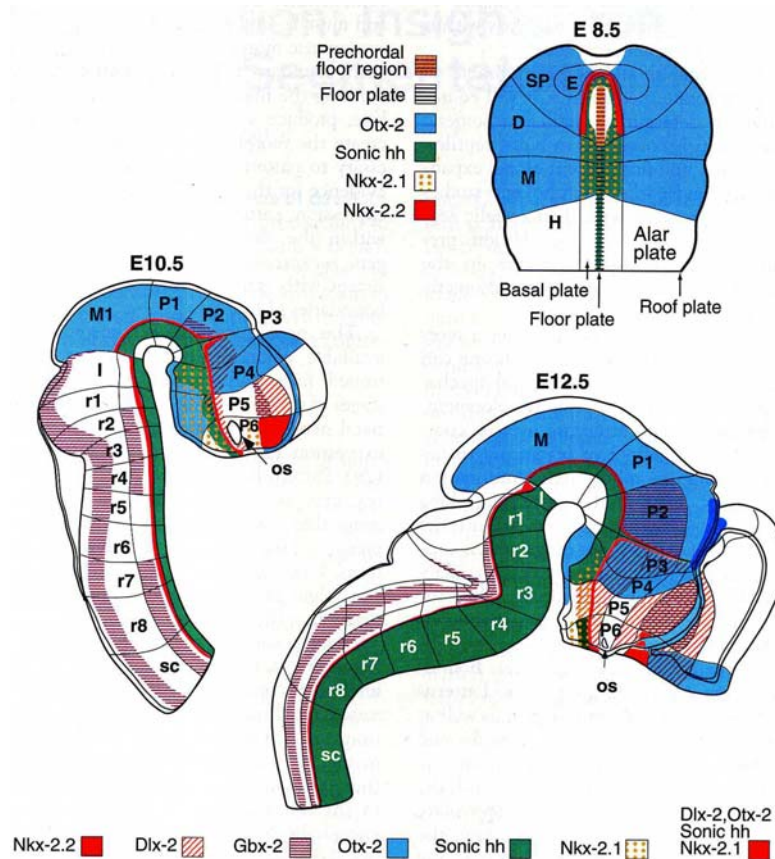


Abb.4: Die Prosomere im Vorderhirn werden von Genexpressionen definiert. Die Expression verschiedener Gene in der Neuralplatte (E8.5) und im Neuralrohr (E10.5 und E12.5) im embryonalen Gehirn der Maus. D, Diencephalon; E, Augen; H, Rhombencephalon-Hinterhirn; I, Isthmus; M, Mesencephalon-Mittelhirn; os, optischer Stiel; p, Prosomere; r, Rhombomere; sc, Rückenmark; SP, zweites Prosencephalon (Rubenstein und Puelles, 1994).

Die Gliederung von Prosencephalon und Mesencephalon wird des Weiteren von drei Signalzentren verfeinert. Über die dorsale Seite der Prosomere P5 und P6 erstreckt sich eine Fgf8-Quelle, die anteriore Neuralrippe, welche die anteriore Neuralplatte mustert. Der sezernierte Wachstumsfaktor Fgf8 induziert den Transkriptionsfaktor Bf1, welcher von entscheidender Bedeutung für die Gliederung und das Wachstum im Telencephalon und im optischen Vesikel ist (Shimamura und Rubenstein, 1997). Ausgehend von der Bodenplatte zieht eine Shh-Quelle zwischen die Prosomere P2 und P3 und determiniert die Grenze zwischen Telencephalon und Diencephalon.

1.1.3.2 Mittelhirn und Isthmus-Organisator

Das Mittelhirn oder Mesencephalon besteht aus drei Hauptregionen, dem Tectum, dem ventral dazu gelegenen Tegmentum und dem Isthmus, der Mittelhirn von Hinterhirn separiert. Im Zebrafisch führen zwei Mutationen unabhängig voneinander

zum völligen Verlust des Mittelhirns. Die Mutation *noi* (no isthmus) inaktiviert Pax2.1 (Pfeffer et al. 1998), während *ace* (acerebellar) Fgf8 inaktiviert (Reifers et al. 1998). Obendrein kann durch ektopische Fgf8-Expression die Bildung eines zusätzlichen Mittelhirn ausgelöst werden (Crossley et al. 1996).

Der Isthmus-Organisator als Quelle induktiver Signale wie Fgf8 und Wnt-1 wird im sich entwickelnden Gehirn von dem anterior gelegenen Expressionsbereich des Homöobox-Genes Otx2 und dem posterior im Hinterhirn gelegene Expressionsfeld von Gbx2 (gastrulation and brain specific homeobox protein 2) positioniert.

Die Grenze zwischen Mesencephalon und Metencephalon als Organisator wurde ursprünglich in Vogelembryonen entdeckt. Isthmuskewebe in andere Regionen des Gehirns transplantiert, induziert dort rostrocaudal polarisiertes posteriores Mittelhirn- und anteriores Hinterhirngewebe (Wurst und Bally-Cuif, 2001). Der Bildung dieser zweiten Mittelhirn/Hinterhirn-Region geht die ektopische Expression isthmusspezifischer Gene voraus. Das Entfernen des Isthmus führt zum völligen Verlust von Mesencephalon und Metencephalon. Der Isthmus scheint somit notwendig und hinreichend für die Entwicklung von rostrocaudal ausgerichtetem Mittel- und Hinterhirn zu sein.

Wie oben erwähnt wird der Isthmus am Ende der Gastrula durch die beiden Expressionsfelder von Otx2 und Gbx2 dosisabhängig festgelegt und in der Maus während der frühen Somitogenese von zahlreichen weiteren Genen verfeinert. Zu Beginn der Somitenbildung folgt die Expression von Wnt-1 und Pax2. Letzteres wird von Fgf4 aus dem axialen Mesoderm induziert (Rowitch und McMahon, 1995). Kurz danach erscheinen die Transkripte von En1 (engrailed 1), En2 welche ihrerseits von Pax2 induziert werden, Pax5 und Fgf8. Dabei scheinen die sowohl in Mittel- als auch in Hinterhirn exprimierten Gene wie En1, En2, Pax2 und Pax5 für die Entwicklung der kompletten Mittelhirn/Hinterhirn-Region wichtig zu sein. Wnt1 ausschließlich anterior und Fgf8 ausschließlich posterior des Isthmus exprimiert, kontrollieren vermutlich die Aufrechterhaltung oder Aktivität des Organisators (Wurst und Bally-Cuif, 2001) (Abb.5).

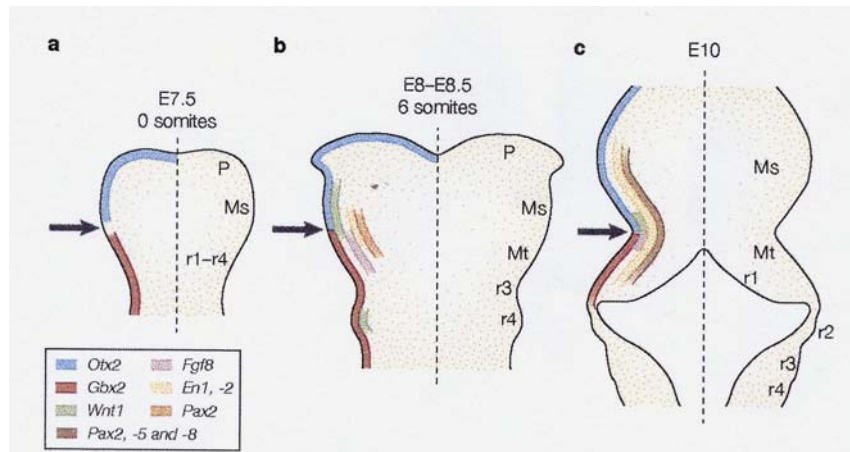


Abb.5: Dynamische Genexpressionsmuster an der Mittel-/Hinterhirngrenze. Dorsaler Blick auf die embryonale Neuralplatte der Maus im a) 0-Somiten-Stadium, b) 6-Somiten-Stadium und c) E10 Stadium. **a)** Am Ende der Gastrulation (0-Somiten), ist die Neuralplatte weitgehend in eine anteriore Domäne, welche *Otx2* und eine posteriore Domäne, welche *Gbx2* exprimiert, unterteilt. Die Expressionsmuster beider Gene treffen an der Mittel-/Hinterhirngrenze zusammen und bilden abnehmende Gradienten in gegensätzlicher Richtung. **b)** im 6-Somiten-Stadium sind die posteriore Grenze der *Otx2* Expression und die anteriore Grenze der *Gbx2* Expression schärfer ausgeprägt. Die *Wnt-1*-Expression, beginnend im Mesencephalon und *En1*, gefolgt von *En2* und *Pax2* überschreiten die *Otx2*-*Gbx2*-Grenze. Kurz darauf erscheint *Fgf8* auf der caudalen Seite der *Otx2*-*Gbx2*-Grenze. **c)** Im Stadium E10 identifiziert die *Otx2*-*Gbx2*-Grenze die Mittelhirn/Hinterhirngrenze. Die *Wnt-1*- und *Fgf8*-Expression sind auf einen schmalen Ring, der das Neuralrohr umgibt auf beiden Seiten der Mittelhirn/Hinterhirngrenze beschränkt. (Ms, Mesencephalon; Mt, Metencephalon; P, Prosencephalon; r, Rhombomere; die Pfeile markieren die Mittelhirn/Hinterhirngrenze) (Wurst und Bally-Cuif, 2001).

Es ist jedoch weiterhin unklar, ob *Otx2* und *Gbx2* die Expression anderer wichtiger Moleküle wie *Wnt-1* und *Fgf8* direkt kontrollieren, oder ob andere Faktoren zwischengeschaltet sind. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass weitere Faktoren existieren, da in verschiedenen Maus-Experimenten gezeigt werden konnte, dass die Expression von *Fgf8* und *Wnt-1* primär unabhängig von der Funktion von *Otx2* und *Gbx2* ist (Wassarman et al. 1997).

Fgf8 scheint als Schlüsselmolekül in der Vermittlung der Organisationsaktivität des Isthmus über größere Distanzen zu fungieren, da es als einziger Faktor in der Lage ist sowohl die ektopische Expression von Mittel- und Hinterhirnmarkern als auch die Bildung polarisierter mesencephaler und cerebellarer Strukturen auszulösen (Irving und Mason, 2000, Crossley et al. 1996).

Offensichtlich hat der Isthmus Organisator auch Einfluss auf die Spezifizierung von Monoamin-produzierenden Zellpopulationen. Im Tegmentum, dem ventralen Teil des Mittelhirns bilden Dopamin-Neuronen die Substantia nigra, im Pons, dem ventralen Teil des Hinterhirns Serotonin-Neuronen die Raphe nuclei und im Cerebellum, dem dorsalen Teil des Rhombomer 1 Noradrenalin-Neuronen den Locus coeruleus. Zur

Ausbildung jeder dieser Nervenzellpopulationen ist Fgf8 aus dem Isthmus erforderlich (Wurst und Bally-Cuif, 2001) (Abb.6).

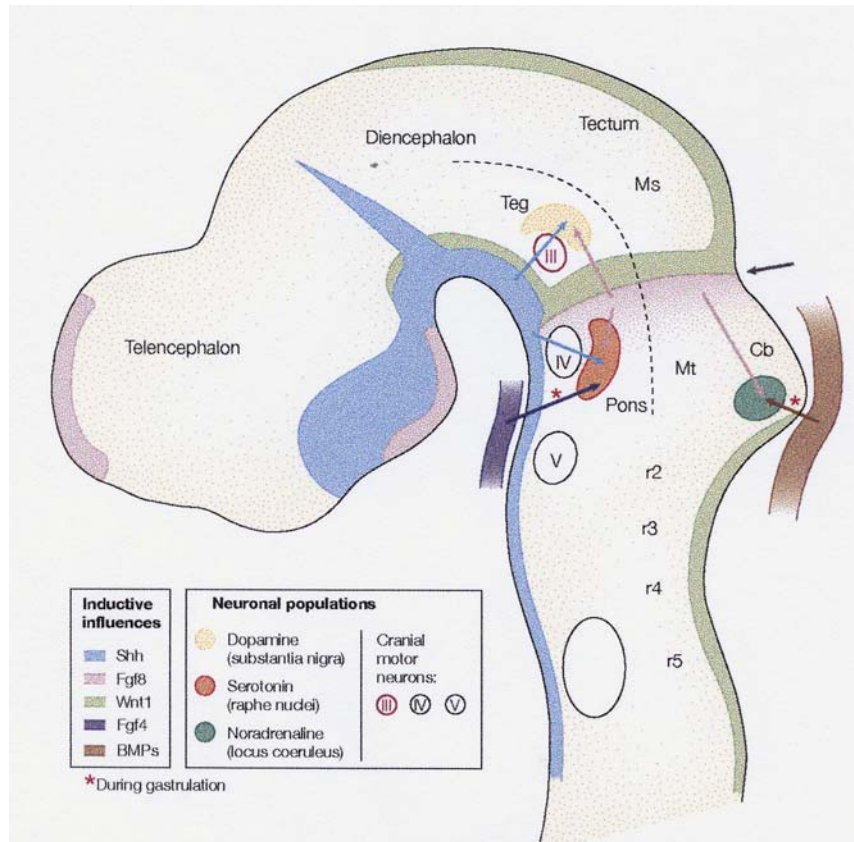


Abb.6: Zusammenspiel zwischen Signalen, die anteroposterior und dorsoventral mustern, spezifizieren neuronale Identität an der Mittelhirn/Hinterhirngrenze. Neuralrohr eines Mäuseembryos im Stadium E11. Induktive Einflüsse (Pfeile) ausgehend von der Neuralplatte der Mittelhirn/Hinterhirngrenze (Fgf8), der Bodenplatte (Shh) und während der Gastrulation von nicht-neuralem Gewebe (Fgf4 vom anterioren Mesoderm und Mitglieder der Bmp-Familie vom nicht-neuralen Ektoderm), kontrollieren die neuronale Identität. Fgf8 ist neben anderen Faktoren zur Ausbildung der Monoamin-produzierenden neuronalen Zellpopulationen erforderlich. (Cb, Cerebellum; Ms, Mesencephalon; Mt, Metencephalon; r, Rhombomere; Teg, Tegmentum; Tel, Telencephalon) (Wurst und Bally-Cuif, 2001).

1.1.3.3 Hinterhirn

Am besten untersucht ist die antero-posteriore Musterung im Hinterhirn. Es gliedert sich nach dem Schließen des Neuralrohrs in 8 Rhombomere. Diese Gliederung wird überwiegend durch Hox-Gene unter der Kontrolle von Retinolsäure etabliert. Die anterioren Expressionsgrenzen zahlreicher Hox-Gene stimmen exakt mit den Rhombomergrenzen überein. Zusätzlich lässt sich jedes Rhombomer mit der Expression einer spezifischen Kombination von Hox-Genen charakterisieren.

Mitglieder dieses Hox-Komplexes werden ihrerseits vom paraxialen Mesoderm (Somiten) induziert.

Retinolsäure ist im Amnioten-Äquivalent zum Spemann-Organisator, dem Hensenschen Knoten exprimiert und nimmt von dort aus Einfluss auf die Hinterhirn-Musterung (Gould et al. 1998, van der Wees et al, 1998). *Xenopus*-Embryonen, die in Retinolsäure inkubiert werden, entwickeln übergroße Mittel- und Hinterhirne, und verkleinerte Vorderhirne (Kolm et al. 1997). Vitamin A-Mangel, der zum Verlust von Retinolsäure führt, resultiert bei Wachteln im Fehlen posteriorer Rhombomere (Maden et al. 1996). Hohe oder sehr niedrige Retinolsäurekonzentrationen beeinflussen wiederum die Expression von Hox-Genen.

1.2 Der Wnt/ β -Catenin- oder kanonische Wnt-Signalweg

Die Mitglieder der Wnt-Signalprotein-Familie sind cysteinreiche Glykoproteine und haben Anteil sowohl an zahlreichen Ereignissen während der Embryonalentwicklung als auch an der Homöostase in adulten Geweben. Wnt-Signale haben Effekte auf die Mitogen-Stimulation, die Spezifizierung von Zell-Schicksalen und die Differenzierung (Cadigan und Nusse, 1997). Innerhalb der Wnt-Familie werden üblicherweise zwei funktionelle Klassen unterschieden. Die Gruppe der Wnts mit transformierenden und achsen-induzierenden Eigenschaften wozu in *Xenopus* Xwnt-1, -2b, -3a, -8 und -8b gezählt werden und Gruppe derjenigen, die keine achseninduzierenden Fähigkeiten besitzen.

Wnt-Proteine werden von Zellen sezerniert und binden an die extrazelluläre Domäne eines Rezeptors (Frizzled) der mit LRP (low density lipoprotein (LDL) receptor related protein) einen Komplex bildet. Der so gebundene Rezeptor aktiviert im Cytoplasma das Phosphoprotein dishevelled (dsh). Das aktivierte dsh wiederum inhibiert die Glykogen Synthase Kinase-3 β (GSK3 β), welche komplexiert mit Adenomatous polyposis coli protein (APC), Conductin/Axin und GSK-3-binding protein (GBP) vorliegt. Daraufhin unterbleibt die Phosphorylierung von β -Catenin an charakteristischen Serinresten im N-terminalen Bereich durch die GSK3 β . Hypophosphoryliertes β -Catenin ist vor Degradation im Ubiquitin-Proteosom geschützt. In Zellen mit inaktivem Wnt-Weg wird die cytoplasmatische β -Catenin Menge mit dem Abbau im Proteosom niedrig gehalten, doch nach Aktivierung der

Signalkaskade akkumuliert es im Cytoplasma und transloziert in den Zellkern. Dort interagiert es mit Transkriptionsfaktoren der Lef/Tcf-Familie (lymphoid enhancer-binding factor/T cell-specific transcription factor). Dieser Komplex bindet über die HMG (High mobility group)-Box der Lef/Tcfs an DNA und reguliert die Transkription verschiedener Zielgene wie *siamois*, *Xenopus nodal related 3 (Xnr3)*, *fibronectin* oder *twin* (Brannon et al., 1997; McKendry et al., 1997; Gradl et al., 1999, Laurent et al. 1997). Als Zielgene wurden auch Mitglieder des Wnt-Signalweges selbst identifiziert, was auf die Regulation über eine autoregulatorische Schleife hindeutet.

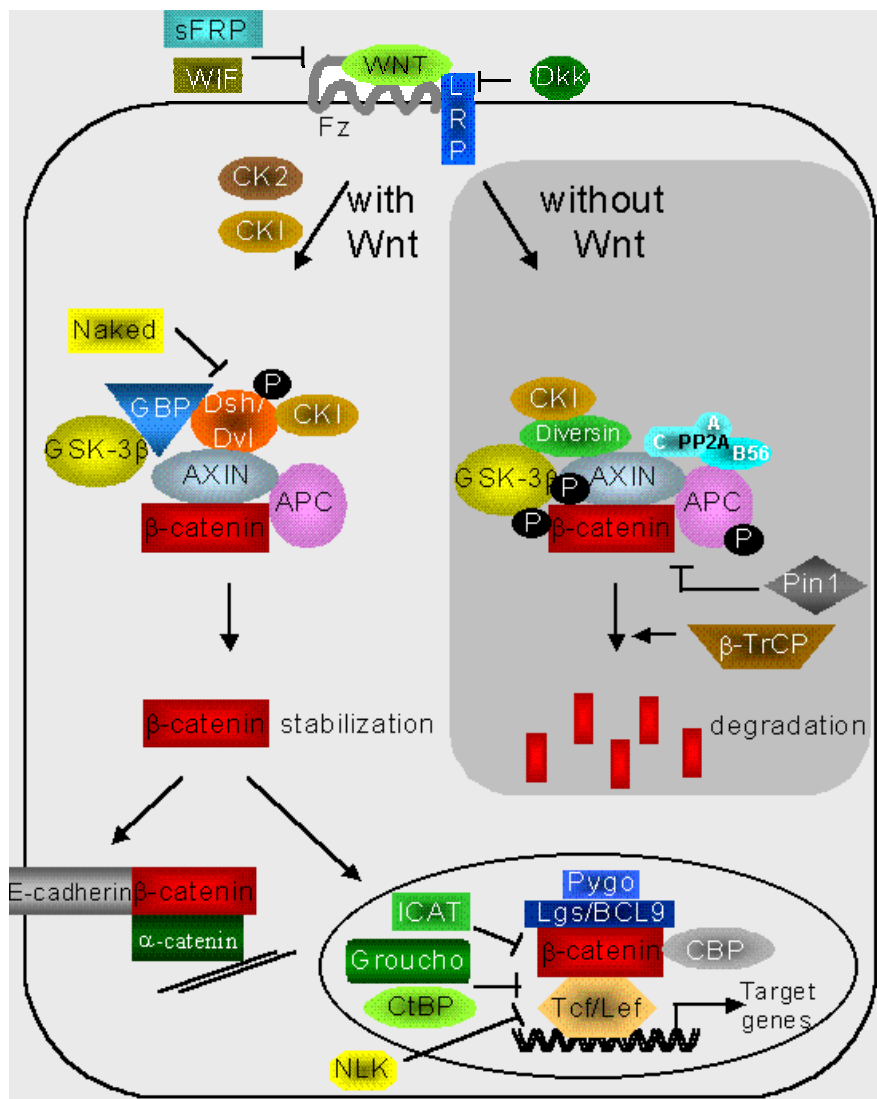


Abb.7: Die Wnt/β-Catenin Signalkaskade. Links: Als Folge der Bindung eines Wnt-Liganden an den Transmembranrezeptor Frizzled im Komplex mit LRP wird im Cytoplasma dishevelled (dsh) aktiviert. Dieses inhibiert die GSK-3β, welche ihrerseits nicht mehr in der Lage ist, β-Catenin zu phosphorylieren. Das unphosphorylierte β-Catenin reichert sich im Cytoplasma an, transloziert in den Zellkern, wo es im Komplex mit Lef/Tcf an die DNA bindet und die Expression von Zielgenen aktiviert. Rechts: Bleibt die Bindung von Wnt-Molekülen an den Rezeptor aus, wird β-Catenin von der GSK-3β phosphoryliert um daraufhin im Proteosom degradiert zu werden. (www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Deep/WNTSignPathID20042.html)

1.3 Die Lef/Tcf-Transkriptionsfaktoren

Im Rahmen von Screens nach T-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren wurden 1991 die beiden Proteine Tcf-1 und Lef-1 entdeckt (Barker et al., 2000). Damit waren die ersten Mitglieder der Lef/Tcf-Familie identifiziert. Im Laufe der Jahre kamen durch Arbeiten an Säugetieren zwei weitere Mitglieder, Tcf-3 und Tcf-4 hinzu (Korinek et al. 1998a). Seit Abschluss des Human-Genome-Projekt gilt es als relativ sicher, dass tatsächlich nur vier Lef/Tcfs existieren. Wie die gesamte Wnt/ β -Catenin Signaltransduktionskaskade sind auch die Lef/Tcf-Transkriptionsfaktoren in der Evolution im Tierreich stark konserviert und werden in Anthozoen, Nematoden, Fliegen, Fischen, Amphibien, und Säugetieren gefunden. In *Drosophila* und *Caenorhabditis elegans* existiert jeweils nur ein Tcf, welches in *Drosophila* dTcf oder pangolin (Brunner et al., 1997) und in *C. elegans* Pop-1 (Lin et al. 1995) genannt wird.

Gemeinsam besitzen die Lef/Tcfs eine 80 Aminosäuren umfassende HMG (high mobility group)-Box. Über dieses Motiv binden sie als nukleäre Transduktoren der Wnt/ β -Catenin Signalkaskade sequenzspezifisch in der kleinen Furche der DNA-Helix (Hurlstone und Clevers, 2002). Die HMG-Box verursacht eine Krümmung der DNA, und koordiniert somit die Bindung anderer Transkriptionsfaktoren (Giese et al. 1992, 1995, Grosschedl et al. 1994). Tcfs scheinen aufgrund dieser Eigenschaften überwiegend architektonische Funktion zu besitzen, da mit Hilfe von Reporterassays keine direkte Transkriptionsaktivierung nachgewiesen werden konnte. Einzig Lef-1, vermag über seine kontext-abhängige-Aktivierungsdomäne (context-dependent-activation domain, CAD), die den anderen Tcfs fehlt, mit dem Kernprotein ALY als Koaktivator Transkription zu aktivieren (Carlsson et al. 1993, Bruhn et al. 1997, van de Wetering et al. 1996).

1.3.1 Lef/Tcf-Bindepartner

Eine hochkonservierte Domäne ist die 55 Aminosäuren lange β -Catenin-Bindestelle im N-terminalen Bereich des Proteins, über die alle Lef/Tcfs an die Armadillo-Motive 3-10 von β -Catenin binden können. Während der β -Catenin/Tcf-Interaktion formen Lys 312 und Lys 435 von β -Catenin spezifische Anker, welche die Verbindung zusätzlich verstärken. Strukturanalysen an der β -Catenin Bindedomäne von XTcf-3

haben gezeigt, dass diese Domäne eine längliche Struktur mit drei Bindemodulen bilden. Die Module verlaufen dabei antiparallel zu β -Catenin entlang der positiv geladenen Rinne, die von den Armadillo-Motiven gebildet wird. Das so komplexierte β -Catenin besitzt im wesentlichen dieselbe Struktur wie im ungebundenen Zustand, es verändert mit der Bindung von Tcf-3 seine Struktur nicht. Die β -Catenin Bindedomäne von XTcf-3 kann grob in drei Bindemodule gegliedert werden. Vom N zum C Terminus existiert ein β -Haarnadel-Modul, eine ausgestreckte Region und eine α -Helix (Abb.8). Alle drei Module treten in direkten Kontakt mit den Armadillo-Motiven von β -Catenin. Die β -Haarnadel passt dabei in die Rinne, die von den Armadillo-Motiven 9 und 10 gebildet wird. Der ausgestreckte Strang liegt senkrecht zu der dritten Helix der Armadillo-Motive 5-8 in der Rinne und die α -Helix bindet in der Rinne an die dritte Helix der Armadillo-Motive 3 und 4. (Graham et al., 2000).

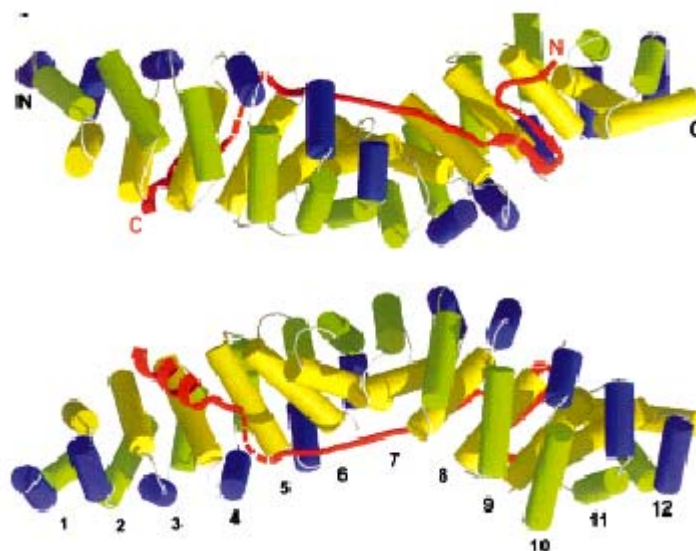


Abb.8: Der XTcf-3- β -Catenin-Bindedomäne (XTcf-3CBD)/ β -Catenin-Komplex aus zwei verschiedenen Perspektiven. Die XTcf-3CBD ist rot eingefärbt. Die β -Haarnadel ist als Pfeil, die gestreckte Region als durchgehende Linie dargestellt. Die α -Helix ist im unteren Bild links zu sehen. Die drei Helices der Armadillo-Motive 1-12 von β -Catenin sind blau, grün und gelb eingefärbt. (Graham et al., 2000).

Als Repressoren fungieren die Mitglieder der Familie der Groucho-Proteine in *Drosophila*, die Mensch-Homologen TLE 1-4 (transducin-like-enhancer of split) und die Maus-Homologen Grg (groucho-related genes)-Proteine, welche mit Ausnahme von Grg-5 mittels Interaktion mit der Histon-Deacetylase-1 (HDAC1) an Sequenzen zwischen der β -Catenin-Bindedomäne und der HMG-Box binden und eine repressive Chromatin-Kondensation auslösen (Chen et al. 1999, Roose et al. 1998). Die Korepressoren der TLE/Groucho-Familie können alle Säuger-Tcfs binden und die

Expression von Lef/Tcf-Zielgenen reprimieren. Diese Repression kann durch Interaktion des TLE/Groucho Proteins sowohl mit dem hypoacetylierten Schwanz von Histon H3 als auch mit der Histon-Deacetylase-1 oder ihrem *Drosophila*-Homolog Rpd3 verstärkt werden. Aufgrund einer Veränderung der Chromatin-Struktur wird eine Aktivierung der β -Catenin/Tcf-Zielgene unterbunden (Chen et al. 1999, Brantjes et al. 2001).

Yamamoto et al. (2003) konnten zeigen, dass die Sumoylierung von Tcf an Lys297 durch die SUMO (small ubiquitin-like modifier) E3-Ligase PIASy (Protein inhibitor of activated STATy) zwar nicht die Affinität zwischen β -Catenin und Tcf-4 beeinflusst, die β -Catenin-abhängige transkriptionelle Aktivität von Tcf-4 jedoch verstärkt. Reprimierend auf die Aktivität wirkt die Anheftung von SUMO mit dem N-Terminus von PIASy dagegen bei Lef-1, indem es nach der Sumoylierung Kernkörperchen zugeleitet und dort zurückgehalten wird (Sachdev et al. 2001, Hurlstone und Clevers. 2002).

Ein weiterer Repressor ist die *Drosophila* Histonacetyltransferase CBP (CREB-binding Protein), indem sie die HMG-Box bindet, in der β -Catenin Bindedomäne das Lysin K25 acetyliert und somit die β -Catenin-Tcf-Interaktion blockiert (Brantjes et al. 2002). Diese Form der Regulation ist vom jeweiligen Lef/Tcf-Protein abhängig, da den β -Catenin-Bindestellen von Tcf-1 , Tcf-3 und POP-1 das Lysin K25 fehlt. Andere Arbeiten zeigten jedoch auch eine aktivierende Wirkung von CBP. In *Xenopus* Embryonen stimulieren β -Catenin und CBP zusammen die Transaktivierung der Zielgene Siamois und Xnr3 (Vleminckx et al. 1999, Hecht et al. 2000, Takemaru und Moon, 2000). Das CBP wird aufgrund der Interaktion mit dem β -Catenin/Tcf-Komplex an die DNA gebunden und kann nun Histone lokal acetylieren, was zu einer Öffnung des Chromatins führt, anderen Transkriptionsfaktoren die Bindung daran erleichtert und der Transkriptions-Maschinerie den Zugang zum Promotor und die Aktivierung der Transkription ermöglicht (Goodman und Smolik, 2000). CBP übernimmt somit überraschenderweise eine doppelte Funktion: Einerseits kann es die Transkription mit der Bindung an β -Catenin aktivieren, andererseits wirkt es reprimierend indem es Tcf acetyliert.

Tcf-Bindeproteine sind auch an anderen Signalwegen beteiligt und fungieren damit als Bindeglied verschiedener Signalwege. Smad-Proteine, als Interaktionspartner von Lef/Tcfs verknüpfen den Wnt-Signalweg mit dem TGF- β -Signalweg, indem sie zusammen mit den Lef/Tcfs auf das gemeinsame Zielgen beider Wege, Xtwin wirken

(Labbe et al. 2000). Ein ähnlicher Mechanismus wurde in humanen Zellen aufgedeckt, wobei in diesem Fall die MAPK-verwandte nemoähnliche Kinase (nemo-like-kinase, NLK) direkt mit Tcf-4 interagiert und es phosphoryliert. Dies verhindert die Bindung des Tcf-4/ β -Catenin-Komplexes an die DNA und damit die Transkription (Ishatini et al. 2003). In *C. elegans* wird die Interaktion eines MAPK-verwandten Signalweges mit dem Wnt-Signalweg beschrieben. Dabei verbinden sich das MAPK-ähnliche Protein Lit1 mit dem *C. elegans*-Homologen zu β -Catenin WRM-1, um im Komplex POP-1 zu phosphorylieren (Rocheleau et al. 1999). So wird in diesem Organismus die Zellpolarität von mindestens zwei Signalwegen über die Regulation von POP-1 kontrolliert.

An eine Sequenz, die nur im C-Terminus von XTcf-3 und einer Spleißform von Tcf-4 vorhanden ist, bindet das als Korepressor wirkende C-terminal bindende Protein (C-terminal binding protein, CtBP), wandelt somit das jeweilige Tcf in einen Repressor um und unterdrückt die Expression von Zielgenen wie beispielsweise des Wnt-Zielgens *Axin2/Conductin* (Valenta et al. 2003).

Allgemein wirken Tcfs bei inaktivem Wnt-Signalweg und somit der Abwesenheit von β -Catenin unter Mithilfe verschiedener Kofaktoren, als Repressoren, nach β -Catenin-Bindung dagegen als Aktivatoren

1.3.2 Isoformen der *Xenopus* Lef/Tcfs

Mit Hilfe von alternativem Spleißen werden aus den vier Vertebraten-Lef/Tcfs eine ganze Reihe unterschiedlicher Isoformen gebildet. Grundsätzlich sind die Lef/Tcfs sowohl im mittleren Bereich zwischen den konservierten β -Catenin-Bindestelle und HMG-Box als auch im C-terminalen Bereich sehr variabel (Gradl et al. 2002). Der überwiegende Teil der auch in ihrer Funktion unterschiedlichen Isoformen entsteht als Folge von Variationen im C-Terminus des Moleküls. Von den 96 theoretisch möglichen Tcf-1-Spleißvarianten sind 5 tatsächlich *in vivo* exprimierte bekannt. Im adulten Gehirn von *Xenopus* existieren vier verschiedene Spleißformen von XTcf-1. Sie sind sehr ähnlich zu den vier Tcf-1 Isoformen des Menschen hTcf-1B, hTcf-1C, hTcf-1D und hTcf-1E (Roel et al. 2003).

Von dem in *Xenopus* exprimierten Tcf-4 existieren drei Isoformen, XTcf-4A, XTcf-4B und XTcf-4C, die sich im Fehlen oder Vorhandensein von zwei reprimierenden

Motiven, LVPQ und SFLSS unterscheiden (Abb.9). XTcf-4A besitzt beide Motive, die ein konserviertes aktivierendes Exon flankieren und dem Protein somit eine reprimierende Wirkung auf den fibronektin-Promotor geben. XTcf-4C besitzt die beiden reprimierenden Elemente nicht, wirkt *in vitro* somit aktivierend. XTcf-4B besitzt nur das SFLSS-Element und liegt auch in seiner Wirkung auf den Fibronektin-Promotor zwischen den beiden anderen Isoformen. Seine Wirkung ist nicht so eindeutig wie die der beiden anderen, scheint aber eher reprimierender Natur zu sein (Pukrop et al. 2001). Die Tcf-4 Isoformen unterscheiden sich nicht nur in Sequenz, sondern auch in der räumlichen und zeitlichen Ausdehnung ihrer Expression während der Embryogenese. XTcf-4C wird ab dem Neurulastadium 16 gebildet, gefolgt von XTcf-4A ab Stadium 18 und XTcf-4B ab dem Embryonalstadium 21 (Gradl et al., 2002).

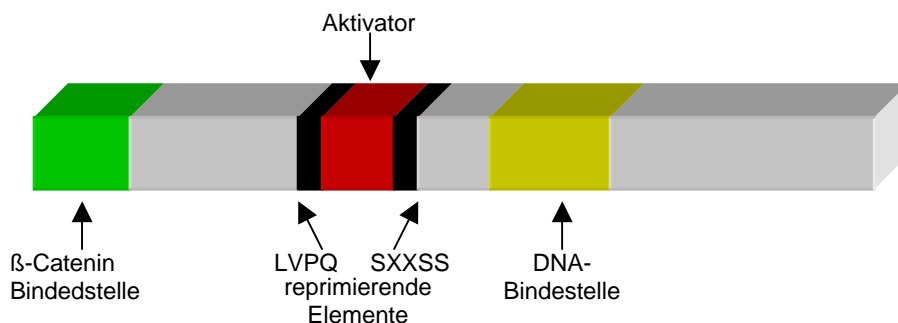


Abb.9: Verschiedene Motive der Lef/Tcfs. Sehr stark konserviert sind die β -Catenin Bindedstelle (grün) und die DNA Bindedstelle (gelb). Das aktivierende Exon (rot) wird von den beiden reprimierenden Elementen (schwarz) flankiert und je nach Gen anders bezeichnet. Im humanen Tcf-1 wird es als Exon IVa, im humanen Lef-1 als Exon VI und im humanen Tcf-4 als Exon VIII bezeichnet (nach Gradl et al. 2002)

Das Fehlen oder Vorhandensein des in Maus und Mensch alternativ gespleißten Exons entscheidet über die Fähigkeit von Lef/Tcfs, sekundäre Achsen induzieren zu können. Der Hauptunterschied zwischen XLef-1 und den anderen Tcfs ist das Fehlen dieses aktivierenden Exons, weshalb XLef-1 auch im Vergleich zu seinem murinen Homolog nur begrenzt zur Achseninduktion befähigt ist. Die Insertion des Exons in XLef-1 erhöht dessen Aktivatorfähigkeiten drastisch. Die zusätzliche Insertion der reprimierenden Motive LVPQ und SLVSS bringen die Fähigkeiten zur Achseninduktion wieder auf Wildtyp-Niveau zurück (Gradl et al. 2002).

Möglicherweise entscheidet die Spleißvariante über die Bindung von Kofaktoren.

1.3.3 Expressionsmuster der Lef/Tcfs und ihre Rolle in der Embryonalentwicklung

Tcf-1 wird bereits maternal exprimiert. In der *Xenopus*-Blastula noch auf die animale Kappe beschränkt, erstreckt sich die Expression im Gastrula-Stadium von der animalen Seite auch über die Marginalzone, ausgenommen Blastoporus und umgebendes Gewebe. Während der Neurulation konzentriert sich die Expression auf die Neuralplatte mit einer scharfen Grenze an ihrem anterioren Ende. In Schwanzknospenstadien werden XTcf-1-Transkripte dann im Gehirn, in den Augen, den Ohrvesikeln, im Pronephros, der Schwanzknospe, den Somiten und später auch in den Kiemenbögen gefunden (Roel et al. 2003).

Dagegen wird das murine Tcf-1 im Neuralplatten- und Präsomitenstadium nahezu im gesamten Embryo und in späteren Stadien stark im Primitivstreifen, in den Gliedmaßenknospen, in der Neuralleiste und im unsegmentierten präsomitischen Mesoderm exprimiert (Oesterwegel et al, 1993, Galceran et al. 1999). Im Vergleich zur Expression im *Xenopus*-Embryo zeigt Tcf-1 in der Maus kein spezifisches Expressionsmuster im sich entwickelnden Gehirn, sondern ist eher auf craniofaciale Strukturen beschränkt. Der Phänotyp der Tcf-1-knock-out-Maus äußert sich in einer Reduktion des Thymus und der 10 bis 100fachen Reduktion der Anzahl an T-Zellen (Verbeek et al. 1995).

Tcf-3 wird in *Xenopus* ebenfalls maternal exprimiert Während der frühen Embryonalentwicklung ist XTcf-3 aufgrund der Vermittlung maternaler Wnt-Signale für die Etablierung der dorsalen Körperachse notwendig (Roel et al., 2002). Während sich die Expression im späten Gastrulastadium auf den anterioren Teil des Embryos beschränkt, ist es im Laufe der Neurulation im Mesoderm und im Neuroektoderm nachweisbar. Im Schwanzknospenstadium erfolgt eine Expression in den Augen, im zentralen Nervensystem, in den Ohrvesikeln, im Kopfmesenchym, in den Neuralleistenzellen, in den Kiemenbögen, im Herzen, in den Gliedmaßen- und der Schwanzknospe (Molenaar et al, 1998). Im Zebrafisch konnten mittlerweile zwei Tcf-3 Homologe, Hdl (headless) und Tcf-3b nachgewiesen werden (Dorsky et al. 2003). Beide Gene sind im sogenannten Knospen-Stadium im zukünftigen Vorderhirn, im Mittelhirn, an der ventralen Mittellinie und in der Chorda exprimiert. Unterschiede zeigen sich jedoch im 6-Somiten-Stadium, da Hdl in der Schwanzknospe und im präsomitischen Mesoderm sehr stark, und Tcf3b in diesem Stadium nicht oder nur

sehr schwach exprimiert ist. Hdl erhielt seinen Namen aufgrund des Mutanten-Phänotypes, der mit dem Verlust der Augen, des Vorderhirns und Teilen des Mittelhirns beschrieben wird (Kim et al. 2000). Des weiteren zeigen Hdl-Morpholino knock-down Embryonen einen kaudalisierten Phänotyp, welcher von Tcf-3b aufgehoben werden kann. Tcf-3b spielt im Zebrafisch außerdem eine Rolle bei der Morphogenese der Rhombomergrenzen im Hinterhirn (Dorsky et al. 2003). Tcf-3 knock-out Mäuse zeigen nach erfolgreich durchlaufener Gastrulation vergrößerte und oft auch verdoppelte Achsenmesoderm-Strukturen einschließlich Chorda dorsalis und Knoten. Das anteriore Neuroektoderm ist bei diesen Tieren stark verkürzt was im Fehlen von Vorderhirnstrukturen resultiert (Merrill et al., 2004). Zusammengenommen scheint Tcf-3 in Vertebraten die Funktion eines Repressors von frühen, während der Formation von anterioren Strukturen wichtigen Wnt-Signalen zu haben und somit auch reprimierend auf die Achsenbildung zu wirken. Des weiteren spielt es bei der Entwicklung von Kopfstrukturen eine entscheidende Rolle, da die Tcf-3-vermittelte Repression von posteriorisierenden Wnt-Signalen die Ausbildung anteriorer Strukturen sicherstellt.

Tcf-4 ist in *Xenopus* ab dem späten Neurulastadium 16 (Nieuwkoop und Faber, 1967) sehr begrenzt im anterioren Teil des Mittelhirnes, an der Grenze zum Vorderhirn exprimiert. Die Expression verteilt sich auf zwei punktförmige Bereiche, in beiden Gehirnhälften, getrennt durch die expressionsfreie Deckplatte. Damit ist XTcf-4 nahezu identisch koexprimiert mit Xwnt-2b. Mit Xwnt-1 und Xwnt-3a überlappt die Expression dagegen nur teilweise (König et al. 2000).

Das murine Tcf-4 wird im Neuralplatten/Präsomitenstadium noch vor der Bildung der Kopffalte im anterioren Entoderm exprimiert (Galceran et al. 1999). In späteren Stadien markiert es sowohl das Diencephalon als auch die Grenze zwischen Diencephalon und Mesencephalon (Cho und Dressler, 1998). Mit weiter fortschreitender Entwicklung wandert das Expressionsmuster zum Mesencephalondach (Tectum) und zum dorsalen Thalamus (Korinek et al. 1998). mTcf-4 wird zusätzlich zu der Expression im zentralen Nervensystem, ab dem 13-20. Somitenstadium auch im sich entwickelnden Dickdarm (Galceran et al. 1999) und später dann im Darmepithel exprimiert (Korinek et al. 1998b). Tcf-4-knock-out-Mäusen fehlen epitheliale Stammzellen im Dünndarm, weswegen die Tiere kurz nach der Geburt sterben. Die Entwicklung des zentralen Nervensystems scheint zu diesen Stadien normal (Korinek et al. 1998b).

Die Expression von *Xenopus* **Lef-1** beginnt zum Zeitpunkt des Mittblastula-Übergangs mit der zygotischen Expression. In den Stadien der späten Gastrulation findet man die Transkripte in anterioren und dorsalen Regionen des Embryos, während sich die Expression im Laufe der Neurulation sowohl im zukünftigen Mesencephalon als auch im anterioren und posterior-intermediären Mesoderm verstärkt. Im frühen Schwanzknospenstadium wird XLef-1 in der Neuralleiste und im paraxialen Mesoderm exprimiert, während es im späten Schwanzknospenstadium im zentralen Nervensystem, in den Augen, in den Ohrvesikeln, im Kopfmesenenchym und in den Schwanz- und Gliedmaßenknospen exprimiert wird (Molenaar et al. 1998). XLef-1 ist wohl für die Vermittlung von Xwnt-8 Signalen während der mesodermalen Musterung notwendig (Roel et al., 2002).

Im Gegensatz zum Frosch wird Lef-1 in der Maus während des Neuralplatten-/Präsomitenstadiums überwiegend posterior (Korinek et al. 1998a) und danach im Primitivstreifen (Galceran et al. 1999) exprimiert. In späteren Entwicklungsstadien erfolgt die Expression in den Gliedmaßenknospen, in der Neuralleiste (Oosterwegel et al. 1994), im zukünftigen Mesenchym der Schnauze, in den Follikeln der Schnurrhaare (van Genderen et al. 1994), im sich entwickelnden Ohr, in den Zahnanlagen sowie im Thymus (Oosterwegel et al. 1993). Weitere Expressionsfelder liegen im präsomitischen Mesoderm (Galceran et al. 1999) und im zentralen Nervensystem. Hier ist das Expressionsmuster dynamisch. Zuerst erfolgt die Expression im dorsomedialen Telencephalon (Galceran et al. 2000), danach im Mesencephalon (van Genderen et al. 1994) und in der weiteren Entwicklung im Tectum, im Epithalamus und im Hypothalamus (Oosterwegel et al. 1993, van Genderen et al. 1994). Im Gegensatz zu den anderen Lef/Tcfs induziert mLef-1 bei ventraler Überexpression eine sekundäre Achse über die Aktivierung des Wnt-Zielgens *siamois* (Molenaar et al. 1996).

Lef-1-defiziente Mäuse sterben direkt nach der Geburt. Sie besitzen weder Zähne, noch Haare, noch Brustdrüsen. Außerdem fehlt ihnen der mesencephale Kern des Trigemini-Nerves im Gehirn (van Genderen et al. 1994). In einem bestimmten Bereich des Hippokampus fehlen ihnen außerdem die Granuloneuronen (Galceran et al. 2000).

Die Ausfallmutationen in Maus und anderen Organismen zeigten überzeugend, dass jedes einzelne Lef/Tcf offensichtlich verschiedene Aufgaben in der Embryonalentwicklung besitzt. Allerdings fehlen Phänotypen, die dem

Expressionsmuster nach zu erwarten wären. Um eventuell existierende Redundanzen zwischen den verschiedenen Lef/Tefs aufzudecken, wurden neben den Mäusen mit Einzelausfallmutationen auch solche mit Doppelausfallmutationen erzeugt.

Der Phänotyp der Nullmutation für Tcf-1 und Lef-1, welche im frühen Mausembryo überlappende Expressionsmuster zeigen, ist ähnlich dem von Wnt-3a-defizienten Mäusen und stellt sich folgendermaßen dar: die auffälligste Veränderung dieser Tiere ist ein Verlust von Somiten, was zu einer verkürzten anterior-posterioren Achse führt, sowie Defekte in der Entwicklung der Gliedmaßen und der Plazenta. Außerdem werden zusätzliche Neuralrohre, bei gleichzeitiger Reduktion des paraxialen Mesoderms ausgebildet. Das Fehlen der Wnt-3a Expression in den Gliedmaßenknospen könnte einerseits auf die Existenz einer autoregulatorischen Schleife hindeuten, andererseits kann es vom Fehlen spezifischer Zellen verursacht werden (Galceran et al. 1999).

Eine weitere Doppelmutante, die Tcf-1/Tcf-4-knock-out-Maus zeigt neben einem zusätzlichen Neuralrohr sehr starke Defekte im posterioren Bereich. Den Tieren fehlt der komplette Hinterleib, einschließlich Hinterextremitäten und Schwanz. Eine mögliche Ursache für diesen Phänotyp ist eine unzureichende Darmentwicklung und damit fehlende endotheliale Signale, worauf auch Dickdarmdefekte hindeuten, die in diesen Mäusen beobachtet werden (Gregorieff et al. 2004).

Beide Doppelausfallmutanten zeigen mehr Defekte als die Addition der jeweiligen Einzelausfallmutanten. Somit ist klar, dass die einzelnen Mitglieder der Lef/Tcf-Familie neben für jedes Familienmitglied spezifische Aufgaben auch redundante Funktionen in der Embryonalentwicklung besitzen.

2. Zielsetzung der Arbeit

Die nahezu identische Expression des Signalmoleküls Xwnt-2b und des Transkriptionsfaktors XTcf-4 im sich entwickelnden anterioren Mittelhirn von *Xenopus laevis* wirft die Frage nach der Funktion dieser Gene in der Gehirnentwicklung auf.

Diese Co-Expression von Xwnt-2b als Aktivator des Wnt/ β -Catenin-Signalweges und XTcf-4 als nukleärer Mediator der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade deutet darauf hin, dass XTcf-4 durch eine autoregulatorische Schleife reguliert wird. Mit Hilfe eines Xwnt-2b-Morpholino knock-down-Ansatzes soll die Richtigkeit dieser These geklärt werden.

Da an der Vorderhirn/Mittelhirn-Grenze neben XTcf-4 zahlreiche Wnt-Signalmoleküle exprimiert sind, soll der Frage nachgegangen werden, ob diese Region als Organisationszentrum in der antero-posterioren Musterung des zentralen Nervensystems agiert. Dies soll mit der Analyse der endogenen XTcf-4-Funktion und dem Einfluss von XTcf-4 auf die antero-posteriore Musterung des Gehirnes überprüft werden.

Die differentielle Expression der XTcf-4-Isoformen, sowie ihre Unterschiede in der Aktivierung von Zielpromotoren impliziert, dass diese Isoformen auch unterschiedliche Funktionen in der Embryonalentwicklung wahrnehmen. Diese möglichen Funktionen sollen im Rahmen dieser Arbeit identifiziert werden.

Die spezifische Expression von XTcf-4 im Mittelhirn, die es von allen anderen Lef/Tcfs abhebt, lässt vermuten, dass spezifische Zielgene für XTcf-4 existieren. Mit Hilfe eines substraktiven Screens sollen diese identifiziert werden.

3. Materialien

Antikörper

- Anti-NCAM (Z191) (Henke, Fadle; MPI Tübingen)
- Anti-Tcf3/4 (BIOMOL GmbH, Hamburg)
- Anti-myc (9E10) (Zellkulturüberstand)
- Anti-EGFP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Anti-Gemin (U. Fischer, Würzburg)
- Anti-PH3
- Anti-Aktin (Alexa Fluor 568 phalloidin (Molecular Probes, Eugene, USA)

Bakterien

- *E.coli* Stamm JM109 (Promega, Mannheim)
Genotyp: *endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17 (r_k-m_k+)* *relA1 supE44 Δ(lac-proAB)*
[F' *traD36 proAB lacI^qΔM15*]

Enzyme

- Alkalische Phosphatase (CIAP) (Promega, Mannheim)
- Dnase I, Rnase frei (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- M-MLV Reverse Transkriptase (Promega, Mannheim)
- Proteinase K (Merck, Darmstadt)
- Rnase Inhibitor (Promega, Mannheim)
- Restriktionsendonukleasen (Promega, Mannheim)
- Sp6, T7, T3 RNA-Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim)
- T4 DNA-Ligase (Promega, Mannheim)
- Taq DNA-Polymerase (Promega, Mannheim)

Chemikalien

Nicht aufgeführte Reagenzien wurden über folgende Firmen bezogen: AppliChem GmbH (Darmstadt), Fluka Chemie GmbH (Taufkirchen), Merck KgaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe) oder Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen).

Materialien und Methoden

- Agarose (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Select Agar (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Ammoniumpersulfat (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Anti-Digoxygenin-AP Fab fragments (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Bactotrypton (Invitrogen, Karlsruhe)
- Blockierungsreagenz (Roche Diagnostics, Mannheim)
- BM Purple AP Substrat (Roche Diagnostics, Mannheim)
- BSA (Bovine Serum Albumin) (PAA Laboratories GmbH, Cölbe)
- Complete, Mini, EDTA-frei Protease Inhibitor Cocktail Tabletten (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Desoxyribonucleotide (Promega GmbH, Mannheim)
- [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP (Amersham GmbH, Freiburg)
- DIG RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics, Mannheim)
- 2-log DNA Marker (New England Biolabs, Frankfurt a.M.)
- 100 bp DNA Marker (New England Biolabs, Frankfurt a.M.)
- DTT (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- FCS (Fetal Calf Serum) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Freon
- Hefeextrakt (USB, Cleveland, USA)
- Magermilchpulver (Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell)
- Microspin G50-Säulen (Amersham GmbH, Freiburg)
- Natriumdodecylsulfat (SDS) (Serva)
- NBT/BCIP Stock Solution (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Pferdeserum (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Phenol/Chloroform-Lösung (Tris-gesättigt, pH 8.2) (Promega GmbH, Mannheim)
- Random Primer (Promega GmbH, Mannheim)
- Trizol (Life Technologies, Schottland)
- Tween 20 (Serva, Heidelberg)

Kits

- Advantage cDNA PCR Kit (BD Biosciences, Heidelberg)
- CLONTECH PCR-Select™ cDNA Substraction Kit (BD Biosciences, Heidelberg)
- DIG RNA labeling Kit (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Dynabeads mRNA Purifikation Kit (Dynal Biotech ASA, Oslo, Norwegen)
- ECL+plus Western Blotting Detection System (Amersham GmbH, Freiburg)
- mMESSAGE mMACHINE™ (Ambion Ltd, Huntington, GB)
- pGEM®-T Easy Vector System (Promega GmbH, Mannheim)
- QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
- QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
- QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
- QIAGEN® Plasmid Midi Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
- RNeasy® Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden)

Primer zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente

Alle Primer wurden über folgende Firmen bezogen: MWG Biotech AG (Ebersberg), Invitrogen GmbH (Karlsruhe), BD Biosciences (Heidelberg) oder biomers.net GmbH (Ulm)

Ncam forw.	5' CAC AGT TCC ACC AAA TGC 3'
Ncam back	5' GGA ATC AAG CGG TAC AGA 3'
H4fwd	5' CGG GAT AAC ATT CAG GGT ATC ACT 3'
H4rev	5' ATC CAT GGC GGT AAC TGT CTT CTT 3'
Xanf-2-F	5' ACT GAC CTA CAA GAG AGA A 3'
Xanf-2-R	5' AGT GCA TCA TTG TTC CAC AG 3'
Xanf-1F	5' TCG CTT GTG ATC TCC CCA TAC 3'
Xanf-1R	5' AGA GGT CCA AGG CTC TAT CAG G 3'
XTCF-4-582forw	5' CTC ACG CCG CTC ATT ACC TAC AGC AAC 3'
XTCF-4-1084back	5' CAT GTA CAG CAT GAA CGC GTT TAG GGG 3'
Xwnt2b2fwd	5' CAG CTC GAG ATG CAC TTA GCA TAC ATT TTT ATA CTG C 3'

Xwnt2b2rev	5' GTC GAG CTC AGT ACA AAC CAG ATC GGT AAG GCG AGA G 3'
SP6	5' CAA GCT TGA TTT AGG TGA C 3'
T7	5' TAC GTA ATA CGA CTC ACT ATA G 3'
Tcf-3 Cla forw.	5' TTA TCG ATC TCA TCA TGC CTC AGC TCA ACA GCG 3'
Tcf-3 Cla back	5' AAA TCG ATG ACT AGG TCT GGT CAC TAG AG 3'
Tcf-3 PLITY	5' ACT CCT CTC ATC ACC TAC AGC 3'
PCR-Primer 1	5' CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C 3'
Nested-PCR-Primer 1	5' TCG AGC GGC CGC CCG GGC AGG T 3'
Nested-PCR-Primer 2	5' AGC GTG GTC GCG GCC GAG GT 3'

Morpholinos

(Gene Tools, LLC, Philomath, USA)

- Xwnt2b-Morpholino: 5' ATC ATT GCA GCC ACC TCT AGG ATG C 3'
- XTcf-4-Morpholino 5' CGC CAT TCA ACT GCG GCA TCT CTG C 3'
- XTcf-3-Morpholino 5' CGC TGT TGA GCT GAG GCA TGA TGA G 3'
- Kontroll-Morpholino 5' CCT CCT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A 3'

Konstrukte zur RNA-Injektion

- tBR in pSP64 T3 (W. Knöchel, Ulm)
- PCS2+myc-GFP (R. David, Ulm)

Konstrukte zur DNA-Injektion

- XTcf-4 A, C in pCS2myc (Pukrop et al.; 2001)
- XTcf-4 B in pCS2 (Pukrop et al.; 2001)
- Xwnt-2b (S. Sokol, Boston, USA)
- Xwnt-8 in pRc/CMV (D. Gradl, Doktorarbeit)
- Xwnt-5A in pRc/CMV (D. Gradl, Doktorarbeit)
- Xwnt-11 in pCMV-2 (A. Glinka, Heidelberg)

Konstrukte zur Herstellung von digoxigenierter antisense-RNA als *in situ*-Sonde

- | | linearisiert | transkribiert | |
|--------|--------------|---------------|----------------------------|
| • En-2 | Not I | T3 | (von A. Hemmati-Brivanlou, |

			Berkeley, USA)
• Xfgf-8	Xho I	T7	(von C. Niehrs, Heidelberg)
• Krox-20	Eco RI	T7	(von D. Wilkinson, London, Großbritannien)
• Xlim-1	Xho I	T7	(von M. Taira, Tokyo, Japan)
• Xotx-2	Eco RI	T3	(von K. Cho, Irvine, USA)
• Xpax-6	Not I	T7	(von T. Hollemann, Göttingen)
• XTcf-4	Sac I	T7	(von A. König, Ulm)
• Xwnt-1	Hind III	Sp6	(von R. Moon, Seattle, USA)
• Xwnt-2b	Hind III	T3	(von S. Sokol, Boston, USA)
• Xnrp-1	Not I	T3	(Richter et al., 1988)

Lösungen

Alle Lösungen werden entweder autoklaviert oder aus sterilen Stammlösungen und Aqua bidest bzw. DEPC-H₂O angesetzt. Bei der Verwendung nicht autoklavierbarer Chemikalien wie z.B. Methanol, Glucose, Triton-X-100 oder Tween 20 können die Lösungen – wenn nötig- durch Sterilfiltration (Ø 0.2 µm) entkeimt werden.

- Ampicillin-Stammlösung (1000x)
100 mg Ampicillin pro ml Aqua bidest, bei –20⁰C lagern.
- Antikörperlösung (für Anti-Digoxigenin Antikörper)
0.05% (v/v) Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragmente in Blockierungspuffer.
- Alkalische Phosphatasepuffer für NBT/BCIP (AP Puffer)
0.1mM Tris-HCl pH 9.5, 0.05 mM MgCl₂, 0.1 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20, DEPC-H₂O.
- APBS
2.7 mM KCl, 0.15 mM KH₂PO₄, 103 mM NaCl, 0.7 mM Na₂PO₄, pH7.5
- APBS-T
APBS, 0.1% (v/v) Tween 20
- APBS-T-NaCl
APBS, 0.1% (v/v) Tween 20, 0.3 M NaCl
- APBS-B
APBS, 1% (w/v) BSA
- APBS-F

APBS, 20% (v/v) FCS

- Arbeitslösung für Methylenblau/Fuchsin-Färbung
12 ml Methylenblaulösung, 12 ml Basic Fuchsin-Lösung, 21 ml Stock-Puffer, 15 ml Ethanol
- Basic Fuchsin-Lösung
0.5 g basic fuchsin, 400 ml Aqua bidest.
- Blockierungspuffer
1x BMB, 10% (v/v) Pferdeserum, 0.05% (v/v) Tween 20, DEPC-H₂O.
- 5x BMB
10% (w/v) Blockierungsreagenz in 5x MAB
- Cysteinlösung
2% (w/v) Cystein in Aqua bidest., mit 10 M NaOH pH 8.2.
- Denaturierungslösung
0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl
- 50x Denhardt's
15 (w/v) BSA, 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidon (PVP), 1% (w/v) Ficoll 400, DEPC-H₂O
- DEPC-H₂O
1 ml Diethylpyrocarbonat über Nacht in einem Liter Aqua bidest. rühren und anschließend durch Autoklavieren inaktivieren.
- Dynabeads-Bindepuffer
20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 M LiCl, 2 mM EDTA
- Dynabeads-Waschpuffer
10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA
- Dynabeads-Elutionspuffer
10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
- Einbettlösung für Technoviteinbettung
10 ml Infiltrationslösung, 0.5 ml Härter II
- Elektrophorese-Laufpuffer
25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1% (w/v) SDS.
- Elvanolgebrauchslösung
5 g Polyvinylalkohol über Nacht bei Raumtemperatur in 60 ml PBS rühren. Anschließend 15 Minuten bei 1.000 g zentrifugieren, Überstand abnehmen und darin 1 mg/ml Phenylendiamin über Nacht lösen. Den pH-Wert auf 8.0

einstellen und durch Zugabe von bis zu 200 μ l 2-Mercaptoethanol die Lösung klar werden lassen. Die Elvanolgebrauchslösung ist bei -20°C über 10 Monate lagerfähig.

- Glycerinlösung
10% (v/v) Glycerin in Aqua bidest.
- Heparinlösung
100 mg/ml in DEPC- H_2O , bei -20°C lagern.
- Hybridisierungslösung (Southern Blot)
6x SSC, 5x Denhardts, 1% SDS, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Heringsperma
- Hybridisierungspuffer (ISH)
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.
- Infiltrationslösung für Technoviteinbettung
100 ml Basisflüssigkeit, 1 Beutel Härter I
- 6x Ladepuffer für DNA-Auftrennung
0.25% (w/v) Orange G, 40% (w/v) Saccharose in Aqua bidest, bei 4°C lagern.
- LB_{AMP} -Agar-Platten
1.5% (w/v) Select Agar in LB-Medium lösen und autoklavieren. Nach Abkühlen auf 55°C , 1 ml Ampicillin-Stammlösung pro Liter zugeben und in Petrischalen (\varnothing 9.4 cm) gießen; Die erkalteten Platten werden mit dem Deckel nach unten bei 4°C gelagert.
- LB_{AMP} -Medium
1 ml Ampicillinlösung pro Liter LB-Medium.
- LB-Medium
10 g Baktotrypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 l Wasser, pH 7.5.
- 5x MAB
0.5 M Maleinsäure, 0.75 M NaCl, pH 7.5.
- 10% (w/v) Magermilchpulver in PBS.
- MBSH
880 mM NaCl, 24 mM NaHCO_3 , 100 mM KCl, 4mM CaCl_2 , 3.3 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 100 mM HEPES, 8 mM MgSO_4 , pH 7.4.
- MBSH/Pen-Strep
MBSH, 1% (v/v) Penecillin/Streptomycin.

- 1x MEM
100 mM MOPS pH 7.4, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, DEPC-H₂O.
- MEMFA
1x MEM, 0.1% (v/v) Tween 20, 3.7% (v/v) Formaldehyd, DEPC-H₂O.
- Methylenblaulösung
0.5 g Methylenblau, 400 ml Aqua bidest.
- NBT/BCIP-Färbelösung
1% (v/v) NBT/BCIP Stammlösung (Roche) in AP-Puffer.
- Neutralisierungslösung
0.5 M Tris/HCl pH 7.0, 1.5 M NaCl
- 1x PBS
137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 6.5 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.5.
- PBST
1x PBS, 0.1% (v/v) Tween 20.
- Penicillin/Streptomycin Lösung
- Ponceau-Färbelösung
1% (v/v) Essigsäure, 0.5% (v/v) Ponceau S.
- Proteinase K-Lösung
1% (w/v) Proteinkinase K in TBST.
- RIPA-Puffer
50 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2mM CaCl₂•H₂O, 1% (v/v) Triton-X, 1% (w/v) Natriumdesoxycholate, 0.1% (w/v) SDS, 1/2 Tablette Complete Protease Inhibitor auf 25 ml RIPA-Puffer, bei -20⁰C zwei Monate lagerfähig.
- 5x SDS-Ladepuffer
0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 10% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerin, 5% (v/v) β-Mercaptopropandiol, 0.1% (w/v) Bromphenolblau.
- SOB-Medium
20 g Baktotrypton, 5 g Hefeextrakt, 0.5 g NaCl, 2.5 g MgCl₂•6H₂O, ad 1 l Aqua bidest, pH 7.0.
- SOC-Medium
SOB, 20 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄, 20 mM Glucose.
- 20x SSC
3 M NaCl, 300 mM Na-Citrat pH 7.0.
- 0.2x SSC-T

- 0.2x SSC, 0.05% (v/v) Tween 20.
- 2x SSC-T
2x SSC, 0.05% (v/v) Tween 20.
- Stock-Puffer für Methylenblau/Fuchsin-Färbung
3X PBS, pH 6.8-7.2
- TAE-Puffer
40 mM Tris/Acetat pH 8.3, 1 mM EDTA.
- TBS
25 mM Tris-HCl pH 7.4, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂.
- TBST
TBS, 0.1% (v/v) Tween 20.
- TELT-Puffer
50 mM Tris pH 7.5, 62.5 mM EDTA, 2.5 M LiCl, 0.4% (v/v) Triton X-100
- Transferpuffer (Western Blot)
25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10% (v/v) Methanol.
- Torula RNA-Lösung
50 mg/ml in DEPC-Wasser bei 80⁰C lösen und bei -20⁰C lagern.
- Triethanolamin-Lösung
0.1 M Triethanolamin pH 7.4, DEPC-H₂O.

Geräte

- Brutschrank, APT LineSerieBD/ED/FD (Binder, Tuttlingen)
- Elektroporator, Micropulser (Bio-Rad, München)
- Flachbettelektrophoresekammern (Amersham, Freiburg)
- Fluoreszenzbinokular
 - MZFLIII (Leica Mikrosysteme, Bensheim)
 - Digitalkamera Retiga Color 12 bit (QImaging, Burnaby, Kanada)
 - Elektrische Vorschaltquelle für Quecksilber-Kurzbogenlampe (Leistungselektronik Jena, Jena)
 - Kaltlichtquelle KL 1500 LDD (Schott Glas, Wiesbaden)
 - Software, Openlab 3.1.2 (Openlab, Heidelberg)
- Fluoreszenzmikroskop
 - DMIRE2 und CTR MIC (Leica Mikrosysteme, Bensheim)

- Digitalkamera C4742-95-12 ERG (Hamamatsu, Herrsching)
 - Software, Openlab 3.1.2 (Openlab, Heidelberg)
- Gastromaster (Xenotek Engineering)
- Handmonitor LB 122 (Berthold-Technologies)
- Geldokumentationsanlagen
 - Diana II (Raytest, Straubenhardt)
 - Gel Max (Intas, Göttingen)
- Hybridisierungs Inkubator 7601 (GFL, Burgwedel)
- Kühlbrutschrank BK-600 (Kendro, Langenselbold)
- Micropipettenzieher Model P-97 (Sautter Instruments, Novato, USA)
- Magnetrührer IKAMAG RCTbasic (IKA, Staufen)
- Mikroinjektionsanlage (H. Saur Laborbedarf, Reutlingen)
 - Kaltlichtquelle, Fiber Optic Light Source EK-1 (Euromex)
 - Membranpumpe MZ2 (Vacuubrand)
 - Pneumatische Picopumpe PV-820
 - Stereomikroskop MIC 1630 ZS (Euromex)
- PAGE-Apparatur, Mini Protean II™, Blotapparatur, Mini Trans Blot (Bio-Rad, München)
- PCR Cycler, Personal Cycler und UNO II (Biometra, Göttingen)
- PCR/UV Work station, Cleanspot (Coy, Michigan, USA)
- pH-Meter pH 521 (WTW, Weilheim)
- Phosphoimager BAS 1500 (Fuji, Japan)
- Photometer, Bio-Photometer (Eppendorf, Hamburg)
- Schüttelinkubator, Orbital Shaker (Thermo Forma, Marietta, USA)
- Sicherheitswerkbank Microflow ABS (Nunc, Wiesbaden)
- Vibratom, VT 1000S (Leica Mikrosysteme, Bensheim)
- Waagen (Sartorius)
- Zentrifugen
 - Biofuge fresco (Kendro, Langenselbold)
 - Multifuge® 3 S-R (Kendro, Langenselbold)

4. Methoden

4.1 Entwicklungsbiologische und Immunologische Methoden

4.1.1 Haltung von *Xenopus laevis*

Im Zoologischen Institut II werden jeweils zehn adulte *Xenopus laevis*, nach Geschlechtern getrennt, in 100 Liter fassenden Aquarien bei einer Wassertemperatur von 18-20°C gehalten. Die Beleuchtungsdauer beträgt 12 Stunden. Gefüttert werden die Tiere mit Fertigfutter in Form von Pellets und einmal die Woche mit klein geschnittenem Rinderherz. Das Wasser wird über einen Bakterienfilter gereinigt, und zusätzlich mit UV-Licht entkeimt.

Um Hautreizungen und Infektionen möglichst gering zu halten, werden die Weibchen nach ihrer Eiablage über Nacht in einem Salzwasserbad aus 30 g Meersalz in zehn Liter Wasser gehalten, bevor sie am nächsten Tag zurück in die Anlage gesetzt werden.

4.1.2 Eiablage

Um eine Eireifung bei *Xenopus laevis* zu erreichen, wird einem adulten Weibchen 14 bis 18 Stunden vor der erwünschten Eiablage 600 u humanes Choriongonadotropin (HCG) subcutan in den dorsalen Lymphsack injiziert. Für eine Ablage nach 20-22 Stunden injiziert man zunächst 50 u, 6-8 Stunden vor der gewünschten Ablage werden nochmals 600 u gegeben. Die Frösche werden über Nacht bei 18°C gehalten.

Zur Eiablage werden die Weibchen vorsichtig am Rücken massiert. Die aus der Kloake austretenden Eier werden in einer Petrischale aufgefangen. Dabei kann nur ein gesundes Gelege mit reifen Eiern und normaler Gallerthülle für die weiteren Versuche verwendet werden.

4.1.3 Testisextraktion

Ein Männchen wird zur Betäubung für ca. 30 Minuten in eine 0.05% (v/v) Amino-Benzolsäure-Ethylestermethansulfonatlösung gelegt, bevor es mit einem raschen Schnitt durch die Wirbelsäule im Nacken getötet wird. Die Bauchdecke wird geöffnet und die Hoden aus dem dorsalen Fettgewebe herausgetrennt. In 1x MBSH können sie bei 4°C 4-5 Tage gelagert werden.

4.1.4 *In vitro* Fertilisation

Um eine gleichmäßige, synchrone Entwicklung von vielen Embryonen zu ermöglichen, werden die Eier *in vitro* befruchtet. Dazu wird ein Drittel des Hodens in 1 ml 1x MBSH mazeriert. 100 µl dieser Suspension werden mit 900 µl sterilem Aqua bidest verdünnt und über dem frischen Laich verteilt.

Als Folge der Befruchtung tritt Flüssigkeit zwischen Eizelle und Eihülle. Die Eizelle wird in der Eihülle frei drehbar und richtet sich so aus, dass sich der schwerere dotterhaltige vegetalen Pol nach unten dreht und die animale, dunkle Seite nach oben zeigt. Dadurch lassen sich befruchtete von unbefruchteten Eizellen relativ einfach unterscheiden.

4.1.5 Entfernen der Gallerthülle

Um die Eier einzeln verwenden zu können, müssen sie von ihrer Gallerthülle befreit werden. Dies geschieht ca. eine Stunde nach Befruchtung, noch vor der ersten Zellteilung, indem man die Embryonen für 3 bis 4 Minuten in 2 % Cysteinchlorid pH 8.2 schwenkt. Nach dieser Behandlung werden die Eier sorgfältig vom Cysteinchlorid befreit, wozu man sie mehrmals mit 0.1 x MBSH spült.

4.1.6 Mikroinjektion

Zur Injektion benutzt man eine mechanisch ausgezogene Glaskapillare, durch die mittels N₂-Gasdruck eine definierte Menge an DNA-, *in vitro* transkribierter mRNA- oder Morpholinlösung appliziert wird. Je nach Fragestellung werden dabei Menge und Ort der Injektion variiert.

Für die Betrachtung von Morpholino knock-out Phänotypen wird im Zwei-Zell-Stadium injiziert, bei der Untersuchung von spezifischen Phänotypen wird im Vier-Zell-Stadium dorsal oder ventral injiziert. Während im Zwei-Zell-Stadium noch keine Unterscheidung von dorsal und ventral möglich ist, erscheinen im Vier-Zell-Stadium die dorsalen Blastomere klein und dunkel, während die ventralen Blastomere größer und heller sind. Das Injektionsvolumen kann je nach Eichung der Injektionsnadel zwischen 4 und 16 nl variieren.

4.1.7 Embryonenpflege

Die weitere Entwicklungsgeschwindigkeit kann mittels gezielter Temperaturwahl beeinflusst werden. Dabei müssen jedoch abgestorbene Embryonen mehrmals täglich entfernt und das Kulturmedium täglich erneuert werden. In manchen Fällen ist es auch erforderlich, die Vitellinmembran mechanisch mit Hilfe zweier Pinzetten zu entfernen. Die Einteilung der Stadien erfolgt nach Nieuwkoop und Faber (1967).

Haben die Embryonen das für den jeweiligen Versuch gewünschte Stadium erreicht, werden sie zur späteren Verwendung für eine *in situ* Hybridisierung oder einer Immunfärbung in MEMFA fixiert oder zur späteren RNA- oder Proteinextraktion mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80°C gelagert.

4.1.8 Präparation ektodermaler Explantate (animale Kappen)

Ektodermale Explantate werden ab Stadium neun aus Embryonen explantiert. Dazu muss zunächst die Vitellinmembran mit Hilfe zweier spitzer Pinzetten abgezogen werden. Anschließend wird über ein Fußpedal die Platindrahtschlinge des Gastromasters durch eine Spannung erhitzt und mit ihr ein quadratisches Stück aus

dem Blastocoeldach des Embryos ausgeschnitten. Solche ektodermalen Explantate werden in Antibiotika-haltigem 1x MBSH kultiviert, bis Kontroll-Embryonen aus demselben Gelege das gewünschte Stadium erreicht haben.

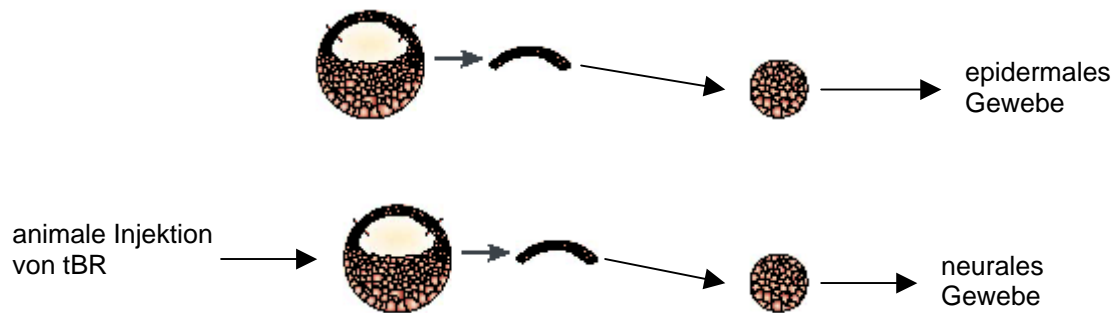


Abb.10: Schematische Darstellung des animale Kappen Assays. Die aus dem Blastocoeldach extrahierte animale Kappe entwickelt sich aus uninjizierten Embryonen zu epidermalem Gewebe (oben). Wird den Embryonen zuvor im Zweizellstadium die mRNA eines trunkierten BMP-Rezeptors (tBR) in den animalen Pol der Blastomere injiziert, differenzieren sich die Explantate in neurales ektodermales Gewebe (unten) (nach Munoz-Sanjuan und Brivanlou, 2002). Für den substraktiven Screen wurden Embryonen im Zweizellstadium in den animalen Pol beider Blastomere 100 pg mRNA eines trunkierten BMP-Rezeptors zusammen mit 100 pmol XTcf-4-Morpholino oder XTcf-3-Morpholino injiziert. Der trunkierte BMP-Rezeptor induziert in diesem Bereich die Entwicklung von Neuroektoderm und gleichzeitig blockiert das jeweilige Morpholino die XTcf-4- bzw. XTcf-3-Synthese. Im späten Blastulastadium 8 wurde das ektodermale Blastocoeldach herausgetrennt und kultiviert, bis Vergleichsembryonen das Stadium 18 erreicht hatten.

Intakte Kappen runden sich bereits nach relativ kurzer Inkubationszeit zu kleinen Gewebekugeln ab (Abb.10). Für weitere Versuche werden die Explantate mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.1.9 Ganzkeimfärbung – Whole mount in situ-Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung ist eine Methode, die es erlaubt mittels spezifischer antisense RNA-Sonden das zeitliche und räumliche Expressionsprofil einzelner Gene im Embryo farblich sichtbar zu machen. Dazu hybridisieren Antigen-markierte antisense RNA-Sonden mit der entsprechenden endogenen mRNA. Nach dem Verdau der nichthybridisierten einzelsträngigen RNA ist es dann möglich, mit einer Antikörperfärbung die Lokalisation der Hybride sichtbar zu machen. Die Ganzkeimfärbung steht zwar hinsichtlich ihrer Sensitivität der RT-PCR nach, hat aber

den großen Vorteil der Vermittlung eines räumlichen Eindrucks von der Expression einzelner Gene in verschiedenen Entwicklungsstadien des Organismus.

Sondenherstellung:

Hierzu werden linearisierte DNA-Plasmide in einer Konzentration von 0.1µg/µl verwendet. 12 µl dieser DNA werden mit 2 µl 10x DIG-RNA Labeling Mix (alternativ: Fluoreszin RNA Labeling Mix), 4 µl 5x Transkriptionspuffer, 1 µl Rnase-Inhibitor und 2 µl der jeweiligen RNA-Polymerase für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend verdaut man die DNA-Matrize indem man für 15 min 2 µl DNase 1 (RNase frei) zugibt und die Reaktion dann mit 2 µl 0.2 M EDTA stoppt. Zur Abtrennung überzähliger Nukleotide wird die Sonde, nachdem ihr Volumen auf 50 µl erhöht worden ist, über eine Mikrosphin G 50 Säule gereinigt. Nun wird die Sonde, deren Qualität auf einem Agarosegel kontrolliert wird, bis zum Gebrauch bei -70°C gelagert.

Embryonenvorbereitung:

Die Embryonen werden bis zum Erreichen des gewünschten Stadiums in 0.1x MBSH gepflegt und dann in MEMFA bei Raumtemperatur für 1 h fixiert. Danach werden die Embryonen schrittweise in Methanol überführt. Darin können sie bei -20°C gelagert werden.

Hybridisierung:

Zuerst werden maximal 20 Embryonen in kleine, verschließbare, 4 ml fassende Röhrchen überführt. Dann werden sie schrittweise und unter ständigem Schwenken vom alkoholischen in ein wässriges Medium überführt. Dazu beginnt man für 5 min mit einem Gemisch aus 75 % Methanol und 25 % DEPC-H₂O, für weitere 5 min mit 50 % Methanol und 50 % DEPC-H₂O, für weitere 5 min mit 25 % Methanol und 75 % DEPC-H₂O und wäscht schließlich 3 mal für je 5 min mit TBST letzte Alkoholreste aus. Jetzt werden die Embryonen für 15 min mit 1 ml Proteinase K Lösung (10 µl/1 ml TBST) verdaut. Um den Verdau zu beenden, werden die Embryonen 2 x 5 min in 0.1 M Triethanolamin gewaschen, welchem man dann für weitere 5 min 5 µl Essigsäureanhydrid zugibt. Anschließend werden noch mal 5 µl Essigsäureanhydrid zugegeben. Nachdem die Zellmembranen der Embryonen somit zur Aufnahme der RNA-Sonde vorbereitet sind, werden die Embryonen 2 x 5 min in TBST gespült, um dann für 30 min in MEMFA fixiert zu werden. Die Fixierlösung wird beim 5 x 5

minütigen Waschen in TBST entfernt. Nachdem man das TBST abgenommen hat, gibt man je Ansatz 500 µl Hybridisierungspuffer dazu und wartet, bis sich die Embryonen abgesetzt haben. Nun wird der Hybridisierungspuffer durch weitere 500 µl Hybridisierungspuffer ersetzt und im Wasserbad 4 Stunden bei 60°C inkubiert. Während dieser Zeit erhitzt man ein Gemisch aus 500 µl Hybridisierungspuffer und 0.5 µg Sonde für 5 min auf 85°C, um es dann gegen den Hybridisierungspuffer auszutauschen. Die Inkubation, bei der komplementäre RNA-Stränge hybridisieren, erfolgt bei 60°C über Nacht.

Antikörperinkubation:

Man entfernt die RNA-Sonde von den Embryonen und bewahrt sie bei -20°C auf. Sie kann bis zu sechs mal wiederverwendet werden. Die Embryonen werden in 500 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen und für weitere 20 min bei 60°C inkubiert. Danach werden die Embryonen 2 x 20 min mit 2 x SSC + 0.05% Tween bei 60°C gewaschen. Diesen Schritt wiederholt man dann mit 0.2 x SSC + 0.05% Tween. Nun wäscht man die Embryonen 2 x 10 min mit TBST bei Raumtemperatur.

Um die Embryonen für die Digoxigenin-Antikörperinkubation vorzubereiten, werden sie 1 Stunde bei Raumtemperatur in Blocking-Puffer inkubiert. Danach nimmt man ihn wieder ab und ersetzt ihn durch die Antikörperlösung und inkubiert 1-4 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Jetzt wird der überschüssige Antikörper während sechsmaligen Waschens für je 30 min in TBST von den Embryonen entfernt. Im nächsten Schritt werden die Embryonen für 2 x 5 min in Alkalischem Phosphatasepuffer geschwenkt. Im Anschluss überführt man sie in kleine Petrischalen, in denen sie in 1 ml Färbelösung im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert werden. Die Färbung muss dabei gelegentlich überprüft werden. Sobald die gewünschte Farbintensität erreicht ist, werden die Embryonen 2 x 5 Minuten in TBST gewaschen und danach in MEMFA + 0.1% Tween 20 für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C nachfixiert.

Nun werden die Embryonen schrittweise in 75% Methanol + 25% DEPC-Wasser überführt, worin sie der Lagerung, Photodokumentation oder dem Schneiden zugeführt werden können.

4.1.10 Embryoneneinbettung in Agarose und Anfertigen von Vibratomschnitten

Nachdem die Embryonen in MEMFA fixiert sind, werden sie schrittweise in APBS überführt und einzeln in kleine Kastenformen mit 2%iger Agarose eingegossen. Anschließend werden mit einem Vibratom 50 µm messende Schnitte angefertigt, diese auf einem Objektträger mit Elvanol eingebettet und fotografiert.

4.1.11 Embryoneneinbettung in Technovit 8100

Nachdem die Embryonen in MEMFA fixiert sind, werden sie schrittweise in Aceton überführt. Nach einstündigem Waschen in Aceton bei 4⁰C wird dieses durch die Infiltrationslösung ersetzt und die Embryonen 1-2 Tage in dieser Lösung bei 4⁰C infiltriert. Nach 5minütiger Inkubation in Einbettlösung bei 4⁰C werden die Embryonen in die zuvor aus Overhead-Folie hergestellten Formen platziert und diese mit Einbettlösung aufgefüllt. Die Lösung ist nach 3 Stunden ausgehärtet und die Schnitte können mit Hilfe eines Mikrotoms angefertigt werden. Auf einem Objektträger werden diese für 2 Stunden bei 37⁰C getrocknet. Nach zurechtschneiden des Plastikblockes werden mit dem Glasmesser 5 µm dicke Schnitte am Mikrotom angefertigt.

4.1.12 Methylenblau/Fuchsin-Färbung von Technovitschnitten

Um verschiedene Gewebe unterschiedlich anzufärben wird die Methylenblau/Fuchsin-Färbung angewendet. Die Technovitschnitte werden dazu 5 – 15 Sekunden in die Arbeitslösung getaucht. Nach Abwaschen der Arbeitslösung mit Aqua dest. werden die Schnitte noch 1 – 2mal in absoluten Ethanol getaucht.

4.1.13 Indirekte Immunfärbung an Ganzkeimen, Gehirnen und Vibratomschnitten

Bei dieser Methode werden die nachzuweisenden Proteine mit einem spezifischen primären Antikörper markiert. Über einen Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten

Sekundärantikörper kann man am Fluoreszenzmikroskop oder am konfokalen Lasermikroskop das markierte Protein lokalisieren.

Die in Methanol gelagerten Embryonen werden für fünf Minuten bei -20°C in Aceton permeabilisiert und danach bei Raumtemperatur zweimal fünfminütig mit Methanol gewaschen. Der Methanol wird schrittweise durch APBS ersetzt. Die Embryonen werden dreimal zehn Minuten in APBS gewaschen, bevor sie viermal für jeweils eine halbe Stunde in APBS-T inkubiert werden. Anschließend wird eine Stunde lang mit APBS-F blockiert. Die Embryonen werden über Nacht bei 4°C mit dem in APBS-F verdünnten primären Antikörper inkubiert.

Der Primärantikörper wird abgenommen und zur Wiederverwendung bei -20°C gelagert. Die Embryonen werden viermal eine halbe Stunde lang mit APBS-TB gewaschen und dann für zwei Stunden in APBS-TBN inkubiert. Anschließend wird das APBS-TBN durch den in APBS-F verdünnten sekundären Antikörper ersetzt. Die Inkubation erfolgt wieder über Nacht bei 4°C . Die Embryonen werden viermal eine halbe Stunde lang mit APBS-TB gewaschen. Zur Dokumentation am Fluoreszenzbinokular werden sie in APBS überführt und können darin ein bis zwei Monate im Dunkeln bei 4°C gelagert werden.

Vibratonschnitte und explantierte Gehirne werden zehn Minuten mit APBS-TB gewaschen und eine Stunde in APBS-B blockiert. Anschließend wird der in APBS-F verdünnte erste Primärantikörper zugegeben. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4°C .

Die Schnitte und Explantate werden viermal je eine halbe Stunde lang mit APBS-TB gewaschen. Danach wird mit dem ersten Sekundärantikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Visualisierung der Tcf-4 Lokalisation und der Dokumentation der injizierten Seite werden die Vibratonschnitte und die aus Stadium 52-Embryonen explantierten Gehirne einer Doppelfärbung unterzogen. Dafür folgen vier halbstündige Waschschrte mit APBS-TB und eine Stunde Blockierung mit APBS-B. Die Inkubation mit dem zweiten in APBS-F verdünnten Primärantikörper findet über Nacht bei 4°C statt.

Am dritten Tag wird der zweite Primärantikörper abgenommen und ebenso wie die anderen bei dieser Methode verwendeten Antikörper zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Schnitte bzw. Explantate werden je eine halbe Stunde lang mit

APBS-TB gewaschen und zwei Stunden mit dem zweiten Sekundärantikörper inkubiert.

Ungebundene Antikörper werden durch viermaliges, halbstündiges Waschen in APBS-TB entfernt.

Die Gehirnexplantate werden in APBS überführt, die Vibratomschnitte auf einen Objektträger gelegt, mit der Elvanolgebrauchslösung benetzt und luftblasenfrei eingedeckelt.

4.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.1 Proteinextraktion aus Embryonen

10 Embryonen werden in 75 µl NOP-Puffer inklusive Protease-Inhibitor bei mehrmaligem Auf- und Abziehen mit einer 0,40 mm Kanüle homogenisiert. Zur vollständigen Solubilisierung der Proteine wird die Suspension 30 Minuten bei 4°C geschüttelt. Zur Abtrennung von Dotterlipiden werden 75 µl Freon dazugegeben, die Lösung durch Vortexen ausgiebig gemischt und eine Minute bei 4°C mit 13000 rpm zentrifugiert. Die obere, die Proteine enthaltende Phase wird abgenommen und bis zur späteren Analyse bei -20°C gelagert.

4.2.2 Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese (SDS-PAGE)

Bei diesem Verfahren werden Proteine aufgrund ihrer Molekülgröße in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. Die Proteine werden vor der Trennung mit dem anionischen Detergens SDS denaturiert. Die unpolaren Seitenketten des SDS binden über hydrophobe Wechselwirkungen mit unpolaren Proteindomänen. Folglich werden den Proteinen negative Ladungen entsprechend ihrer Größe angeheftet. Die Eigenladung eines Proteins spielt hier keine Rolle, weil sie mit SDS maskiert wird.

Bevor die Auftrennung des Proteingemisches im Trenngel stattfindet, wird im Sammelgel auf eine möglichst kleine Bande konzentriert. Deshalb verwendet man als

Sammelgel ein niedrig vernetztes Polyacrylamidgel mit saurem pH. Ioneneffekte verhindern hierbei eine vorzeitige Trennung der Proteine.

Herstellung des Proteingels

Acrylamidlösungen entsprechend der Tab. 2 polymerisieren nach Zugabe von 10 %igem Amoniumpersulfat (APS) und TEMED zwischen zwei in einer Gelapparatur eingespannten, acetongereinigten Glasplatten aus. Das Trenngel wird bis auf dreiviertel der Höhe zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach der Polymerisation des Gels wird das H₂O abgeschüttet und mit einem Filterpapier werden Flüssigkeitsreste am oberen Gelrand abgetupft. Das Sammelgel wird bis zur oberen Glaskante gegossen wobei zur Ausbildung der Ladetaschen ein Kamm an dessen Oberkante eingesetzt wird. Nachdem das Sammelgel polymerisiert ist, wird der Kamm entfernt, und die Ladetaschen gründlich mit Elektrophoreselaufpuffer gespült. Das fertige Gel wird mit den Glasplatten in eine Elektrophoresekammer eingespannt und diese mit Elektrophoreselaufpuffer aufgefüllt. Die aufzutrennenden Proteinproben werden, nachdem sie mit dem Probenpuffer gemischt und bei 95⁰C denaturiert worden sind, in die Taschen geladen und man legt eine Spannung von 60 V an. Nachdem die Proben die Trennschicht von Trenn- und Sammelgel durchlaufen haben, erhöht man die Spannung auf 120 V. Die Auftrennung wird gestoppt, sobald Pyronin vollständig aus dem Trenngel ausgewandert ist.

Lösungen	Trenngel 5 %	Trenngel 7,5 %	Sammelgel 3 %	Sammelgel 6 %
Sol A	3.1 ml	4.8 ml	1.25 ml	1.8 ml
Sol B	3.75 ml	3.75 ml	-	-
Sol D	-	-	2.5 ml	2.5 ml
Sol C	150 µl	75 µl	100 µl	100 µl
H ₂ O	7.9 ml	6.2 ml	6.2 ml	5.6 ml
APS 10%	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	25 µl	25 µ	30 µl	30 µl

Tab. 1: Zusammensetzung verschiedener Sammel- und Trenngele

4.2.3 Western Blot Analyse

Die im Acrylamid-Gel aufgetrennten Proteine werden quantitativ auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dazu werden vier 3 MM Filterpapierstücke, zwei Faserpolster, und die Nitrocellulose benötigt, welche in der Größe des Trenngels zurechtgeschnitten werden. Diese Bestandteile werden zunächst 5 min in Transferpuffer getränkt und dann luftblasenfrei folgendermaßen übereinandergelegt:

Kathode

Ein Faserpolster

Zwei Filterpapiere

Trenngel

Nitrocellulose

Zwei Filterpapiere

Ein Faserpolster

Anode

In einer mit Eis gekühlten Mini-Protean II Tankblotchkammer erfolgt der Transfer bei einer Spannung von 111 V für 90 min. Nach dem Blotten werden die transferierten Proteine mit Ponceau S angefärbt und die Position der Proteine des Molekulargewichtsmarkers auf der Nitrocellulosemembran markiert. Mit TBS/Tween wird die Nitrocellulose wieder vollständig entfärbt. Die Markierung der Molekulargewichtsmarker dient der späteren Größenbestimmung der Proteine.

Immunologische Markierung von Proteinen

Die freien Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulose werden nach dem Entfärben mit Proteinen blockiert. Dies geschieht durch 30minütige Inkubation in 10% Magermilchpulver in PBS. Anschließend wird die Nitrocellulose mit TBS/Tween gewaschen und mit dem entsprechend verdünnten (hier: 1:500) primären Antikörper (hier: monoklonaler α GFP-Antikörper) bei 4⁰C über Nacht inkubiert. Je nach Art des Antikörpers können die Lösungen bei einer Lagerung von -20⁰C bis zu sechsmal wiederverwendet werden. Am nächsten Tag werden die Membranen dreimal mit TBS/Tween für jeweils 10 min gewaschen und mit dem 1:3000 verdünnten

Sekundärantikörper (Alkalische Phosphatase, Goat anti mouse) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird der überschüssige, nicht gebundene Sekundärantikörper durch drei jeweils 10minütige Waschschrte mit TBS/Tween von der Nitrocellulosemembran entfernt. Die Membranen werden noch zweimal je 5 Minuten mit 0.1M Tris/HCL pH 9.5, 0.1M NaCl gewaschen.

Nachweis der immunologisch markierten Proteine

Der Proteinnachweis erfolgt über eine chemilumineszente Reaktion, die von der an den Sekundärantikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase katalysiert wird. Dazu werden die Lösungen A und B des ECL+plus Western blotting Detection System (Amersham) im Verhältnis 40:1 gemischt, auf die Nitrocellulosemembran gegeben und die Chemilumineszenz mit einer CCD Kamera aufgenommen.

4.3 Molekularbiologische und Mikrobiologische Methoden

4.3.1 Fälln von DNA und RNA

DNA und RNA kann man aus einer Lösung isolieren, indem man sie mit einem Zehntel ihres Volumen 3 M Natriumacetatlösung pH 5.2, sowie 2.5 Volumina absoluten Ethanol versetzt und 30 min bei -70°C , oder mindestens 2 h bei -20°C fällt. Anschließend werden die gefällten Nukleinsäuren für 20 min mit 13000 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Präzipitat mit dem Doppelten des Ausgangsvolumens 70%igem Ethanol gewaschen. Nach 5minütiger Zentrifugation mit 13000 rpm bei 4°C wird der Überstand verworfen und das Präzipitat getrocknet, um es anschließend in einem geeigneten Volumen und Puffer erneut zu suspendieren. Dabei ist zu beachten, dass RNA vorsichtig und nicht vollständig getrocknet werden darf, da sie sonst nur mehr schlecht gelöst werden kann.

Alternativ kann die Fällung auch mit Isopropanol erfolgen. Dazu benötigt man 0.7 Volumina des Ausgangsvolumens an Isopropanol. Die Fällung erfolgt ohne Wartezeit bei Raumtemperatur. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm wird das Präzipitat in 70%igem Ethanol gewaschen.

4.3.2 Aufreinigung von DNA und RNA mit Phenol/Chloroform

Beim Ausschütteln mit Phenol/Chloroformlösung (1:1) werden Nucleinsäuren vor allem von Proteinen gereinigt. Dabei werden die Proteine denaturiert und erscheinen in der unteren, organischen Phase.

Dazu schüttelt man für etwa 5 min gleiche Volumina der zu reinigenden Lösung mit Phenol/Chloroformlösung aus. Nach anschließender 15minütiger Zentrifugation mit 13000 rpm bei Raumtemperatur wird der Überstand in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Entfernung von Phenolresten schüttelt man den Ansatz nun mit gleichen Volumina Chloroform/Isoamylalkohollösung (40:1) aus. Nach 15minütiger Zentrifugation mit 13000 rpm bei Raumtemperatur können aus der oberen Phase die Nucleinsäuren gefällt werden.

4.3.3 Aufreinigung von DNA und RNA über Säulen

Eine Aufreinigung von Nucleinsäuren und damit eine Abtrennung von störenden Nucleotiden ist auch über Säulen mit einer Ausschlußchromatographie möglich. Dazu werden „Probe Quant G50 Micro Columns“ der Firma Amersham (New York, USA) verwendet. Die Aufreinigung erfolgt gemäß der beiliegenden Vorschrift des Herstellers. In der Regel ist die Nucleinsäure-Konzentration nach diesem Verfahren niedriger, die Reinheit ist jedoch meist höher. So findet diese Methode Verwendung, wenn Nucleinsäuren von hoher Reinheit, wie zum Beispiel zur Injektion oder zur Sondenherstellung für die Ganzkeimfärbung, benötigt werden.

4.3.4 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Nucleinsäuren können aufgrund ihres spezifischen Absorptionsmaximums bei $\lambda = 260$ nm photometrisch quantifiziert werden. Dabei können Verunreinigungen mit Proteinen stören. Da Proteine aber im ultravioletten Bereich erst bei $\lambda = 280$ nm ihr Absorptionsmaximum haben, können solche Kontaminationen zuverlässig mit dem Quotienten $A_{\lambda_{260}}$ zu $A_{\lambda_{280}}$ abgeschätzt werden. Bei sauberen Nucleinsäurelösungen sollte dieser zwischen 1.6 und 2 liegen.

Für reine Nukleinsäuren gilt nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:

50 µg / ml doppelsträngige DNA zeigen 1.0 OD₂₆₀

40 µg / ml einzelsträngige DNA oder RNA zeigen 1.0 OD₂₆₀

4.3.5 Restriktionsanalyse von DNA

Bakterielle Restriktionsnukleasen erkennen spezifische DNA-Sequenzen, meist Palindrome, und durchtrennen dort den DNA-Strang. Dabei entstehen je nach Enzym 5' bzw. 3' überhängende oder glatte Enden. Zur Restriktionsanalyse werden der zu verdauenden DNA pro µg 1 Einheit Restriktionsendonuklease und ein Zehntel Volumen des entsprechenden 10fach konzentrierten Puffers zugesetzt. Dann erfolgt der Verdau bei den für das Enzym optimalen Reaktionsbedingungen über Nacht. Die Restriktionsanalyse wird auf einem analytischen Agarosegel durchgeführt.

4.3.6 cDNA – Synthese mittels reverser Transkription

Bei der Reversen Transkription wird mRNA mit dem Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. 1 µg Gesamt-RNA wird in 10 µl DEPC-H₂O verdünnt, mit 1 µl Random Hexamer Primern (0.1 g/l) für 4 min bei 65⁰C denaturiert und danach auf Eis abgekühlt.

Separat werden in einem Mastermix 4 µl 5 x Puffer („Erststrangpuffer“), 2 µl 10 mM DTT, 1 µl 10 mM dNTP-Mix, 0.5 µl RNase Inhibitor und 1.3 µl DEPC-H₂O gemischt. Dieser wird dann zu der zuvor denaturierten RNA gegeben und nach Zugabe von 0.25 µl (1u) Reverse Transkriptase 30 min bei 42⁰C inkubiert. In diesem Schritt wird die cDNA synthetisiert.

Als Test für mögliche Kontaminationen mit DNA pipettiert man jeden Ansatz auch einmal ohne Reverse Transkriptase. Aus diesem Ansatz darf dann bei einer anschließenden PCR kein DNA-Fragment amplifiziert werden.

4.3.7 Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels PCR (Polymerase Kettenreaktion)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kann eine spezifische, durch zwei Primer begrenzte DNA-Sequenz exponentiell amplifiziert werden. Als hitzestabile DNA-Polymerase dient die Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*.

Bei einem Gesamtvolumen von 25 µl enthält jeder Reaktionsansatz 2.5 µl Taq-Puffer, 2.5 µl dNTPs (2.5 mM), 1.5 µl MgCl₂ (25 mM), 16.25 µl steriles H₂O sowie 0.25 µl Taq-Polymerase (1.25 U) und je 0.5 µl der Primer (25 µM) sowie 1 µl der DNA-Matrize. Alle Reagenzien werden in einem 0.2 ml-Reaktionsgefäß auf Eis zusammengegeben.

Das Standard-Programm im Thermozykler beginnt mit einem 1-minütigen Denaturierungsschritt bei 95⁰C. Darauf folgen (je nach Primer-Paar) zwischen 15 und 36 Zyklen bestehend aus 30 Sekunden bei 94⁰C, weiteren 30 Sekunden bei 53⁰C bis 55⁰C (je nach Primer-Paar) zur spezifischen Bindung der Primer an die einzelsträngige DNA-Matrize und abschließenden 30 Sekunden bei 72⁰C, in denen die DNA-Neusynthese durch die Taq-Polymerase erfolgt. Zuletzt folgen 10 Minuten Inkubation bei 72⁰C und eine abschließende Kühlung bei 4⁰C beziehungsweise eine Lagerung der Ansätze bei -20⁰C.

4.3.8 Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels pwo-PCR

Die pwo-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* wird zur fehlerarmen Amplifikation von DNA-Fragmenten eingesetzt. Sie besitzt im Vergleich zur Taq-Polymerase zwar eine deutlich geringere Syntheseleistung, aber aufgrund ihrer zusätzliche 3'/5' Exonukleaseaktivität und ihrer „proof reading“ Aktivität ist ihre Fehlerquote wesentlich geringer. Deshalb kann die pwo-Polymerase eingesetzt werden, um DNA-Fragmente zu erzeugen, die zur Klonierung benutzt werden.

Dazu werden 5 µl 10 x pwo-Transkriptionspuffer, 2 µl 50 mM MgSO₄, 4 µl 2.5 mM dNTPs, 2 µl 25 µM Primergemisch, 1 µl Matrize (0.1 µg), 3 µl (3u) pwo-Polymerase und 33 µl DEPC-Wasser in ein 0.2 ml Reaktionsgefäß gegeben und im „Hotstart-Verfahren“ mit einem spezifischen Programm amplifiziert. Dieses weist im Gegensatz

zum Amplifikationsprogramm mit der Taq-Polymerase eine auf 5 min verlängerte Amplifikationszeit auf. Die längere Amplifikationszeit ist nötig, weil die pwo-Polymerase aufgrund ihrer 3'/5' Exonukleaseaktivität und ihre „proof reading Aktivität“ im Vergleich mit der Taq-Polymerase nur ein Zehntel der Reaktionsgeschwindigkeit erreicht. Zur anschließenden Isolierung der hergestellten DNA-Fragmente wird eine präparative Gelelektrophorese durchgeführt.

4.3.9 Analytische Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA oder RNA

1.5 % (w/v) Agarose wird in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und anschließend Ethidiumbromid (Endkonzentration von 0.5 µg/ml) zugesetzt. Diese Suspension wird, nachdem sie auf etwa 50⁰C abgekühlt ist, in eine vorbereitete Form gegossen, wo sie nach weiterem Abkühlen erstarrt.

Die Nukleinsäure-Proben werden mit einem Zehntel Volumen Ladepuffer versetzt und in die Taschen des gegossenen Gels gegeben. Durch Anlegen einer Gleichspannung von 80 bis 120 V erfolgt die Auftrennung der Nukleinsäuren nach ihrer jeweiligen Größe. Das im Gel befindliche Ethidiumbromid interkaliert in die Nukleinsäurefragmente und das entstehende Bandenmuster kann so mittels einer UV-Lampe in einer Geldokumentationsanlage bei $\lambda = 302 \text{ nm}$ sichtbar gemacht werden.

Die Größenzuordnung der DNA-Fragmente kann beim Vergleich ihrer Laufstrecke mit einem parallel auf dem Gel getrennten DNA-Standard erfolgen. Der in dieser Arbeit verwendete 2-log-Marker zeigt folgende Banden: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.2, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0 kb, der 100 bp-Marker zeigt Banden in 100 bp-Schritten von 100 bp –1000 bp.

4.3.10 Präparative Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente aus der Agarosegelmatrix zu isolieren, schneidet man nach dem Trennungsvorgang das zu isolierende Fragment aus dem Gel unter UV-Licht aus. Anschließend wird das Gel geschmolzen die darin enthaltene DNA mit Hilfe

eines Kits (High Pure PCR Product Purification Kit von Roche) und entsprechend den Angaben des Herstellers an eine Affinitätsmatrix gebunden, gewaschen und eluiert.

4.3.11 Dephosphorylierung linearer DNA am 5'-Ende

Um eine Rezirkularisierung linearisierter Vektormoleküle zu verhindern, wird die Phosphatgruppe am 5'-Ende mithilfe einer Phosphatase abgespalten.

1 bis 2 µg linearisierter Plasmid-DNA wird mit 50 Einheiten calf intestinal alkalischer Phosphatase in 10 mM Tris/HCl pH 8.0 zwei Stunden bei 37°C verdaut. Eine anschließende Phenol/Chloroform Extraktion entfernt die Phosphatase wieder.

4.3.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der enzymatischen Ligation von DNA-Fragmenten werden die Phosphatbrücken in der DNA enzymatisch geschlossen.

Dabei wird zu 100 ng linearisiertem Vektor das zu insertierende Fragment in bis zu 5-fachem molarem Überschuß zugegeben. Ein weiteres Fünftel des Reaktionsansatzes besteht aus 5-fach konzentriertem Reaktionspuffer und gegebenenfalls 10 mM dATP. Auf 10 µl Gesamtvolumen werden 0.5 µl (5u) T4 DNA-Ligase eingesetzt. Bei der Wahl der optimalen Reaktionstemperatur wählt man am besten einen Kompromiß aus DNA-Hybridisierungstemperatur und Temperaturoptimum für die T4 DNA-Ligase. Die Ligation erfolgt über Nacht im Eisbad.

4.3.13 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 angeimpft. Die Bakterienkultur wird bei 37°C und 226 rpm so lange geschüttelt, bis sie eine OD₆₆₀ zwischen 0,5 und 0,6 aufweist. Die Zellen werden für 5 Minuten bei 4500 x g und 4°C sedimentiert und das Pellet in 100 ml gekühltem TFB 1 resuspendiert. Die Zellen werden 5 Minuten auf Eis gestellt und anschließend erneut 5 Minuten bei 4500 x g und 4°C abzentrifugiert. Danach werden die Zellen in 10 ml TFB 2 resuspendiert und nach 30minütiger Inkubation auf Eis zu

Portionen von 100 μl aliquotiert. Die Portionen werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

4.3.14 Transformation kompetenter *Escherichia coli* Bakterien mit Plasmiden

Zur Transformation werden dem Ligationsansatz oder der externen DNA-Probe 50 μl kompetente *E. coli* JM109 zugegeben und für etwa 30 min auf Eis inkubiert. Danach wird der gesamte Ansatz für 45 Sekunden auf 42°C erwärmt. Dieser Hitzeschock veranlasst die Bakterien, verstärkt Plasmide aus ihrer Umgebung aufzunehmen. Die Bakterien werden erneut für 2 Minuten auf Eis gestellt. Nach einer Ruhepause von 60 min in 450 μl SOC-Medium bei 37°C , wird je nach Anzahl der zu erwartenden Kolonien ein Aliquot auf selektivem LB-Agar ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

4.3.15 Blau-Weiß-Selektionierung

Einige Vektoren wie z.B. pGEM-T besitzen das für das Enzym β -Galaktosidase codierende lacZ Gen. Innerhalb dieses Gens befindet sich eine Klonierungsstelle zum Einfügen von DNA-Fragmenten. Mit Einfügen eines Fragmentes wird die Bildung des Enzyms unterbunden. Zur Durchführung der Blau-Weiß-Selektionierung werden 50 μl XGal-Lösung und 200 μl IPTG ausplattiert und die Platten vor dem Ausplattieren der Bakterien für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Vektor enthält einen Promotor, der von 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 ein DNA-Fragment in den Vektor eingefügt wurde, erscheinen weiß.

4.3.16 Isolierung bakterieller Plasmid-DNA im Kleinmaßstab

Bei dieser Methode wird die Plasmid-DNA nach selektiver Fällung chromosomaler DNA an eine Affinitätsmatrix adsorbiert. Dadurch wird DNA hohen Reinheitsgrades gewonnen. Die nachfolgend beschriebene Vorgehensweise bezieht sich auf den NucleoSpin-Kit von Machery Nagel.

Mit rekombinanten Plasmiden transformierte *E.coli* Bakterien werden in 1.5 ml LB-Medium mit Ampicillin bei 37⁰C unter Schütteln über Nacht gezogen. Die Bakterien werden bei 13000 rpm für 30 Sekunden sedimentiert und in 250 µl der Lösung A1 resuspendiert. Die Lysis erfolgt nach Zugabe von 250 µl Lösung A2 für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Danach wird mit 300 µl der Lösung A3 chromosomale DNA gefällt, und bei 13000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Nun gibt man den Überstand auf eine NucleoSpin Plasmid-Säule und zentrifugiert bei 13000 rpm für 1 min. Die Säule wird mit 600 µl der Lösung A4 gewaschen. Um die Silikat-Membran komplett zu trocknen wird die Säule für weitere 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Danach eluiert man die Plasmid-DNA, indem man 50 µl der Lösung AE auf die Säule gibt, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 13000 rpm für 1 min abzentrifugiert.

4.3.17 Endotoxinfreie Isolierung bakterieller Plasmid-DNA im Großmaßstab

Plasmid-DNA einer 100 ml Bakterienkultur wird mit Hilfe des PC500 EF-Kits von Machery Nagel, entsprechend den Angaben des Herstellers extrahiert. Das Verfahren ähnelt dem in 4.3.16 beschriebenen, nur im großen Maßstab mit folgenden Änderungen:

Die sedimentierten Bakterien werden in 12 ml S1-EF-Puffer resuspendiert. Die Lysis erfolgt durch Zugabe von 12 ml S2-EF-Puffer und die Fällung der chromosomalen DNA durch Zugabe von 12 ml S3-EF-Puffer. Die gefällte chromosomale DNA wird durch einen Filter entfernt und die Plasmid-DNA durch eine AX500EF-Säule isoliert. Die Säule wird 4 x mit 12 ml N3-EF-Puffer und 2 x mit 12 ml N4-EF-Puffer gewaschen. Die Plasmid-DNA wird dann mit 12 ml N5-EF-Puffer eluiert und mit 8.4 ml Isopropanol gefällt und 20 min bei 4⁰C mit 10000 x g sedimentiert. Die DNA wird mit 70% endotoxinfreiem Ethanol gewaschen und bei 4⁰C für 5 min mit 10000 x g

abzentrifugiert. . Das bei Raumtemperatur für 5-10 min getrocknete Pellet wird in 300-400 µl TE-EF-Puffer gelöst.

Endotoxinfreie Plasmidpräparationen eignen sich für alle in dieser Arbeit benutzten Anwendungen. Für Transfektionen eukaryotischer Zellen und Mikroinjektion in Embryonen isolierte Plasmid-DNA sollte auf jeden Fall endotoxinfrei sein

4.3.18 TELT-Plasmid-Präparation

Die Bakterien aus der Über-Nacht-Kultur werden 5 min bei 5000 rpm sedimentiert, der Überstand abgesaugt und das Bakterien-Pellet in 150 µl TELT-Puffer und 15 µl Lysozym (10 mg/ml) durch vortexen resuspendiert und die Bakterien lysiert. Nach 5minütiger Lyse bei Raumtemperatur werden die Bakterien 120 Sekunden bei 100°C aufgeköcht und anschließend mindestens 5 min. auf Eis abgekühlt. Mit 20minütiger Zentrifugation mit 13000 rpm bei 4°C werden die Zellbestandteile sedimentiert. Der Überstand mit der Plasmid DNA wird abgenommen und in 150 µl Isopropanol 5 min. bei Raumtemperatur gefällt. Die DNA wird 10 min bei 13000 rpm sedimentiert und das Pellet anschließend mit 300 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter 10minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm wird das DNA-Pellet bei 42°C für 10 Minuten getrocknet und durch 20minütiges Schütteln in 40 µl TE/RNase gelöst.

4.3.19 *In vitro* Transkription von mRNA

Die *in vitro* Transkription ist eine Reaktion, bei der mittels der DNA-abhängigen RNA-Polymerase von Plasmid-DNA vielfache Kopien an mRNA erzeugt werden können. Dafür stehen je nach RNA- Polymerase unterschiedliche Enzymkits zur Verfügung. Jeweils wird nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Für Transkriptionen mit der Sp6 oder T7 RNA-Polymerase werden 2 µl linearisierter DNA-Matrize mit einer Konzentration von 0.5 µg/µl mit 2 µl 10 x Transkriptionspuffer, 5 µl DEPC-Wasser, 10 µl 2 x NTP/Cap und 2 µl Enzym-Mix für 2 h bei 37°C transkribiert. Anschließend wird 15 min mit 1 µl DNase I zum Abbau der Matrize bei 37°C verdaut.

Der Ansatz wird mit DEPC-Wasser auf 100 µl aufgefüllt und einer Phenol/Chloroformextraktion unterzogen. Um überschüssige Nukleotide abzutrennen, gibt man den gereinigten Ansatz auf eine getrocknete G 50 Microspin Säule und eluiert mit 2900 rpm für 2 min bei Raumtemperatur. Das Eluat wird gefällt und in 20 µl DEPC-Wasser bei 50°C resuspendiert.

Um die mRNA gezielt einsetzen zu können, wird eine Konzentrationsbestimmung am Photometer sowie eine Qualitätskontrolle der mRNA auf einem analytischen Agarosegel durchgeführt.

4.3.20 Präparation von Gesamt-RNA

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Embryonen oder Explantaten erfolgt mittels des „SV Total RNA Isolation System“ der Firma Promega. Dabei werden die Nukleoproteinkomplexe mit Hilfe von Guanidin-Thiocyanat (GTC) und SDS aufgelöst, die RNA frei von Proteinen in Lösung gebracht, an eine Affinitätsmatrix gebunden, gewaschen und eluiert. Es wird nach dem beiliegenden Protokoll des Herstellers vorgegangen.

4.3.21 Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA

Bei dieser Methode wird mRNA mit Hilfe magnetischer Kügelchen, sogenannter Oligo-(dT)₂₅-Dynabeads aus der Gesamt-RNA isoliert. Dabei bindet der Poly-A-Schwanz der mRNA an das an eine magnetische Matrix gekoppelte Oligo-dT-Nukleotid. Wird die Probelösung in das Feld eines Magneten gebracht, wandern die magnetischen Kügelchen mitsamt der gebundenen mRNA in Richtung des Magneten und lagern sich an der Wand des Probengefäßes an. Die ungebundenen Bestandteile werden in Waschschritten entfernt.

Die Versuchsdurchführung erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers. Es werden 75 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die Elution der mRNA erfolgt in einem Volumen von 10 µl. Nach Gebrauch werden die magnetischen Kügelchen gemäß dem Protokoll des Herstellers regeneriert und können so bis zu viermal wieder verwendet werden.

4.3.22 Substraktiver Screen

4.3.22.1 Anreicherung selektiv exprimierter Gene

Diese Methode dient dazu, Gene aufzuspüren, die unter bestimmten Bedingungen selektiv exprimiert bzw. ausgeschaltet werden. Dazu hybridisiert man zwei verschiedene cDNA-Populationen miteinander und diejenigen Gene, die lediglich in einer der beiden Populationen vorhanden sind, werden selektiv amplifiziert. Dieses Experiment wird mit dem „Clontech PCR-Select cDNA Substraction Kit“ der Firma BD Biosciences nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Die Abb. 11 und 12 geben einen Überblick über die einzelnen Arbeitsschritte.

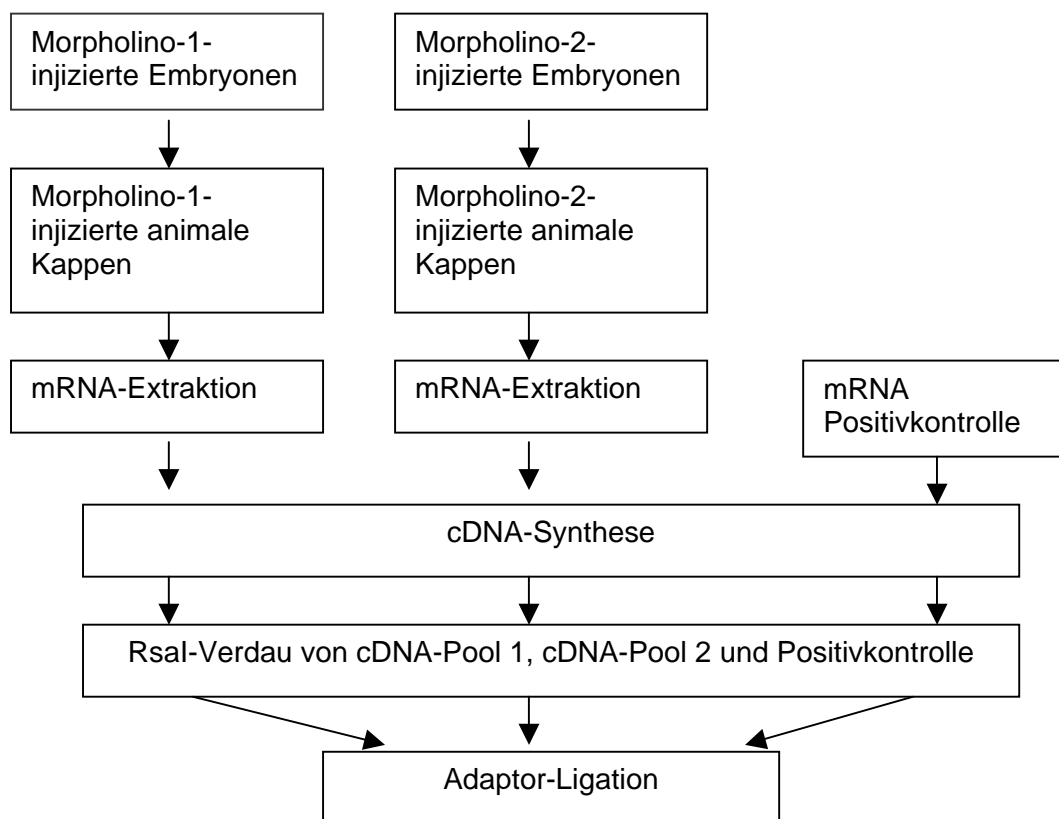


Abb.11: Schema der einzelnen Arbeitsschritte von der Injektion bis zur Ligation der Adaptoren an die mit dem RsaI-Verdau entstandenen cDNA-Fragmente.

Aus jeweils 2000 Explantaten wird zunächst die mRNA extrahiert und mittels Reverser Transkriptase in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Diese wird anschließend mit der Endonuklease RsaI verdaut. Die Erkennungssequenz für

dieses Enzym besteht aus vier Basen. Statistisch gesehen sollte die Endonuklease somit ca. alle 400 Basenpaare einmal schneiden. Außerdem weisen die RsaI-Schnittstellen gerade Enden auf, was eine Voraussetzung für die Ligation der Adaptoren im nächsten Arbeitsschritt ist.

Die beiden Adaptoren 1 und 2R sind 40 Basen lange DNA-Oligomere, die aufgrund des Fehlens einer Phosphatgruppe ausschließlich an das 5'-Ende der cDNA-Fragmente binden. An den cDNA-Pool 1, den cDNA-Pool 2 und die Positivkontrolle werden die Adaptoren 1 bzw. 2R ligiert. Diese Ligation erfolgt mit der T4 DNA-Ligase über Nacht bei 16°C. Im Folgenden werden die mit Adaptoren versehenen cDNA-Fragmente als „tester“ und die cDNA-Fragmente ohne Adaptoren als „driver“ bezeichnet. Mit insgesamt sechs Ansätzen folgen nun je zwei Hybridisierungsschritte. Jeder „tester“-Ansatz wird mit dem im Überschuss zugegebenen „driver“ aus dem anderen cDNA-Pool hybridisiert. Dabei wird zur Hybridisierung der „tester“-cDNA-Population 1, „driver“-cDNA aus Population 2 zugegeben und umgekehrt. Als Positivkontrolle dient eine Mischung aus HaellI-geschnittener X174 DNA und cDNA aus der Positivkontrolle als „tester“ und die cDNA der Positivkontrolle als „driver“.

tester cDNA mit Adaptor 1

tester cDNA mit Adaptor 2R

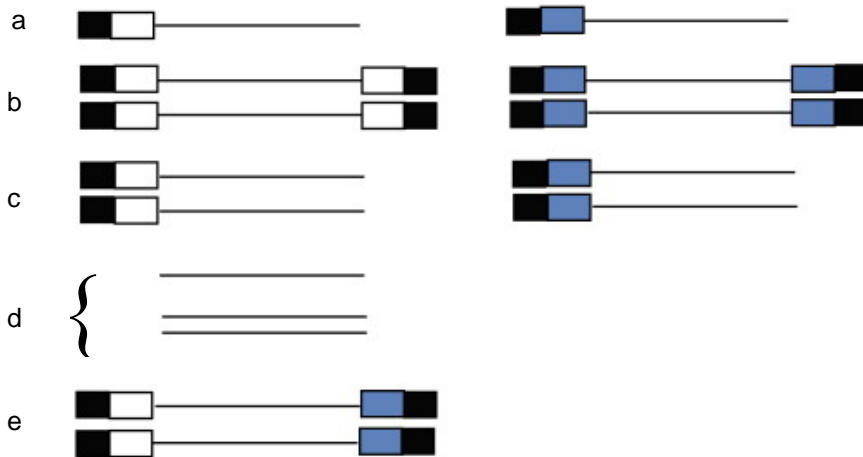
1. Hybridisierung



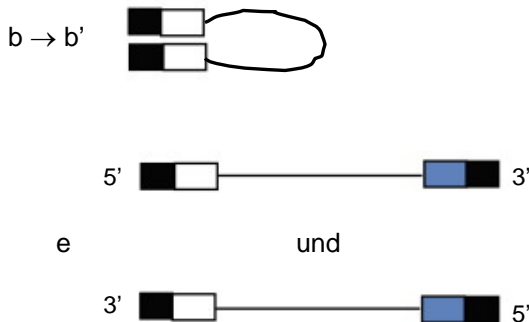
2. Hybridisierung



Auffüllen der Enden



PCR-Amplifikation



- a, d: keine Amplifikation
- b': keine Amplifikation
- c: lineare Amplifikation
- e: exponentielle Amplifikation**

Abb.12: Schema der cDNA-Substraktion mittels PCR-Selektion. Moleküle des Typs e werden nur gebildet, wenn deren Sequenz in einer der beiden tester cDNA Populationen aufreguliert ist. Die äußeren schwarzen Boxen der Adaptoren stellen den Teil der Adaptorsequenz dar, der mit den Primern der ersten PCR korrespondiert. Die Sequenz der weißen und blauen Teile der Adaptoren korrespondiert mit den Primern der Nested-PCR.

Die erste Hybridisierung erfolgt nach einem 90sekündigen Denaturierungsschritt bei 98°C zwischen 6 und 12 Stunden bei 68°C.

Vier Arten von Fragmenten resultieren aus der ersten Hybridisierung:

Solche, die nur in der „tester“-Population vorhanden sind, werden als Typ a)- bzw. Typ b)-Fragmente bezeichnet. Fragmente, die nur in der „driver“-Population vorhanden sind, bilden einzel- bzw. doppelsträngige Typ b)-Fragmente. Typ c)-Fragmente bilden sich durch Zusammenlagerung von sowohl im „driver“ als auch im „tester“ vorhandenen Fragmenten (Abb.12).

Für die zweite Hybridisierung werden die beiden gleichartigen Testerpopulationen aus der ersten Hybridisierung gemischt (Ansatz 1 mit Ansatz 2, 3 mit 4 und 5 mit 6) und aus der jeweils anderen Probe frische „driver“-cDNA zugegeben. Diese zweite Hybridisierung erfolgt unter denselben Bedingungen wie die erste Hybridisierung. Nach Auffüllen der 3'-Enden durch die cDNA-Polymerase während einer 5minütigen Inkubation bei 75°C treten zu den vier oben beschriebenen Typen nun zusätzlich Fragmente auf, die aus der Zusammenlagerung zweier homologer Typ a)-Fragmente entstehen: Typ e)-Fragmente. Dies sind die gesuchten differenziell exprimierten Fragmente der XTcf-4- oder Tcf-3- abhängig regulierten Gene. Da diese Fragmente beide Adaptoren aufweisen, können sie mittels PCR selektiv exponentiell amplifiziert werden. Diese Amplifikation erfolgt bei einer ersten PCR mit Primern, die komplementär zum äußeren Teil der beiden Adaptoren sind. Die Zyklenzahl beträgt dabei 32 und die Annealingtemperatur 64°C. Eine zweite sogenannten Nested-PCR, die mit Primern amplifiziert die im inneren Bereich der Adaptoren binden, wird der Hintergrund weiter reduziert und differenziell exprimierte Sequenzen weiter angereichert. Diese Amplifikation erfolgt mit 15 Zyklen und einer Annealingtemperatur von 65.5°C.

4.3.22.2 Eliminierung falsch positiver Gene

4.3.22.2.1 Anlegen einer cDNA-Bibliothek der selektiv exprimierten Gene

Zum Anlegen einer cDNA-Bibliothek werden die Amplifikate in einen pGEM-T-Vektor der Firma Promega ligiert, in kompetente *E. coli* JM 109 transformiert, die Kolonien auf Agarplatten vereinzelt und die Plasmide extrahiert

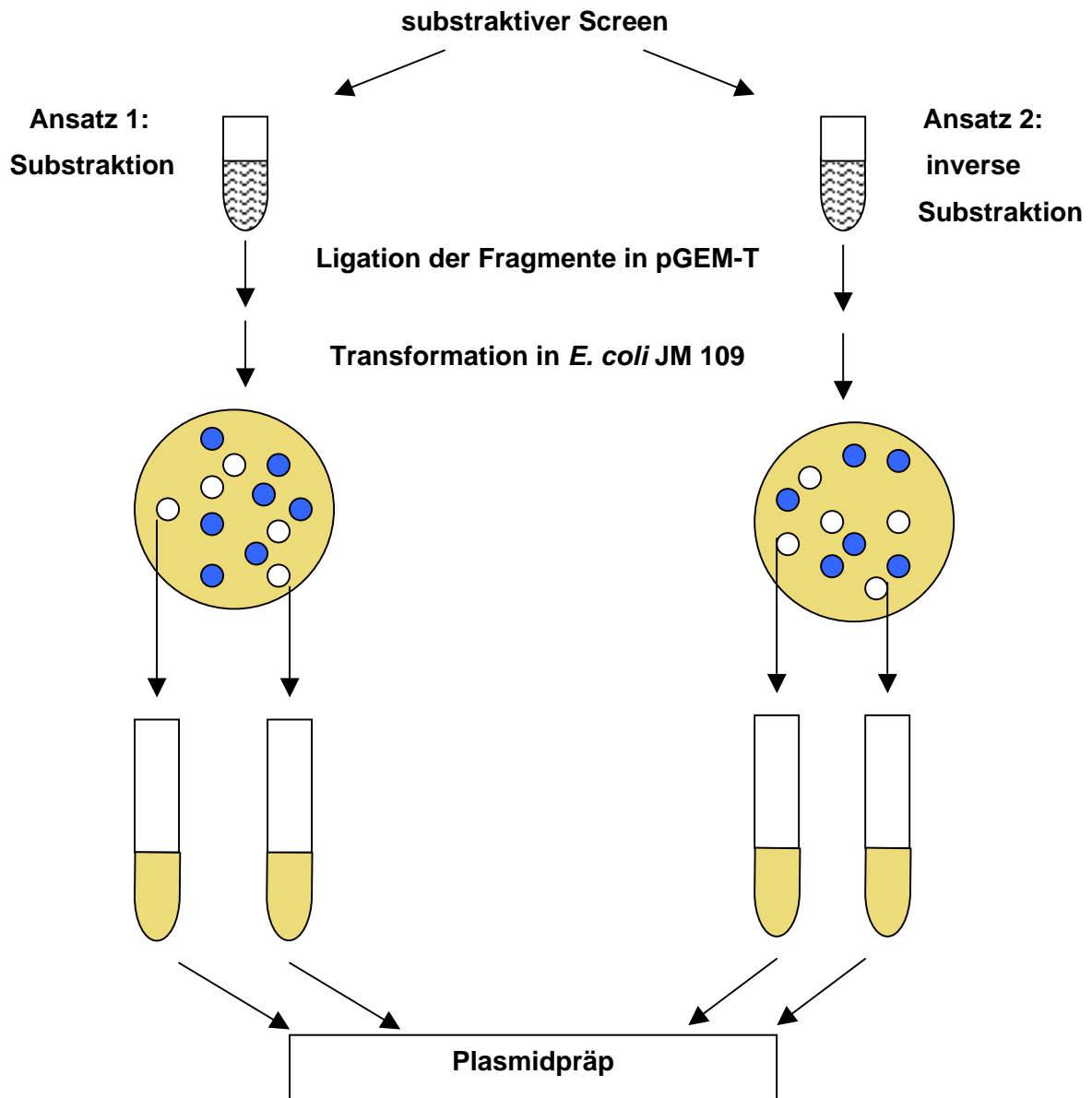


Abb.13: Schema der Vorgehensweise zum Aufbau einer cDNA Bibliothek selektiv exprimierter Gene.

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 Inkubation über Nacht bei 37⁰C werden die weißen Bakterienkolonien mit einem Zahnstocher gepickt und damit 2ml LB_{AMP}-Medium angeimpft. Nach einer weiteren Inkubation über Nacht bei 37⁰C wird die Plasmid-DNA mittels Plasmidpräp isoliert (Abb.13).

4.3.22.2.2 Southern Blot

Das Agarosegel wird für 45 Minuten in Denaturierungslösung geschwenkt. Nach kurzem Spülen mit H₂O bidest wird das Gel weitere 30 Minuten in Neutralisierungslösung geschwenkt. Mit frischer Neutralisierungslösung wird nochmals für 15 Minuten gewaschen. Nach einmaligen Spülen mit H₂O bidest wird das Gel zum Äquilibrieren für 10 Minuten in 10x SSC geschwenkt.

Transfer der Proben auf Nitrocellulose:

Mit einer Petrischale und einer Glasplatte wird in einer Schale ein Tisch errichtet. Dieser wird mit Whatman-Filter bedeckt, sodass das Filterpapier bis auf den Boden der Schale reicht. Das Filterpapier wird mit 20x SSC gefüllt. Auf dem Filter wird das Agarosegel platziert und darauf ein Stück Nitrocellulosemembran passender Größe, das zuvor in 20x SSC eingeweicht wurde. Auf diese Schicht kommen 4 Lagen Whatman-Filter und mehrere Lagen saugfähige Papiertücher. Dabei muss beachtet werden, dass sich zwischen Agarosegel und Nitrocellulosemembran keine Luftblasen befinden. Außerdem darf der Puffer nicht in die Filter unter dem Gel gelangen. Der gesamte Aufbau wird mit einem Gewicht von ca. 500 g beschwert und über Nacht stehen gelassen. Durch die wirkenden Kapillarkräfte wird der Puffer durch das Gel und die Membran in das Filterpapier gesaugt und transferiert dabei die DNA aus dem Agarosegel auf die Nitrocellulosemembran. Am nächsten Tag wird der Blot abgebaut und die DNA durch zweimalige Bestrahlung mit je 150 Joule UV-Licht mit der Nitrocellulose verbunden.

4.3.22.2.3 Dot Blot

2 µl von 50-70 Ansätzen der Lösung mit den selektiv exponentiell amplifizierten Gen-Fragmenten wird auf eine Nitrozellulosemembran aufgetropft. Nach 10minütiger Trocknung wird die DNA durch zweimaliges Bestrahlen mit je 150 Joule UV-Licht mit der Nitrozellulose verbunden. Die Membran kann nun der radioaktiven Hybridisierung zugeführt werden.

4.3.22.2.4 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mittels PCR

Radioaktiv markierte DNA-Fragmente werden mittels PCR erstellt. Als Primer werden die Nested-Adaptorprimer 1 und 2 aus dem CLONTECH PCR-Select cDNA Substraction-Kit verwendet. Zusätzlich zu dem Mix an dNTPs setzt man zur Markierung pro Ansatz 50 μCi [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP ein. Die Annealingtemperatur beträgt $65,5^{\circ}\text{C}$ und die Zyklenzahl 15. Der Einbau der radioaktiven Nukleotide in die amplifizierte DNA wird mit der Messung der Radioaktivität im Handmonitor überprüft. Nach der Amplifikation wird die Sonde zur Entfernung der übrigen radioaktiven Nukleotide über den PCR-Purification Kit von Qiagen nach Anleitung aufgereinigt. Die Sonde kann nun in die Hybridisierung eingesetzt werden.

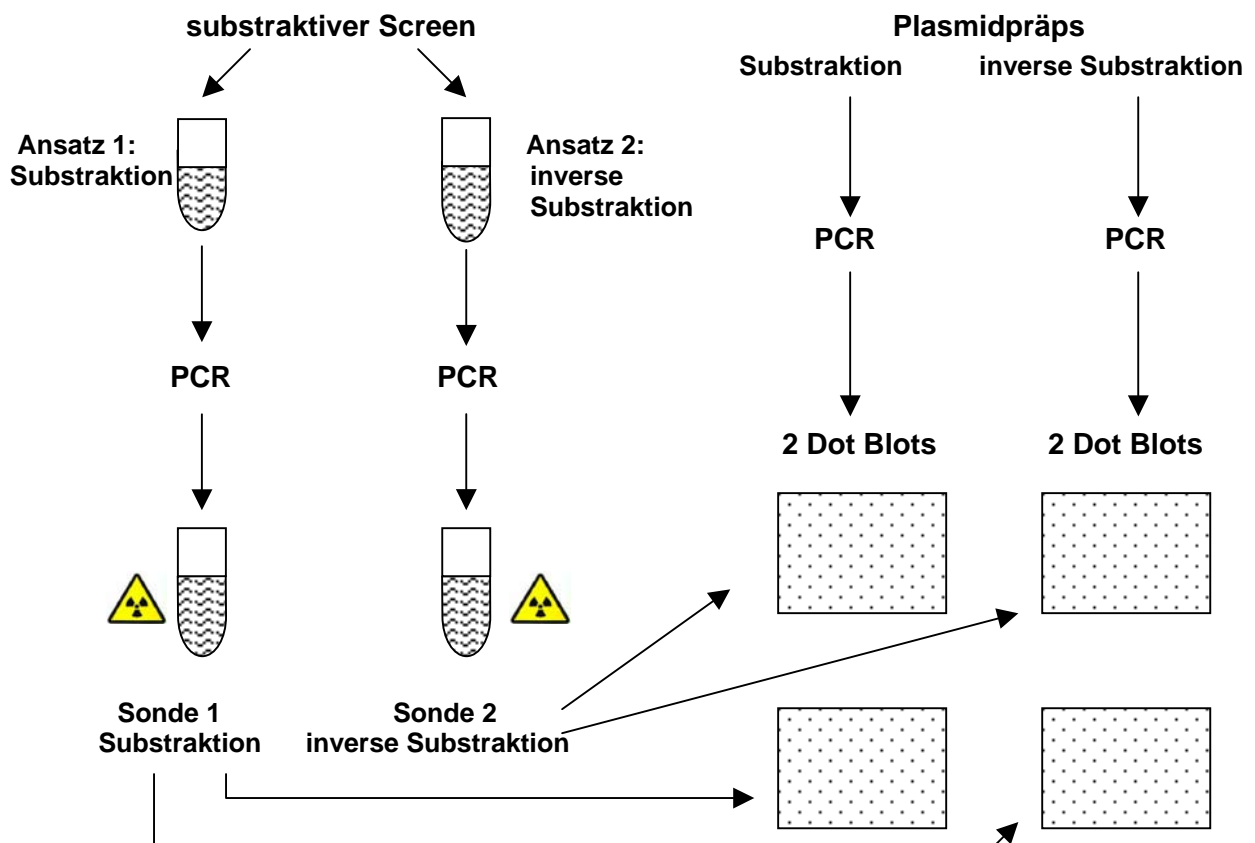


Abb.14: Schema der einzelnen Arbeitsschritte zur Herstellung radioaktiv markierter Sonden und der anschließenden Identifizierung unterschiedlich exprimierter Klone mit Hilfe der Hybridisierung.

4.3.22.2.5 Radioaktive Hybridisierung

Bei dieser Methode lagert sich die radioaktiv markierte Sonde an komplementäre DNA-Abschnitte der sich auf einer Nitrozellulosemembran befindlichen Proben. Mit einem Phosphoimager wird detektiert und dokumentiert wo die Sonde gebunden hat. Der Blot wird mit Prähybridisierungspuffer angefeuchtet und in einer Hybridisierungsröhre mit Prähybridisierungspuffer für 4 Stunden bei 65°C rollend inkubiert. Die zuvor radioaktiv markierte und denaturierte Sonde wird zum Prähybridisierungspuffer hinzugegeben. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 65°C im Hybridisierofen. Benutzte Sonden können bis zu 4 Wochen wieder verwendet werden, müssen aber vor Gebrauch durch aufkochen denaturiert werden. Es folgen mehrere Waschstschritte, jeweils 1 h bei 65°C. Die Waschlösungen werden auf ca. 65°C vorgewärmt.

1. 6x SSC; 0.1% SDS
2. 2x SSC; 0.1% SDS
3. 0.2x SSC; 0.1% SDS
4. 0.2x SSC; 0.1% SDS

Die gewaschene Nitrocellulose wird vorsichtig aus der Hybridisierungsröhre genommen mit Frischhaltefolie in einer Filmkassette eingepackt und eine Filmplatte damit belichtet. Nach einer Belichtungszeit, die je nach Intensität der radioaktiven Strahlung der Sonde zwischen 10 min und mehreren Stunden liegen kann, wird die Filmplatte herausgenommen und im Phosphoimager eingescannt.

Die Filmplatten werden durch 20minütiges Belichten gelöscht und können somit mehrfach wiederverwendet werden.

5. Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der Morpholino-antisense-Oligonukleotide zum spezifischen knock-down von *Xwnt-2b*, *XTcf-4* und *XTcf-3*

Die Funktion von Genen im Laufe der Embryonalentwicklung zu analysieren und sie in bereits bestehende Netzwerke einzuordnen ist eine zentrale Aufgabe der Entwicklungsbiologie. Gängige Methoden der Funktionsanalyse sind die Überexpression oder das Ausschalten von Genen. Um Gene selektiv zu hemmen bedient man sich beispielsweise bei diploiden Säugetieren der knock-out-Methode. Bei einem tetraploiden Organismus mit langer Generationszeit wie *Xenopus laevis* müssen jedoch andere Wege gefunden werden. Dabei können dominant-negative Konstrukte eines Genes in den Organismus eingebracht werden, wobei es sich um nicht funktionsfähige Mutanten handelt, welche mit dem wildtyp-Protein beispielsweise in Konkurrenz um Interaktionspartner treten und damit dessen Funktion unterdrücken.

Eine weitere populäre Methode ist die Verwendung sogenannter Morpholino-antisense-Oligonukleotide (kurz: Morpholino). Diese Oligonukleotide enthalten analog zur DNA die vier Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin. Im Unterschied zu den Nucleinsäuren sind die Basen jedoch nicht über Zucker-Phosphat-Brücken, sondern über Morpholino-Phosphordiamidat-Brücken verknüpft. (Abb.15).

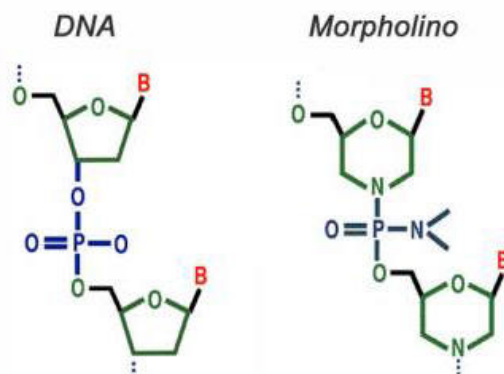


Abb.15: Morpholino-Oligonukleotide unterscheiden sich in der Struktur von DNA-Molekülen.

Wie DNA-Moleküle enthalten auch Morpholino-Moleküle die vier Basen (rot). Im Gegensatz zur DNA, bei der die Basen an Desoxyribose (grün) gebunden sind, nimmt im Morpholinomolekül ein sogenannter Morpholining (grün) die Position des Zuckers ein. Desoxyribose-Monomere sind in der DNA über Phosphatreste (blau) verknüpft, während die Morpholininge über Phosphordiamidat verbunden sind.

Im Vergleich zu RNA sind diese Moleküle sehr stabil und resistent gegen Nukleasen, weshalb Morpholinos über längere Zeit in der Zelle unbeschadet überdauern. Ihre Wirkung besteht darin über komplementäre Bindung an der mRNA des Zielgens die Translation in das entsprechende Protein zu unterbinden. In der Regel werden Morpholinos so konzipiert, dass sie in der Umgebung des, oder direkt am Startcodon binden und so die Bildung des Initiationskomplexes der Translation blockieren. Da es sich bei dieser Methode nicht um ein klassisches, komplettes Ausschalten des Gens auf Genomebene handelt, sondern „nur“ die Translation unterbunden wird, spricht man im Gegensatz zum knock-out, hier von einem knock-down. Bei den vier im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Morpholinos handelt es sich zum Einen um Xwnt-2b-Morpholino, welches das Startcodon ATG abdeckt und weitere 21 Basen in den 5'UTR hineinreicht. Zum Anderen wurden ein XTcf-4- und ein XTcf-3-Morpholino kreiert, die ebenfalls den Translationsstart abdecken, 6 Basen in den 5'UTR und 16 Basen in den Leserahmen reichen. Das als Negativkontrolle verwendete Kontroll-Morpholino zeigt zu keinem der drei Gene längere komplementäre Sequenzen.

5.1.1 Umklonierung von XTcf-3 in pCS2myc-Vektor

Bevor die endogene Funktion der Gene mittels Morpholino knock-down untersucht werden kann, müssen die Morpholinos charakterisiert und auf ihre Funktionalität und Spezifität hin untersucht werden. Dies sollte anhand der Unterdrückung der Translation eines exogenen Konstruktes getan werden. Dazu waren die drei in dieser Arbeit verwendeten Gene XTcf-3, XTcf-4 und Xwnt-2b als Konstrukte mit der 5' UTR-Bindesequenz für das jeweilige Morpholino und einem mittels Antikörperbindung detektierbaren Epitop notwendig. Um XTcf-3 mRNA in Embryonen injizieren und nach Extraktion im Western Blot mit einem myc-Antikörper nachweisen zu können wurde das Gen in den eukaryotischen Expressionsvektor pCS2myc umkloniert und das myc-Epitop damit an das C-terminale Ende von XTcf-3 platziert. Als Ausgangskonstrukt lag XTcf-3 mit N-terminalem myc-Epitop in einem pCS2-Vektor vor, aus dem es entfernt und in eine Cla-1-Schnittstelle in den pCS2myc-Vektor ligiert wurde (Abb.16).

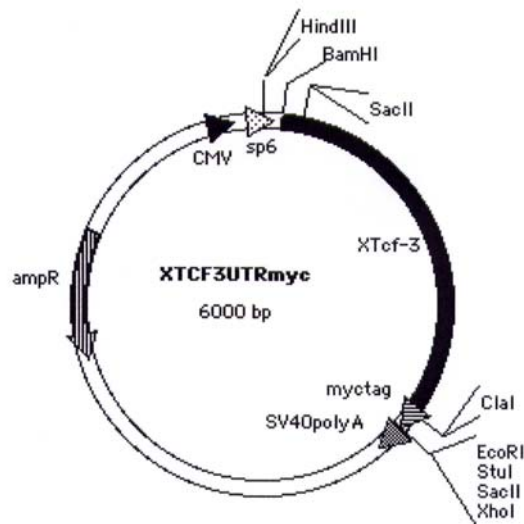


Abb.16: Plasmidkarte von XTcf-3UTRmyc. Das XTcf-3UTR-Fragment wurde in den mit Clal linearisierten Vektor pCS2myc kloniert.

Mittels gerichtetem SacII-Restriktionsverdau, der die erwarteten Fragmentgrößen von 4000 Basenpaaren und 2000 Basenpaaren ergab (Abb.17) und Sequenzierung wurde die richtige Orientierung des XTcf-3-Fragmentes im Vektor bestätigt.

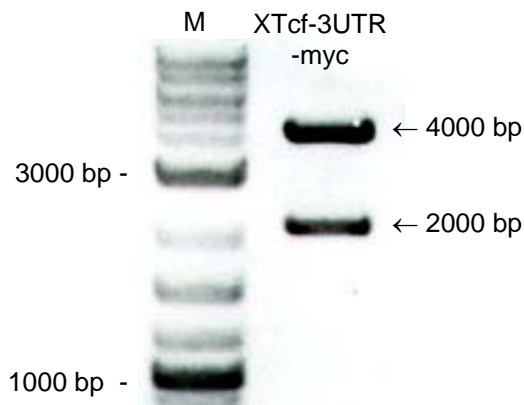


Abb.17: Gerichteter Restriktionsverdau von XTcf-3UTRmyc mit der Endonuklease SacII zur Kontrolle der Insert-Orientierung. Die Fragmentgrößen von 4000 bp und 2000 bp zeigen die richtige Orientierung des XTcf-3 Fragmentes im pcs2myc-Vektor. M: Marker

XTcf-4 wurde analog zu XTcf-3 mit einem C-terminalen myc-Epitop versehen.

Um die Spezifität des Xwnt-2b-Morpholinos zu überprüfen lag ein Fusionskonstrukt von Xwnt-2b und GFP im pcs2 Vektor vor (Kunz, M., 2002, Diplomarbeit).

Somit standen diese Konstrukte zur Verfügung, um die Funktionalität und Spezifität der Morpholinos zu kontrollieren.

5.1.2 Die Morpholino-Oligonukleotide unterdrücken spezifisch die Translation ihrer Zielgene

Im Western Blot wird deutlich, dass das exogene Xwnt-2b-EGFP nach Xwnt-2b-Morpholino (WMo)-Injektion, jedoch nicht nach Injektion des Kontroll-Morpholinos (KoMo) stark reduziert ist. Als Kontrolle für die eingesetzte Proteinmenge, diente der Nachweis des ubiquitär exprimierten Spliceosom-Assembly-Factors Gemin (Abb.18B).

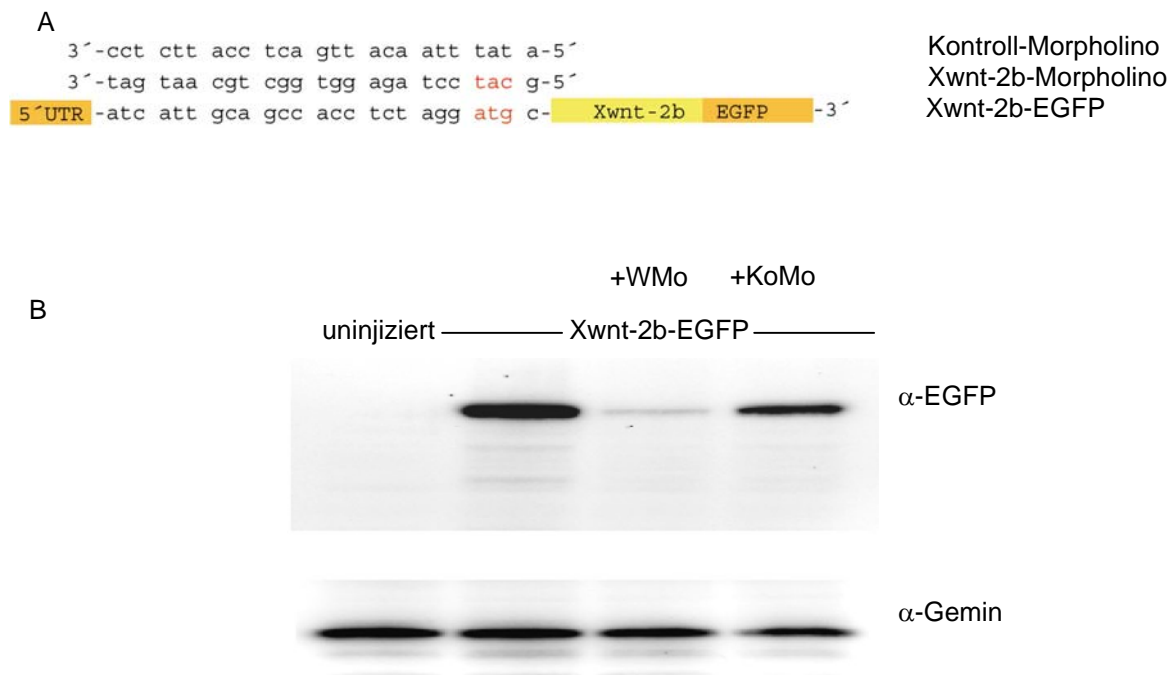


Abb.18: (A) Das Xwnt-2b-EGFP-Konstrukt besitzt den 5'UTR mit der Bindesequenz für das Xwnt-2b-Morpholino. Das Kontroll-Morpholino dagegen besitzt keine längeren Sequenzhomologien. **(B)** Western Blot Analyse zur Funktionalitätskontrolle des verwendeten Morpholinos. 100 pg cDNA eines Xwnt-2b-EGFP-Konstruktes wurden alleine oder in Kombination mit 10 pmol Xwnt-2b-Morpholino oder Kontroll-Morpholino in beide Blastomere zweizelliger *Xenopus*-Embryonen injiziert und diese bis Stadium 13 kultiviert. Nach Proteinextraktion wurde ein Embryonenäquivalent des NOP-Proteinlysates über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und das Fusionsprotein mit einem α-EGFP-Antikörper nachgewiesen. Das Xwnt-2b-Morpholino (Wmo) blockiert die Expression des exogenen Xwnt-2b-EGFP, während das Kontroll-Morpholino (KoMo) keine Repression herbeiführt. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge wurde Gemin nachgewiesen.

Auch bei XTcf-4 wurde die Translation der co-injizierten XTcf-4UTRmyc-DNA zum Protein vom XTcf-4-Morpholino komplett blockiert während das XTcf-3-Morpholino oder das Kontroll-Morpholino keinen Einfluss auf dessen Translation haben (Abb.19B).

Ergebnisse

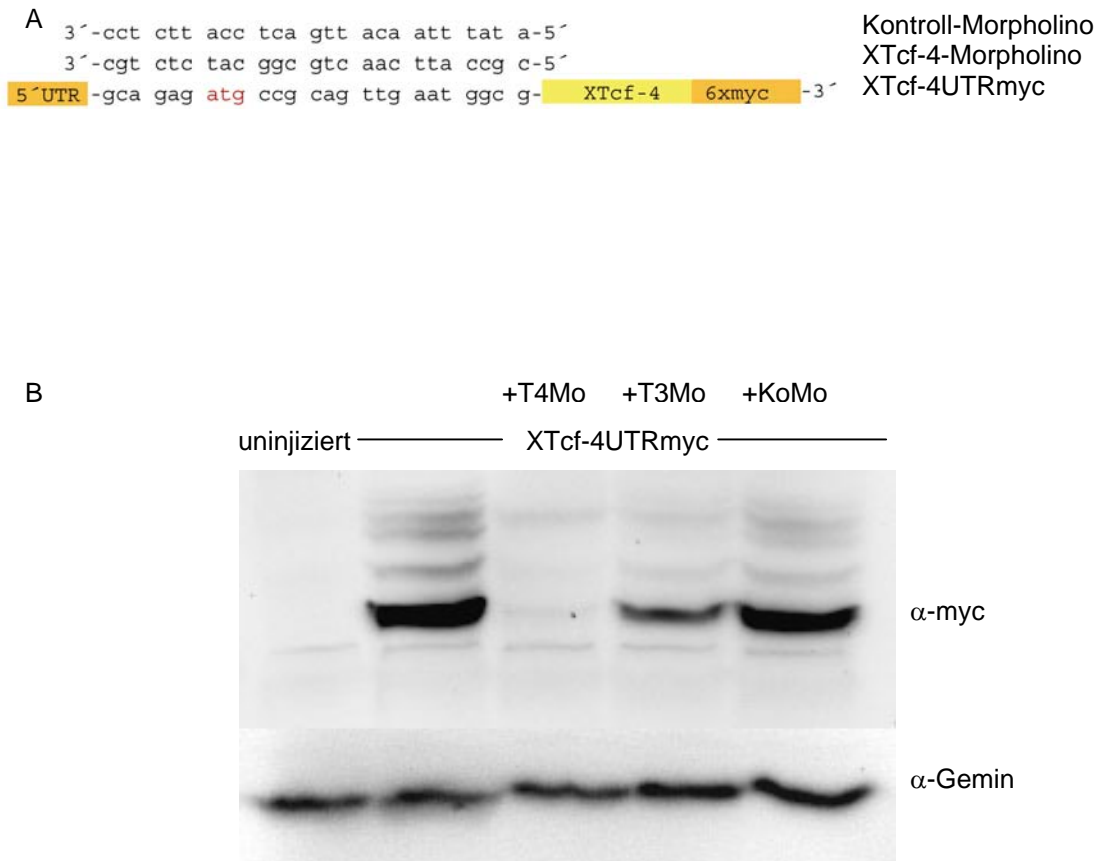


Abb.19: (A) Sequenzen des Kontroll-Morpholinos, XTcf-4-Morpholinos und dem XTcf-4UTRmyc Fusionskonstrukts im Vergleich. Das XTcf-4-Morpholino deckt den Translationsstart ab und bindet komplett an die XTcf-4UTRmyc mRNA. Das Kontroll-Morpholino besitzt keine Sequenzhomologien zu XTcf-4. **(B)** Das XTcf-4-Morpholino (T4Mo) blockiert die Expression von XTcf-4UTRmyc. Das XTcf-3-Morpholino (T3Mo) zeigt einen sehr schwachen, das Kontroll-Morpholino (KoMo) keinen Effekt auf die Expression des exogenen Fusionskonstruktes. 100 pg der cDNA eines XTcf-4UTRmyc-Konstruktes alleine und in Kombination mit je 10 pmol XTcf-4-Morpholino, XTcf-3-Morpholino oder einem Kontroll-Morpholino wurden in beide Blastomere zweizelliger Embryonen injiziert. NOP-Lysate entsprechend einem Embryonenäquivalent aus Stadium 13 Embryonen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Anschließend wurde das exogene Fusionsprotein XTcf-4UTRmyc mit dem α -myc-Antikörper 9E10 detektiert. Als Ladekontrolle wurde Gemin nachgewiesen.

Außerdem unterdrückt das XTcf4-Morpholinos die Translation des endogenen XTcf-4, wie an Transversalschnitten von Stadium 29 Embryonen bestätigt werden konnte (Kunz et al., 2004; Herrmann, M., 2003, Diplomarbeit).

Neben der spezifischen Funktionalität des XTcf-3-Morpholinos konnte im Western Blot nachgewiesen werden, dass das XTcf-4-Morpholino die Translation von XTcf-3 nicht beeinflusst. Das XTcf-3UTRmyc Protein wird von dem co-injizierten XTcf-3-Morpholino sehr stark reduziert. Das XTcf-4-Morpholino und das Kontroll-Morpholino blockieren dessen Translation nicht und das Protein kann im Western Blot unverändert stark detektiert werden (Abb.20).

Ergebnisse

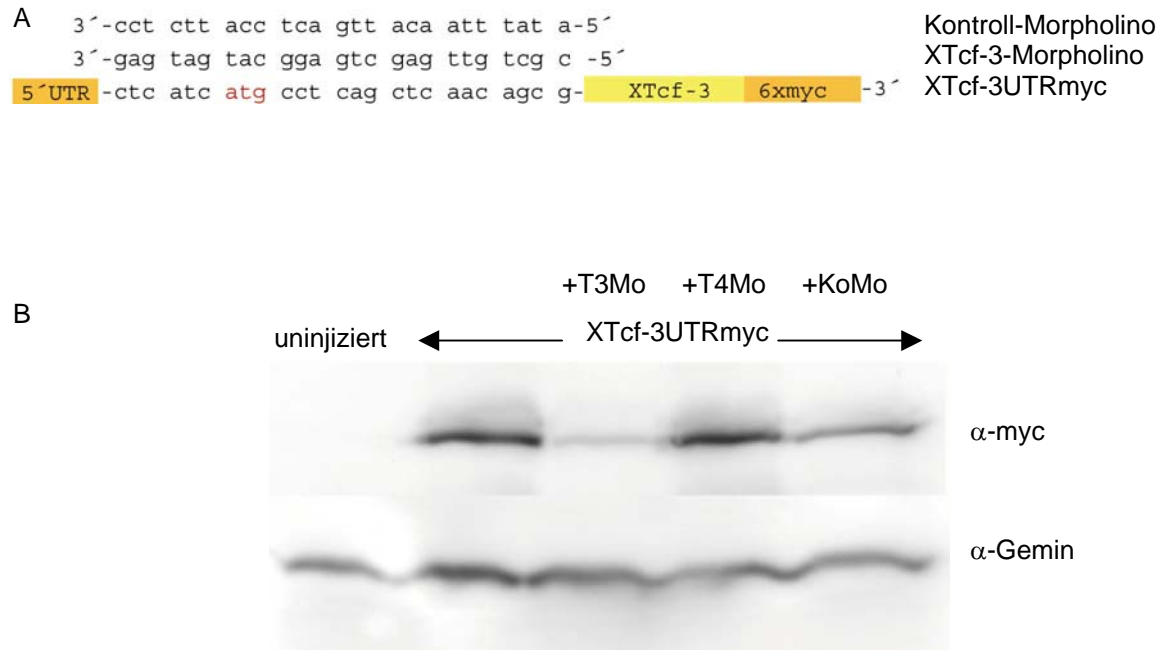


Abb.20: (A) Das XTcf-3-Morpholino deckt den Translationsstart ab und reicht sowohl in den 5'UTR als auch in den Leserahmen. Das Kontroll-Morpholino bindet nicht an die XTcf-3 mRNA. **(B)** Die Expression des exogenen XTcf-3UTRmyc-Konstruktes wird vom XTcf-3-Morpholino (T3Mo) blockiert. Nach Koinjektion mit XTcf-4-Morpholino (T4Mo) oder Kontroll-Morpholino (KoMo) bleibt die XTcf-3UTRmyc-Expression dagegen unverändert. Der Nachweis von Gemin dient als Ladekontrolle. Es wurden beide Blastomere von zweizelligen Embryonen mit 100pg mRNA eines XTcf-3UTRmyc Konstruktes alleine oder in Kombination mit je 10 pmol XTcf-3-Morpholino, XTcf-4-Morpholino oder Kontroll-Morpholino injiziert. Im Entwicklungsstadium 20 wurden die Embryonen lysiert und von diesem Lysat je ein Embryonenäquivalent über SDS-Page aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und das XTcf-3UTRmyc Protein mit einem α -myc Antikörper detektiert.

Mit den Morpholinos standen somit funktionelle und spezifisch wirkende Werkzeuge zur Verfügung, um die endogene Funktion von Xwnt-2b, XTcf-3 oder XTcf-4 zu untersuchen.

5.2 Xwnt-2b kontrolliert die XTcf-4 Expression

Da Xwnt-2b und XTcf-4 sowohl zeitlich (Abb.21) als auch räumlich (König et al., 2000) nahezu identisch exprimiert sind und einige Publikationen eine Regulation der Lef/Tcf Expression über die Wnt/ β -Catenin Signalkaskade belegen (Roose et al., 1999, Hovanes et al., 2001, Kratochwil et al., 2002), lag die Vermutung nahe, dass XTcf-4 von der Wnt/ β -Catenin Signalkaskade, speziell über Xwnt-2b kontrolliert wird.

Ergebnisse

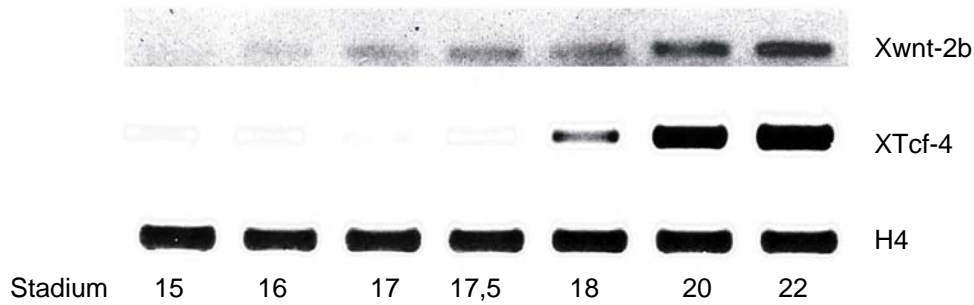


Abb.21: Xwnt-2b und XTcf-4 werden in der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* zeitlich sehr ähnlich exprimiert. Gezeigt ist eine RT-PCR verschiedener Entwicklungsstadien nach Nieuwkoop und Faber (1967). Aus jeweils 5 Embryonen wurde die RNA extrahiert, diese mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und die jeweiligen Gene mit den spezifischen Primern mittels PCR amplifiziert. Die Amplifikation des Haushaltsgens H4 zeigt, dass die in die RT-PCR eingesetzten RNA-Mengen gleich sind.

Als Konsequenz der von dem Morpholino induzierten Unterdrückung der Xwnt-2b Translation war bei *Xenopus* Embryonen im Schwanzknospenstadium die Expression von XTcf-4 und En-2, einem Markergen der Mittelhirn/Hinterhirn-Grenze deutlich reduziert (Abb.22, Pfeile). Diese Reduktion geht aber nicht mit einem allgemeinen Verlust von Mittelhirnstrukturen einher, da andere Markergene des Mesencephalon wie Otx-2 und Pax-6 nicht beeinträchtigt werden (Abb.22).

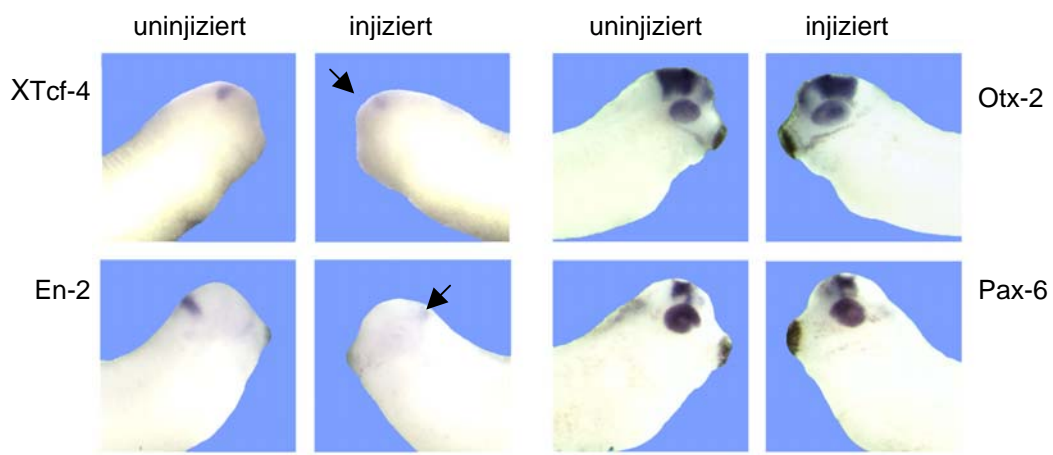


Abb.22: *In situ*-Hybridisierung an Embryonen im Stadium 30 zeigt die Reduktion der XTcf-4- und En-2-Expression als Folge der Xwnt-2b-Morpholino-Injektion (Pfeile), während die Otx-2- und Pax-6-Expression unverändert bleibt. Es wurden jeweils 10 pmol Xwnt-2b-Morpholino zusammen mit 100 pg myc-markierter EGFP mRNA in eine Blastomere zweizelliger Embryonen injiziert. Nach rechtsseitig- und linksseitig injiziert wurden die Embryonen anhand des grün fluoreszierenden Proteins im späten Neurulastadium sortiert.

Somit führt die Unterdrückung der Xwnt-2b-Translation spezifisch zum Ausfall einzelner Markergene. Interessanterweise gehört XTcf-4 auch dazu. Dabei war die

Reduktion nicht auf die mRNA beschränkt, konsequenterweise ging auch die Proteinmenge von XTcf-4 im dorsalen Mittelhirn zurück (Abb.23).

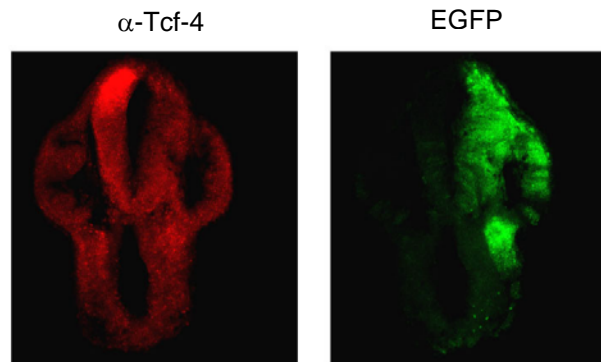


Abb.23: Die Injektion des Xwnt-2b-Morpholinos blockiert die XTcf-4 Expression im Mittelhirn. Gezeigt ist eine XTcf-4- und myc Doppel-Immunfärbung eines 50 µm Transversalschnittes der Mittelhirnregion des Schwanzknospenstadiums. Die injizierte Seite wird mit einer Antikörperfärbung gegen das myc-Epitop des koinjizierten EGFP-myc Konstrukts visualisiert.

Diese Ergebnisse belegen deutlich, dass die XTcf-4 Expression unter der Kontrolle von Xwnt-2b steht.

5.3 Die Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade reguliert die XTcf-4-Expression

Die Regulation der XTcf-4 Expression durch Xwnt-2b lässt mehrere Erklärungsmöglichkeiten zu: 1. XTcf-4 wird spezifisch von Xwnt-2b reguliert; 2. die Regulation erfolgt generell durch die kanonischen Wnt-Signalkaskade, wobei die Wnt-Liganden austauschbar sind, oder 3. XTcf-4 wird allgemein von Wnt-Liganden, auch solchen, die nicht-kanonische Wnt-Signalwege aktivieren, kontrolliert. Um zwischen diesen möglichen Regulationsmechanismen zu unterscheiden wurden je 100 pg Xwnt-2b-, Xwnt-8-, Xwnt-5A- oder Xwnt-11 cDNA unter der Kontrolle des eukaryotischen CMV-Promotors zusammen mit 10 pmol Xwnt-2b-Morpholino und 100 pg EGFPmyc-mRNA in eine Blastomere von zweizelligen Embryonen co-injiziert und im Schwanzknospenstadium auf die Expression von XTcf-4 hin untersucht. Dabei wurde deutlich, dass Xwnt-2b und Xwnt-8 als Induktoren des kanonischen Wnt-Signalweges in der Lage sind, die von dem Xwnt-2b-Morpholino knock-down ausgelöste Repression von XTcf-4 wieder völlig herzustellen. Im Gegensatz dazu sind Xwnt-5A als Induktor des Wnt/ Ca^{2+} - oder Wnt-5A-Signalweges und Xwnt-11 als Aktivator des PCP (planar cell polarity)-Signalweges nicht fähig den knock-down Phänotypen aufzuheben (Abb.24).

Ergebnisse

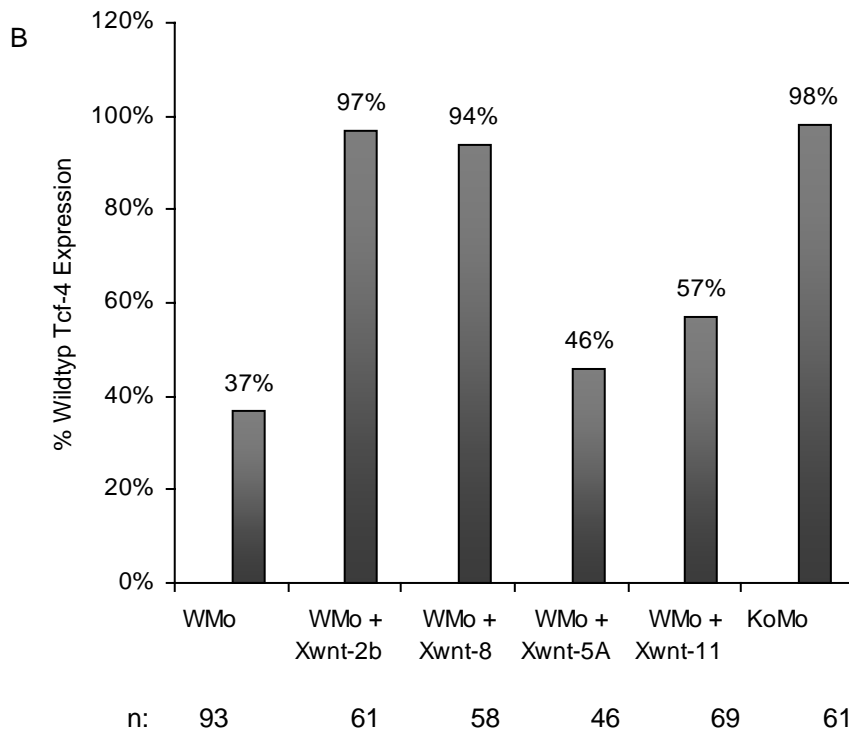
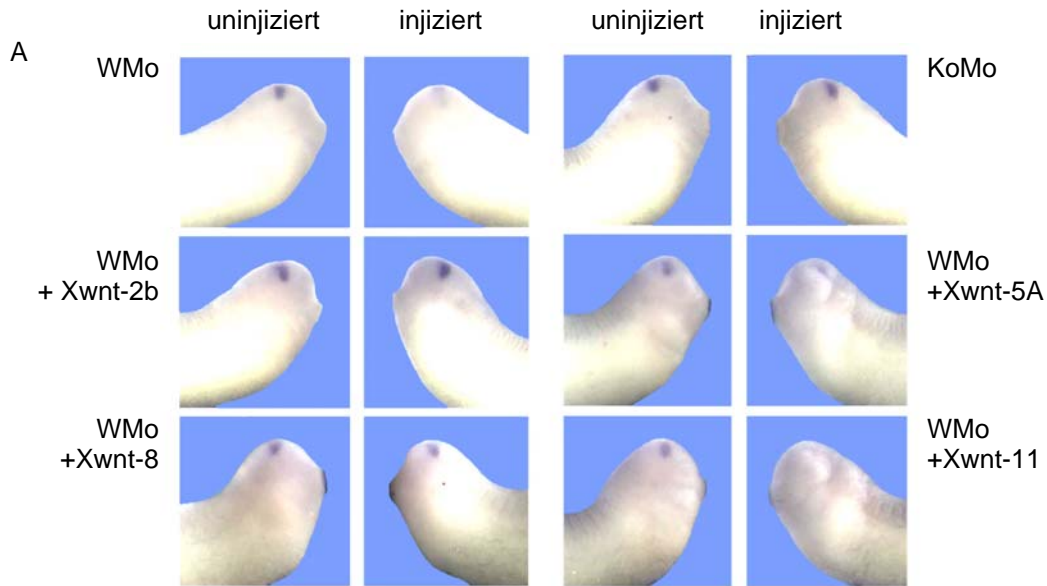


Abb.24: (A) XTcf-4 *in situ*-Hybridisierungen an Embryonen des Stadiums 30 zeigen, dass Xwnt-2b und Xwnt-8, jedoch nicht Xwnt-5A und Xwnt-11 in der Lage sind, die Expression von XTcf-4 in Xwnt-2b-Morpholino (WMo)-injizierten Embryonen wieder herzustellen. Das Kontroll-Morpholino (KoMo) zeigt keinen Effekt auf die Expression von XTcf-4. Embryonen im Zweizellstadium wurde in eine Blastomere je 100 pg Xwnt-2b-, Xwnt-8-, Xwnt-5A- oder Xwnt-11 cDNA zusammen mit 10 pmol Xwnt-2b-Morpholino und 100 pg EGFPmyc-mRNA injiziert. Die Embryonen wurden anschließend bis zum Stadium 30 kultiviert, anhand des GFP-Signals nach rechtsseitiger und linksseitiger Injektion sortiert, fixiert und einer *in situ*-Hybridisierung für XTcf-4 unterzogen. Zur Auswertung wurde die Färbung der injizierten Seite mit der Färbung der uninjizierten Seite des Embryos verglichen. **(B)** Statistische Auswertung der in A gezeigten Embryonen. Gegeben ist der Prozentsatz nicht reduzierter (Wildtyp) XTcf-4 Expression der injizierten Seite im Vergleich zur uninjizierten Kontrollseite. n gibt die Anzahl ausgewerteter Embryonen an.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Expression von XTcf-4 vom kanonischen Wnt-Signalweg aktiviert wird. Somit ist XTcf-4 sowohl Transkriptionsfaktor als auch Zielgen dieses Signalweges. Da XTcf-4 als einziges Lef/Tcf in dieser Region dominant exprimiert wird, liegt die Vermutung nahe, dass die Regulation von XTcf-4 über eine autoregulatorische Schleife erfolgt und XTcf-4 seine eigene Expression kontrolliert.

5.4 XTcf-4 ist wichtig für die Entwicklung des Mittelhirnes

Nachdem XTcf-4 als Zielgen des kanonischen Wnt-Signalweges identifiziert war, sollte im nächsten Schritt die endogene Funktion dieses Transkriptionsfaktors in der Entwicklung des embryonalen Gehirnes von *Xenopus laevis* untersucht werden. Dazu wurde die Translation von XTcf-4 mittels einem Morpholino knock-down unterdrückt.

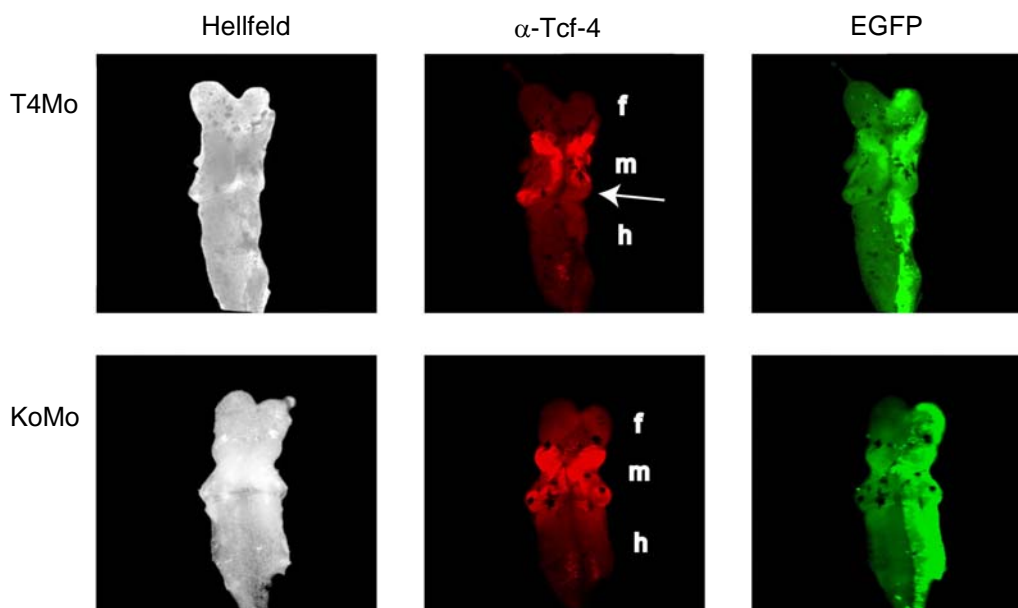


Abb.25: Das XTcf-4 Protein erscheint, nachdem es in früheren Stadien aufgrund der Morpholino-Injektion verschwunden war (Kunz et al., 2004; M. Herrmann, Diplomarbeit), im Gehirn später Schwanzknospenstadien wieder. Morphologische Veränderungen im posterioren Mittelhirn und am Isthmus bleiben jedoch bestehen (Pfeil). Es wurden Gehirne von Embryonen im Stadium 50 (Nieuwkoop und Faber, 1967) explantiert, welchen im Zweizellstadium jeweils 10 pmol XTcf-4-Morpholino (T4Mo) oder Kontroll-Morpholino (KoMo) zusammen mit 100 pg EGFPmyc mRNA in eine Blastomere injiziert wurde. Diese Gehirne wurden mit einem α -Tcf-3/4 Antikörper inkubiert und dieser mit einem Cy3-gekoppelten Ziege-Anti-Maus Antikörper visualisiert. Das grün fluoreszierende Protein markiert die injizierte Seite. f: Vorderhirn, m: Mittelhirn, h: Hinterhirn

Überraschenderweise wird XTcf-4 in diesen späten Stadien trotz XTcf-4-Morpholino Injektion wieder exprimiert. Es bleibt jedoch hauptsächlich im posterioren Teil des Mesencephalon reduziert (Abb.25, Pfeil). Doch trotz des erneuten Auftretens (Abb.25) von XTcf-4 bleiben Deformationen im Mesencephalon bestehen. Diese sind dabei auf den posterioren Teil des Mesencephalon beschränkt. Während das Mittelhirn von Kontroll-Morpholino-injizierten Embryonen in Kaulquappenstadien von dorsal betrachtet die Form eines X darstellt, scheint im XTcf-4-Morpholino injizierten Gehirn der posteriore „Schenkel“ nicht ausgebildet und das Mittelhirn nimmt deshalb eher die Form eines Y an (Abb.25, Pfeil).

5.4.1 Der XTcf-4 knock-down führt zum Verlust von neuralem Gewebe im dorsalen Mittelhirn

Nach einseitigem XTcf-4-Morpholino knock-down sind zahlreiche im Mittelhirn exprimierte Gene, wie Pax-6, Otx-2, En-2, Fgf-8 und Wnt-1 komplett verschwunden oder stark in ihrer Expression reduziert, während die Expression von Markergenen aus dem Vorderhirn (Bf-1) und dem Hinterhirn (Krox-2) von dem XTcf-4-Morpholino nicht beeinflusst waren (Kunz et al., 2004; M. Herrmann, Diplomarbeit).

Diese Daten lassen zweierlei Interpretationsmöglichkeiten zu. Entweder wurde als Folge der Unterdrückung von XTcf-4 das Mittelhirn so stark geschädigt, dass allgemein neurale Strukturen fehlen, oder die Unterdrückung wirkte spezifisch auf regionalisierte Markergene, ohne das allgemeine Neuralschicksal zu beeinflussen. Im ersten Fall sollte die Expression pan-neuraler Markergene stark unterdrückt werden, im zweiten Fall dagegen nicht. Immunfärbung transversaler Vibratomschnitte der Stärke 50 μm des pan-neuralen Markers NCAM machte deutlich, dass auf der XTcf-4-Morpholino injizierten Seite der Embryonen der dorsale Bereich des Mittelhirns stark reduziert ist oder komplett fehlt. Dabei wurde das Neuralgewebe jedoch nicht durch anderes Gewebe ersetzt, sondern die Dicke des dorsalen Mittelhirnes war an dieser Stelle reduziert. Mit dem Kontroll-Morpholino injizierte Embryonen zeigten diesen Phänotyp nicht, was beweist, dass der angesprochene Phänotyp spezifisch für das XTcf-4-Morpholino und kein genereller Effekt einer Morpholino-Injektion ist (Abb.26).

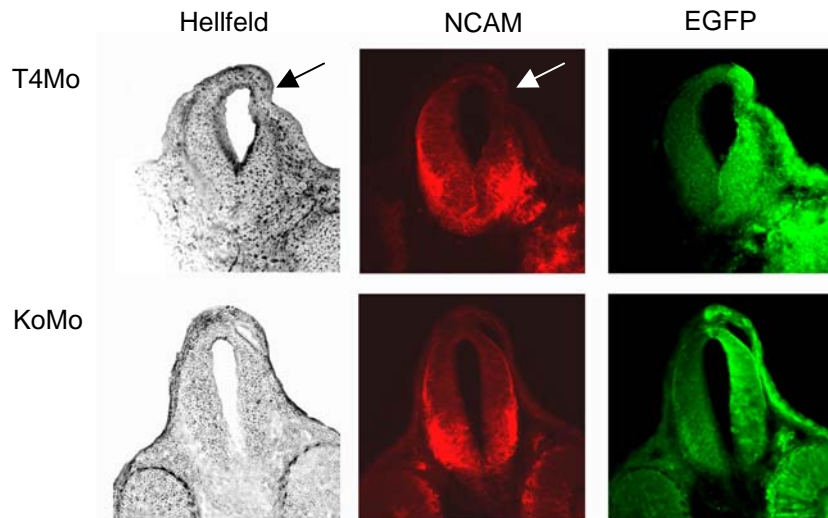


Abb.26: Immunfärbung von Transversalschnitten der Mittelhirnregion von XTcf-4-Morpholino- und Kontroll-Morpholino-injizierten Embryonen. Die Injektion des XTcf-4-Morpholino (T4Mo) blockiert die Expression zum NCAM-Protein im dorsalen Mittelhirn (Pfeil). Kontroll-Morpholino (KoMo)-injizierte Embryonen zeigen den Wildtyp-Phänotypen. 10 pmol des XTcf-4-Morpholino oder 10 pmol des Kontroll-Morpholino wurden zusammen mit 100 pg myc-markierter EGFP-mRNA in eine Blastomere zweizelliger Embryonen injiziert. Mit Hilfe des grün fluoreszierenden Proteins wurden die Embryonen im späten Neurulastadium entsprechend der injizierten Seite sortiert und nach Erreichen des Schwanzknospenstadiums 30 fixiert. Die Embryonen wurden in Agarose gegossen und im Vibratom geschnitten. Das nach Koinjektion von EGFP-mRNA exprimierte grün fluoreszierende Protein markiert die injizierte Seite.

Wird in den oben genannten Gehirnschnitten der frühe pan-neurale Marker *nrp-1* mittels *in situ*-Hybridisierung detektiert, zeigt die Färbung, dass die Deckenplatte des Neuralrohres normal ausgebildet wird. Doch auch in diesen Schnitten ist eine deutliche Reduktion des dorsalen Neuralgewebes im Mittelhirn auffallend (Abb.27). In dem verbleibenden, reduzierten dorsalen Gewebe wird *nrp-1* exprimiert, während NCAM nicht mehr vorhanden ist. Dies lässt darauf schließen, dass es sich zwar um Neuralgewebe handelt, dieses jedoch nicht spezifiziert wird.

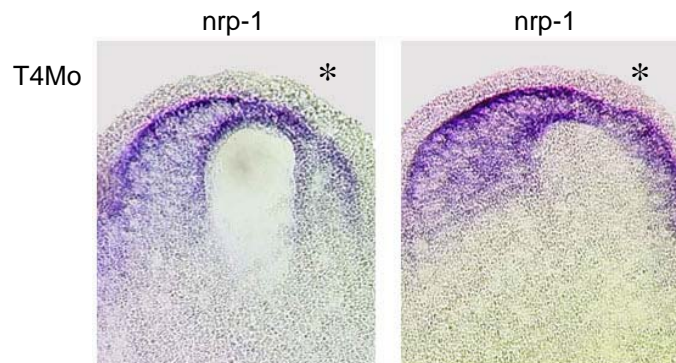


Abb.27: *nrp-1 in situ*-Hybridisierung an 50 µm dünnen Transversalschnitten der Mittelhirnregion von Embryonen im Stadium 30, welchen im Zweizellstadium einseitig XTcf-4-Morpholino injiziert wurde. *nrp-1* wird zwar auf der injizierten Seite (Stern) exprimiert, jedoch ist das dorsale Neuralgewebe auf dieser Seite deutlich dünner als auf der uninjizierten Seite.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass nach dem XTcf-4 knock-down im dorsalen Mittelhirn Neuralgewebe zwar induziert, jedoch im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen in diesem Bereich wesentlich weniger Neuralgewebe gebildet wird.

5.4.2 XTcf-4 reguliert die Zellproliferation im dorsalen Mittelhirn

Mögliche Ursachen für die Reduktion von Neuralgewebe im dorsalen Mittelhirn wären eine erhöhte Apoptose oder eine verminderte Zellproliferation. Da verschiedene andere Studien gezeigt haben, dass der kanonische Wnt-Signalweg die Zellproliferation beeinflusst (Boland et al., 2004; Yun et al., 2005; Lyu et al., 2005), wurde in den folgenden Experimenten die Zellproliferation im dorsalen Mittelhirn untersucht. Dazu wurde an einseitig mit XTcf-4-Morpholino injizierten Embryonen eine Immunfärbung des Zellproliferationsmarkers PhosphoH3 durchgeführt und anschließend von der Gehirnregion Transversalschnitte angefertigt. Der PhosphoH3-Antikörper bindet die phosphorylierte Form des Histon H3. Diese Phosphorylierung erfolgt in der Mitose-Phase von proliferierenden Zellen und wird von Wachstumsfaktoren ausgelöst. Nach Auszählen der PhosphoH3-positiven Zellkerne wurde deutlich, dass im Vergleich zur uninjizierten Seite auf der injizierten Seite die Anzahl an gefärbten Kernen speziell im dorsalen Mittelhirn, übereinstimmend mit der Expression von XTcf-4, die auf das dorsale Mesencephalon beschränkt ist, um nahezu 50% reduziert ist. Auf der ventralen Seite hingegen führt die Morpholino-Injektion zu keiner Veränderung in der Zellproliferation (Abb.28). Somit ist klar, dass die Morpholino-vermittelte Blockade der XTcf-4-Synthese in einer dramatisch verminderten Zellproliferation im Expressionsfeld von XTcf-4 resultiert.

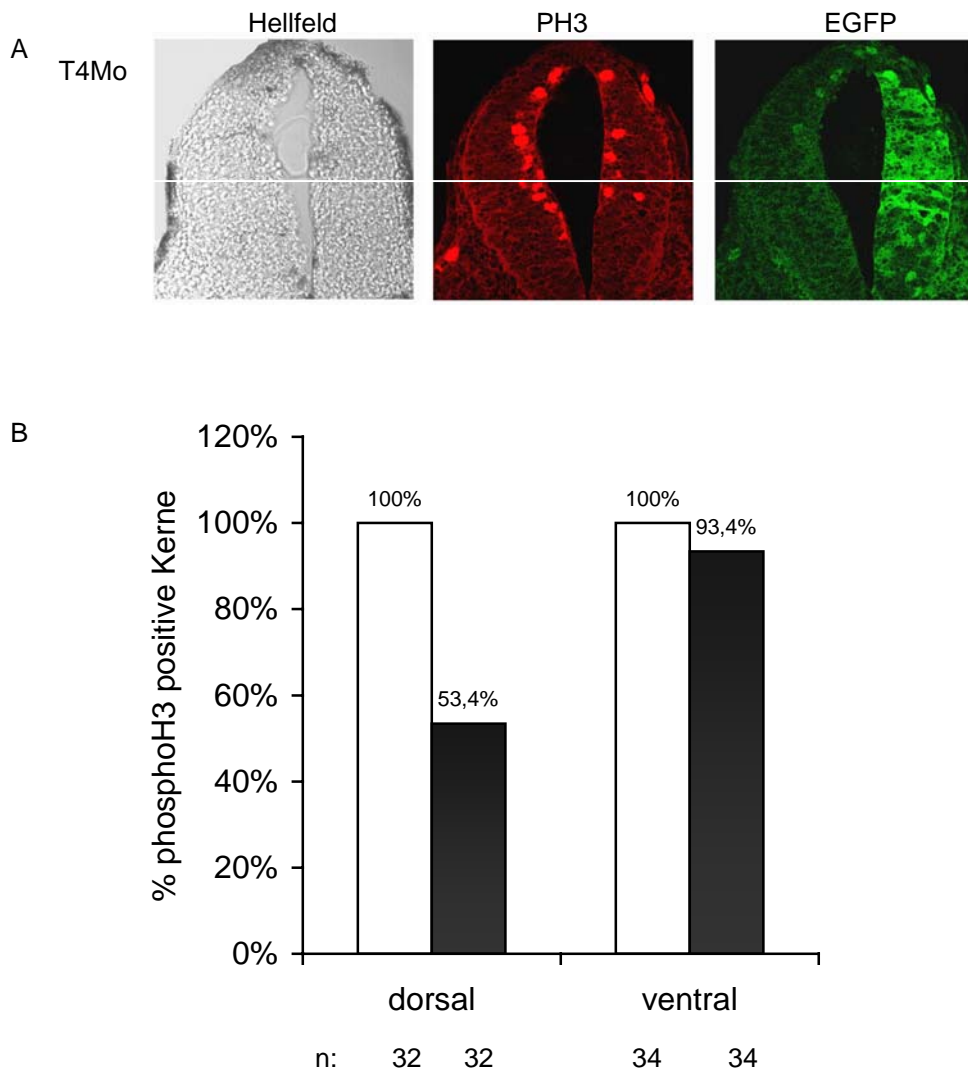


Abb.28: Die Reduktion von XTcf-4 blockiert die Zellproliferation im dorsalen Mittelhirn. **(A)** Einseitig XTcf-4-Morpholino injizierte Embryonen wurden im Stadium 25 einer PH3-Immunfärbung unterzogen, diese mit einem Cy-3 gekoppelten sekundären Antikörper sichtbar gemacht und die Embryonen danach transversal geschnitten. Die injizierte Seite wurde mittels einer anti-myc Färbung des koinjizierten GFPmyc markiert. Die weiß eingezeichnete Linie teilt das Gehirn in dorsal und ventral für die Auszählung in B. **(B)** Quantifizierung der PH3-positiven Zellkerne im Gehirn. Auf der injizierten Seite (schwarze Balken) ist die Zahl der proliferierenden Zellen im dorsalen Teil des Gehirns stark vermindert (53,4% +/- 4,0%). Im ventralen Teil dagegen bleibt die Zahl auch nach XTcf-4-Morpholino Injektion nahezu unverändert (93,4% +/- 6,5%). Die Zahl der PH-3-positiven Kerne der uninjizierten Seite (weiße Balken) wurden als 100% gesetzt. n gibt die Anzahl ausgewerteter Schnitte.

Im XTcf-4 knock-down Embryo wird die Reduktion der im Mittelhirn exprimierten Markergene (Kunz et al., 2004, Herrmann, M., 2003, Diplomarbeit) offensichtlich vom Verlust an dorsalem Neuralgewebe verursacht, wobei die Ursache dieses Gewebeverlustes in der verminderten Anzahl proliferierender Zellen liegt.

5.4.3 XTcf-4-Isoformen besitzen unterschiedliche Funktionen in der Entwicklung des Mittelhirns

Nach Injektion des XTcf-4-Morpholinos werden alle bekannten XTcf-4 Isoformen gleichermaßen unterdrückt, denn im 5'-Bereich um das Startcodon sind die Isoformen in ihrer Sequenz identisch. Da die funktional unterschiedlichen XTcf-4 Isoformen in der Ontogenese zeitlich verschieden exprimiert werden (Gradl et al., 2002) stellt sich die Frage nach der Funktion dieser Varianten in der Embryonalentwicklung. Um diese zu beantworten, wurden mit der Injektion des Morpholinos alle Isoformen unterdrückt und cDNA von XTcf-4A bzw. XTcf-4C koinjiziert. Sollten beide Isoformen in der Embryonalentwicklung redundant sein, so würde erwartet, dass sie gleichermaßen fähig sind, den von dem XTcf-4-Morpholino hervorgerufenen Phänotypen wieder aufzuheben. Folgende Parameter wurden analysiert: 1. NCAM-Expression in Transversalschnitten, 2. Dicke des dorsalen Mittelhirnes und 3. Expression regional exprimierter Markergene. Um die Reduktion der NCAM-Antikörperfärbung differenzierter auswerten zu können, wurde der Reduktionsgrad in folgende drei Kategorien aufgeteilt: nicht reduziert (0), reduziert (1) und stark reduziert (2) (Abb.29).

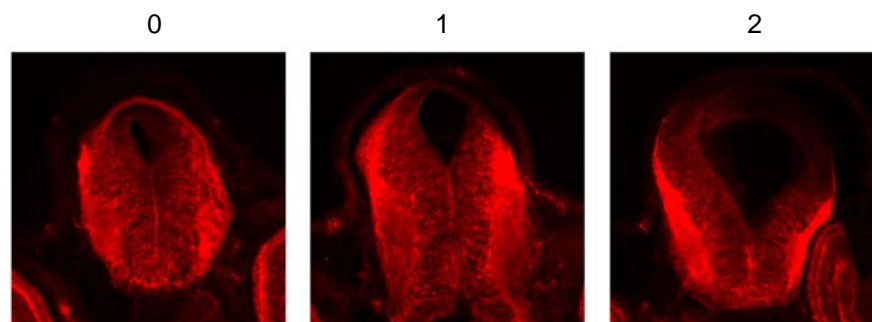


Abb.29: Immunhistologische NCAM-Färbung an Transversalschnitten der Gehirnregion von Embryonen im Stadium 30. Die Stärke der Ncam Reduktion wurde in drei Kategorien aufgeteilt: nicht reduziert (0), reduziert (1), stark reduziert (2).

Nach Auswertung von jeweils 47 bis 50 Transversalschnitten, zeigten sich tatsächlich Unterschiede zwischen den beiden Isoformen, in der Fähigkeit, den XTcf-4 knock-down-Phänotypen wieder aufzuheben. Obwohl XTcf-4A als auch XTcf-4C grundsätzlich in der Lage sind, die Reduktion der NCAM-Immunfärbung rückgängig zu machen, tun sie dies jedoch unterschiedlich stark. Dabei verschiebt die Co-Injektion mit XTcf-4A-cDNA das Spektrum der NCAM-Reduktionen weiter zur Kategorie 0 (nicht reduziert) von 0% in den knock-down-Embryonen auf 42,4%.

Ergebnisse

XTcf-4C ist nicht in der Lage, im gleichen Maße wie XTcf-4A, die NCAM-Reduktion rückgängig zu machen, weshalb der Prozentsatz an Kategorie 0 Embryonen nur bei 18% liegt und überwiegend Embryonen der Kategorie 1 (schwach reduziert) (66%) gezählt wurden. In beiden Fällen nimmt die Anzahl der nach dem knock-down noch mit 76,6% vertretenen stark reduzierten Phänotypen der Kategorie 2 sehr stark ab und macht nach Co-Injektion mit den XTcf-4 Isoformen nur noch 14,9% (Tcf-4A) bzw. 16% (Tcf-4C) aus (Abb.30).

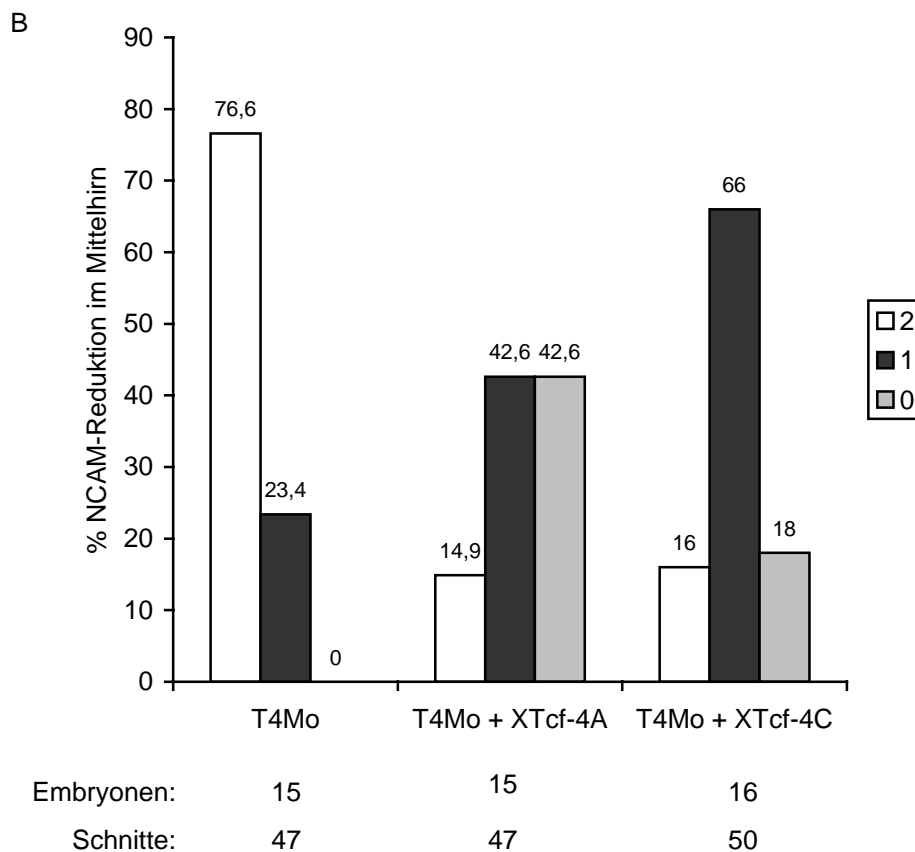
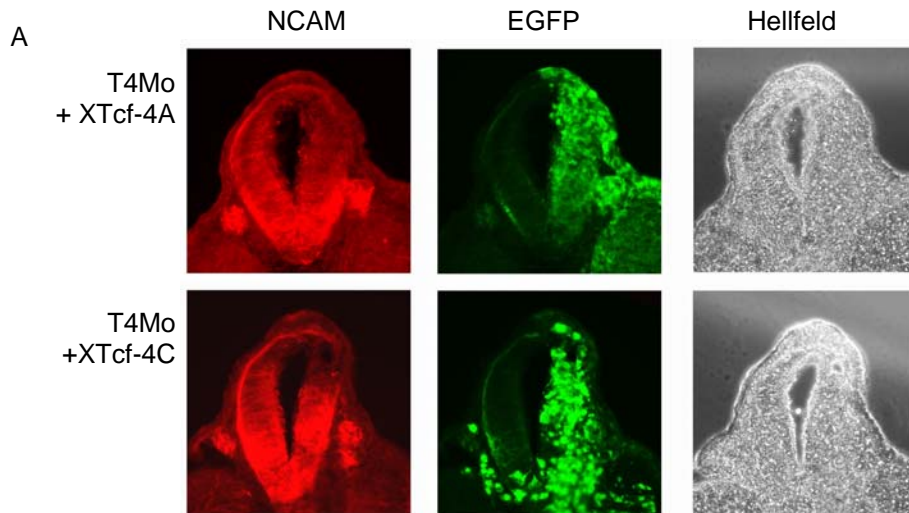


Abb.30 (S.84): Die Injektion der Isoformen XTcf-4A und XTcf-4C macht den XTcf-4 knock-down-Phänotyp verschieden stark rückgängig. **(A)** Immunhistologische Darstellung der NCAM-Expression von Transversalschnitten der Mittelhirnregion injizierter Embryonen im Stadium 30 (Nieuwkoop und Faber, 1967). Die Embryonen wurden im Zweizellstadium einseitig mit 10 pmol XTcf-4-Morpholino (T4Mo), 100 pg EGFP mRNA und 100 pg XTcf-4A- oder XTcf-4C cDNA injiziert. Das grün fluoreszierende Protein identifiziert die injizierte Seite des Embryos. **(B)** Quantifizierung der NCAM-Reduktion im Mittelhirn der injizierten Seite. Die Balken zeigen den jeweiligen Prozentsatz an Schnitten der verschiedenen Reduktionskategorien. 2: stark reduziert, 1: reduziert, 0: nicht reduziert.

Um den Effekt der beiden XTcf-4 Isoformen zu quantifizieren, wurde die Gewebedicke des dorsalen Mittelhirnes sowohl auf der injizierten als auch auf der uninjizierten Seite gemessen, und der Wert der injizierten Seite auf den Werten der uninjizierten Seite normiert (Abb.31A).

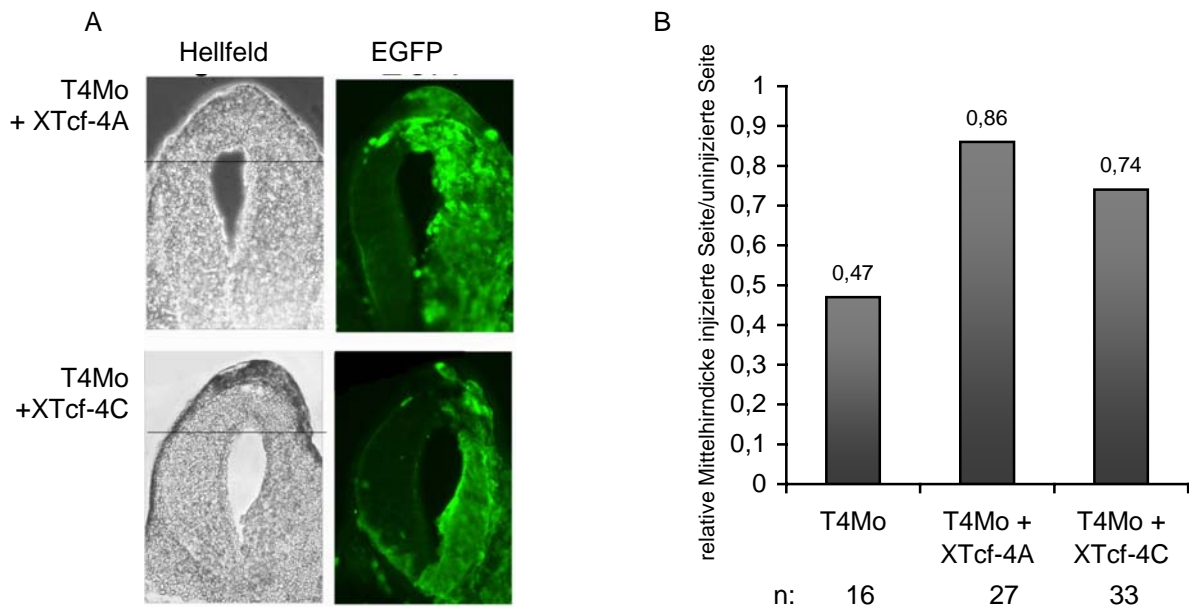


Abb.31: **(A)** Transversalschnitte der Gehirnregion injizierter Stadium 30 (Nieuwkoop und Faber, 1967) Embryonen. Injiziert wurden 10 pmol XTcf-4-Morpholino (T4Mo), 100 pg EGFP mRNA zusammen mit 100 pg XTcf-4A- oder XTcf-4C cDNA. Die eingezeichnete Linie markiert die Region an der die Dicke vermessen wurde. **(B)** Quantifizierung der dorsalen Mittelhirndicke. Dabei ist der Wert der injizierten Seite im Verhältnis zum Wert der uninjizierten Seite gegeben. n gibt die Zahl ausgewerteter Schnitte. Standardabweichungen: T4Mo: +/-0,02; T4Mo+XTcf-4A: +/-0,05; T4Mo+XTcf-4C: +/- 0,06.

Der so berechnete Koeffizient beschreibt damit den Grad der Reduktion. Bei einem Wert von 1 sind beide Seiten identisch. Die Ergebnisse des vorhergehenden Versuches wurden mit dieser Auswertung gestützt. In Embryonen, ausschließlich mit XTcf-4-Morpholino injiziert war das dorsale Mesencephalon auf der injizierten Seite nur noch halb so dick wie auf der uninjizierten Seite. Nach Koinjektion von XTcf-4A waren beide Gehirnhälften in ihrer Ausdehnung wieder nahezu gleich. Die XTcf-4C

Injektion führt auch wieder zu einer Zunahme der Dicke, jedoch in geringerem Maße als bei XTcf-4A (Abb.31B).

5.4.4 Die XTcf-4 Isoformen kontrollieren die Entwicklung unterschiedlicher Gehirnregionen

Da sich XTcf-4-A und XTcf-4C offensichtlich in ihrer Funktion in der Gehirnentwicklung unterscheiden, wurde der Frage nachgegangen, ob die Identität des wiederhergestellten neuralen Gewebes von der injizierten XTcf-4-Isoform abhängig ist. Einseitig mit XTcf-4-Morpholino und XTcf-4A- oder XTcf-4C cDNA koinjizierte Embryonen wurden einer Ganzkeimfärbung für verschiedene Gehirn-Markergene unterzogen. Dabei wurde in der Tat deutlich, dass XTcf-4A die Expression der spezifischen Mittelhirn-Markergene *Xwnt-2b* (Kunz et al., 2004; M. Herrmann, Diplomarbeit) und *Pax-6*, und XTcf-4C die Expression der drei spezifischen Isthmus-Markergene *Fgf8*, *En-2* und *Wnt-1* wiederherstellt (Abb.32A+B). Die Expression von *Xwnt-2b* und *Pax-6* wird von XTcf-4A (66,7% und 66,6%) deutlich besser wieder hergestellt als von XTcf-4C (43,6% und 53,1%). Dagegen wird die Expression der Markergene für den Isthmus *En-2*, *Fgf8* und *Wnt-1* nach einem XTcf-4 knock-down besser von XTcf-4C (46,6%, 72,2% und 52,5%) aktiviert als von XTcf-4A (34,4%, 47,4% und 26,3%). Im Falle von *Wnt-1* beschränkte sich die Reduktion ausgelöst vom XTcf-4-Morpholino hauptsächlich auf den am Isthmus lokalisierten posterioren Teil des Expressionsfeldes. Diese „Spange“ erscheint nach Koinjektion von XTcf-4C wieder (Abb.32A+B).

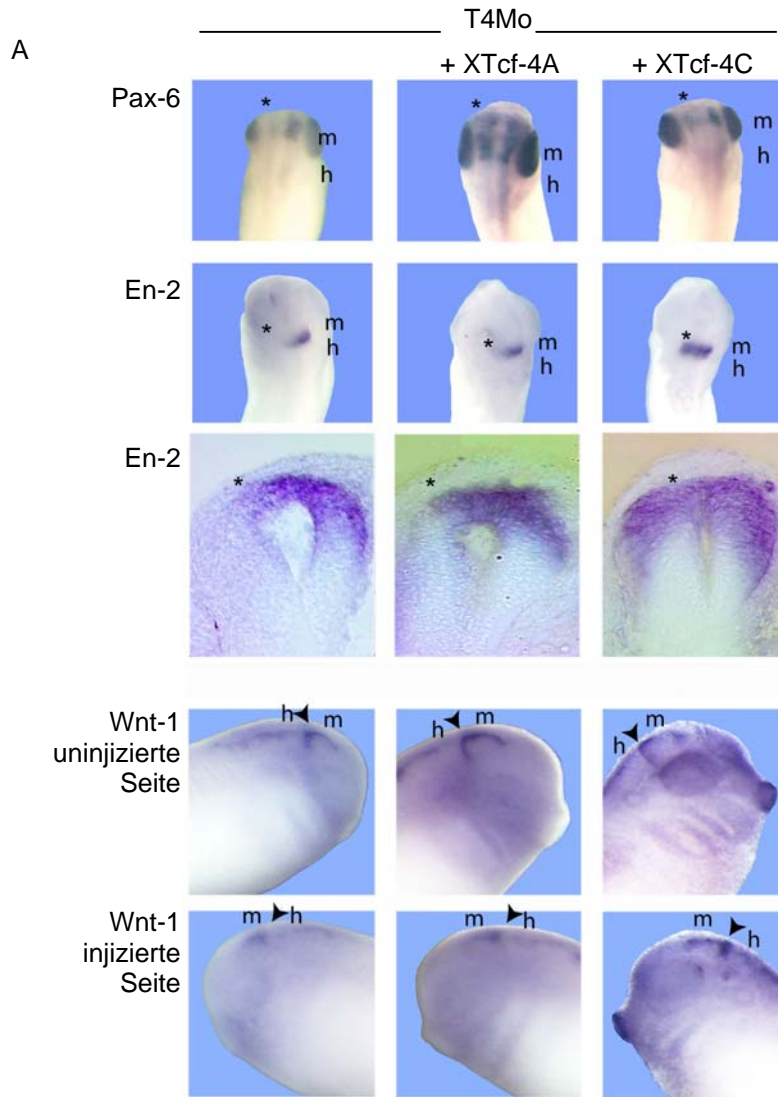


Abb.32: A) Analyse des Mittelhirn-spezifischen Markergens Pax-6 und der beiden Isthmus-spezifischen Markergene engrailed (En-2) und Wnt-1 mittels *in situ*-Hybridisierung. XTcf-4A, aber nicht XTcf-4C aktiviert bei Co-Injektion mit dem XTcf-4-Morpholino die Expression von Pax-6 im Mittelhirn wieder. XTcf-4C, aber nicht XTcf-4A stellt bei Co-Injektion mit XTcf-4-Morpholino (T4Mo) die Expression von En-2 und Wnt-1 an der Mittelhirn/Hinterhirn-Grenze wieder her. Transversalschnitte durch den Isthmus (Reihe 2) zeigen, dass die En-2 Expression in XTcf-4 knock-down Embryonen auf der injizierten Seite (Stern) von XTcf-4C, jedoch nicht von XTcf-4A wieder hergestellt wird. Der Verlust des Isthmus-spezifischen Teils des Expressionsfeldes von Wnt-1, ausgelöst vom XTcf-4-Morpholino wird von dem co-injizierten XTcf-4C, aber nicht von XTcf-4A wiederhergestellt. Zweizelligen Embryonen wurden 10 pmol XTcf-4-Morpholino (T4Mo), 100 pg EGFP mRNA in Kombination mit 100 pg XTcf-4A cDNA oder XTcf-4C cDNA in eine Blastomere injiziert. In späten Neurulastadien wurden die Embryonen anhand des grün fluoreszierenden Proteins entsprechend der injizierten Seite sortiert und der whole mount *in situ*-Hybridisierung zugeführt. m: Mittelhirn, h: Hinterhirn, * markiert die injizierte Seite.

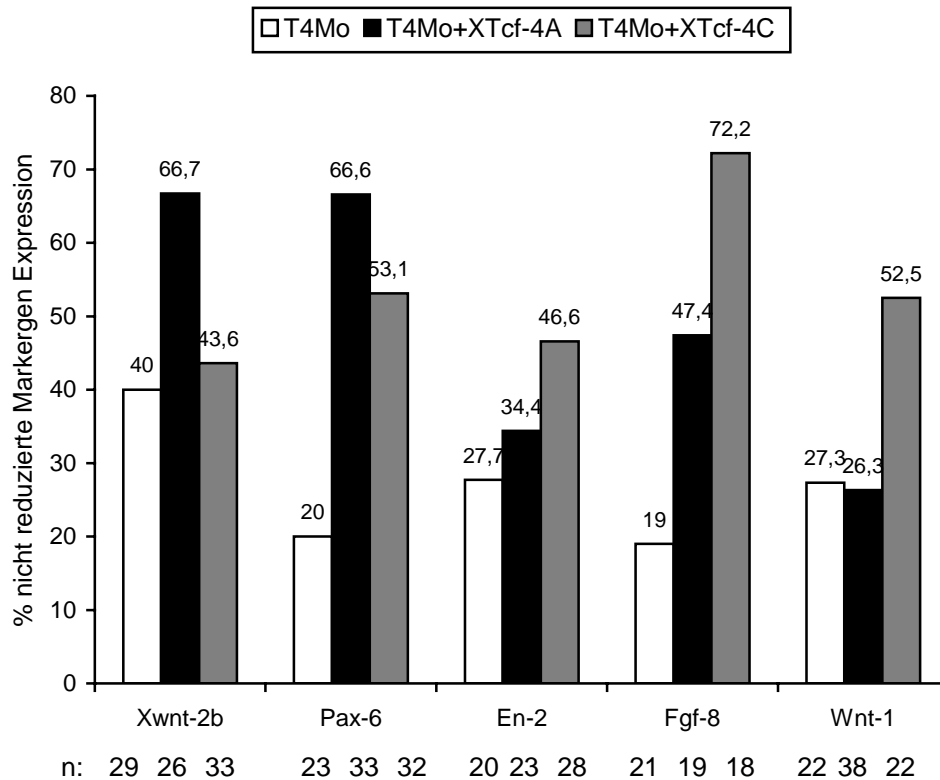


Abb.32: B) Quantifizierung der Fähigkeit der XTcf-4 Isoformen, die Expression von Xwnt-2b, Pax-6, En-2, Fgf-8 und Wnt-1 in XTcf-4 knock-out Embryonen wieder herzustellen. n gibt die Anzahl ausgewerteter Embryonen an.

Die beiden XTcf-4 Isoformen kontrollieren offensichtlich unterschiedliche Regionen im sich entwickelnden Gehirn von *Xenopus laevis*. XTcf-4A reguliert die Entwicklung dorsaler Bereiche des Mittelhirnes und XTcf-4C die Region um die Mittelhirn/Hinterhirn-Grenze am Isthmus-Organisator.

5.5 XTcf-4-Morpholino knock-down Embryonen zeigen ein abnormes Schwimmverhalten

Wie gezeigt, führt die Blockade der XTcf-4-Synthese während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* zu einer verringerten Zellproliferation und somit zum Verlust von dorsalen Mittelhirnstrukturen, wobei morphologische Deformationen vor allem in der Isthmusregion bis in die Kaulquappen-Stadien bestehen bleiben.

Überraschenderweise zeigen 78% der Tiere einen auffälligen Schwimm-Phänotyp. Dabei sind die Kaulquappen nicht in der Lage geradeaus zu schwimmen, sondern können nur im Kreis schwimmen. Nach mechanischer Reizung zeigen wildtyp-Embryonen normalerweise ein Fluchtverhalten, indem sie in eine Richtung davonschwimmen. Dazu sind die XTcf-4 knock-down Embryonen nicht in der Lage, sondern rotieren auf der Stelle (siehe Quick-Time Film auf Anhang-CD). Außerdem ist bei einem Teil der Tiere die anterior-posteriore Achse zur injizierten Seite hin gekrümmt.

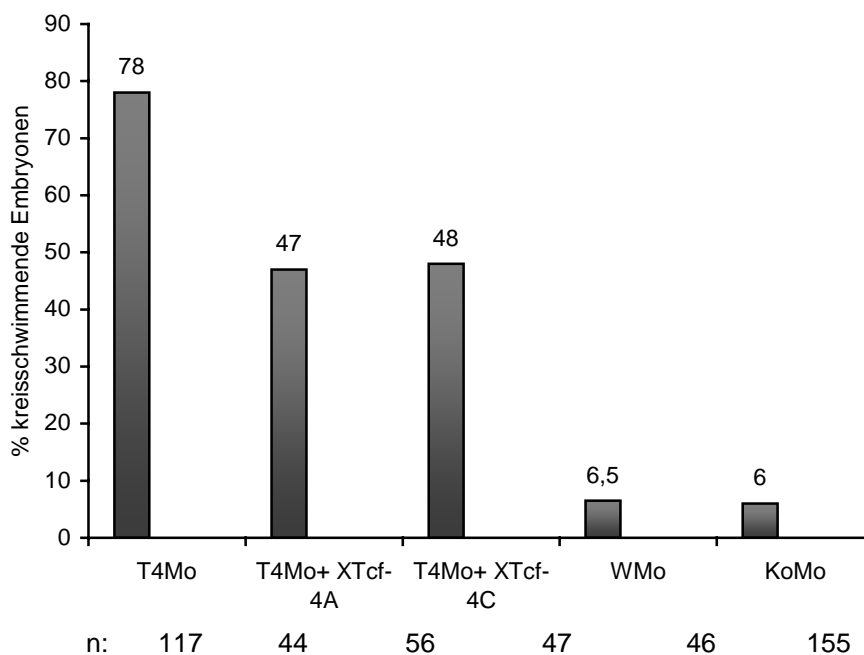


Abb.33: Quantifizierung des XTcf-4 knock-down Phänotyp „Kreisschwimmer“ im Stadium 40. Der Phänotyp kann durch Co-Injektion der XTcf-4 Isoformen teilweise rückgängig gemacht werden. Es wurden jeweils 100 pmol Morpholino zusammen mit 100 pg EGFPmRNA und 100 pg XTcf-4A-, oder XTcf-4C cDNA in eine Blastomere zweizelliger Embryonen injiziert. Der Phänotyp tritt nach XTcf-4-Morpholino (T4Mo)-Injektion bei 78% der Tiere auf, bei Xwnt-2b Morpholino (WMo)- und Kontroll-Morpholino (KoMo)-injizierten Embryonen zeigen nur ca. 6% der Embryonen diesen Phänotyp. n gibt die Anzahl der ausgewerteten Embryonen.

Beide XTcf-4 Isoformen sind in der Lage diesen Phänotyp rückgängig zu machen, was darauf schließen lässt, dass es sich bei diesem Phänotyp um einen spezifischen Effekt als Folge der Unterdrückung der XTcf-4 Translation handelt. Da bei Xwnt-2b-Morpholino-injizierten und bei Kontroll-Morpholino-injizierten Embryonen dieser Phänotyp nicht festgestellt werden konnte (Abb.33), scheint dieser spezifisch für den Verlust von XTcf-4 zu sein.

Da als Folge des XTcf-4 knock-down sowohl Defekte im Gehirn als auch eine Krümmung der Körperachse auftritt, kommen beide Faktoren als Ursache für den Schwimm-Phänotypen in Betracht.

5.6 Morphologische Ursachen des abnormen Schwimmverhaltens

5.6.1 Der XTcf-4 knock-down führt zu einer Reduktion der Ohrvesikel

Diese späten Phänotypen (Krümmung der Embryonen und Rotation) erinnern stark an die Phänotypen der Gravitationsdepletion, hervorgerufen von Schwerelosigkeit im Weltraum (Prof. Horn, persönliche Mitteilung). Als weitere Konsequenz der Schwerelosigkeit war der vestibuläre okulomotorische Reflex, ein „Gegenrollen“ der Augen bei einer Lageänderung des Kopfes, weniger stark ausgeprägt, was auf eine Störung des Gleichgewichtsorgans als Ursache für die Rotation hindeutet. Darum wurde der Frage nachgegangen, inwieweit der vestibuläre okulomotorische Reflex durch das XTcf-4-Morpholino reduziert war. Tatsächlich zeigten die XTcf-4-defizienten Embryonen einen reduzierten vestibulären okulomotorischen Reflex auf der injizierten Seite. Im Gegensatz zur Gravitationsdepletion, die zu einer transienten Störung führt, sollte die Depletion von XTcf-4 zu einer morphologischen Veränderung als Ursache für die Verhaltensauffälligkeit führen. In der Tat findet sich in Technovit eingegossenen und in 5 µm dünne Transversalschnitte geschnittenen Embryonen eine verringerte anterior-posteriore Ausdehnung des Ohrvesikels auf der XTcf-4-Morpholino injizierten Seite im Vergleich zur uninjizierten Kontrollseite. Außerdem waren die für den Gleichgewichtssinn benötigten Otolithen in Größe und Anzahl deutlich reduziert (Abb.34).

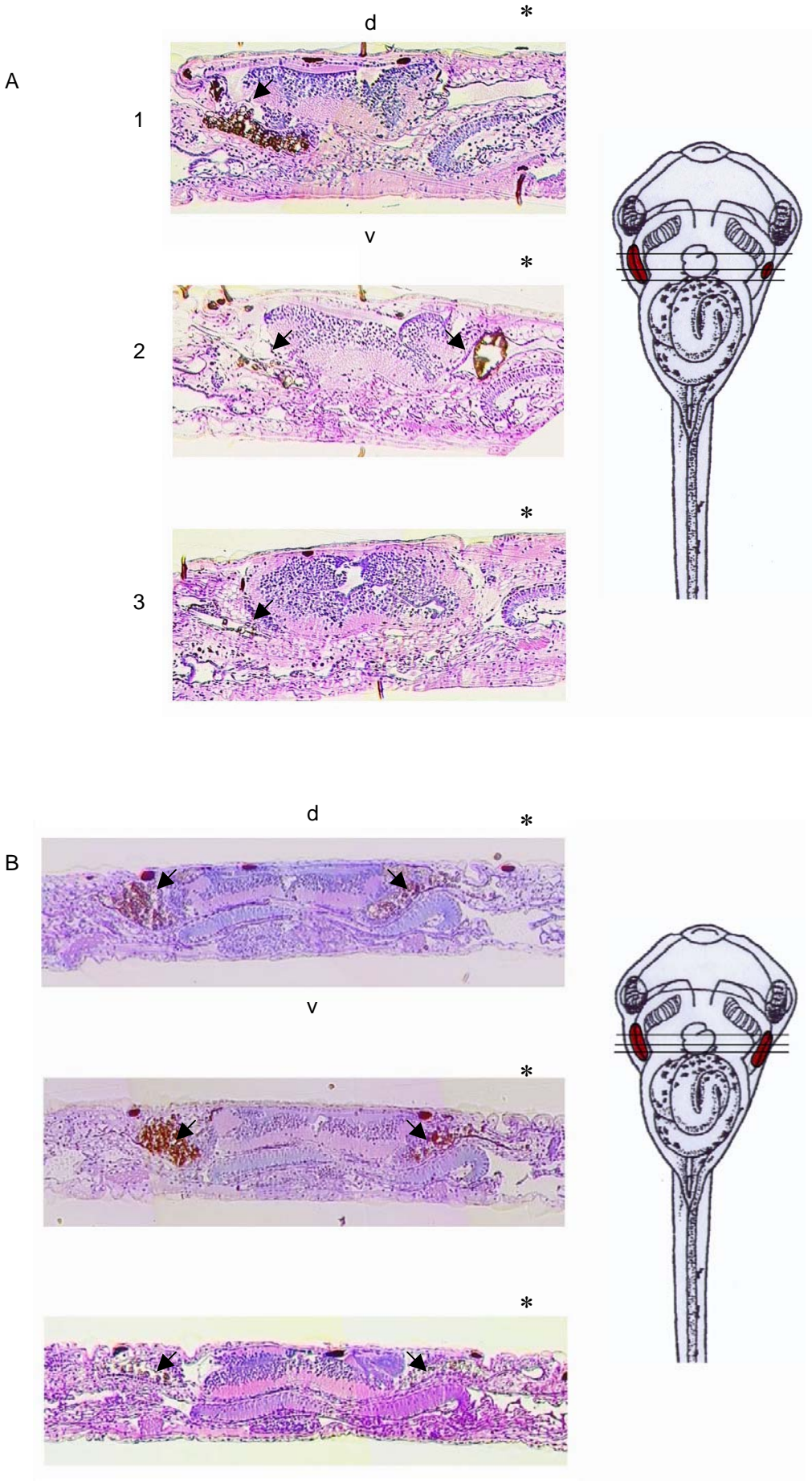


Abb.34 (S.91): Das Gleichgewichtsorgan im Ohrvesikel ist auf der XTcf-4-Morpholino injizierten Seite reduziert. Gezeigt sind aus einer Serie ausgewählte Schnitte, die das anteriore Ende, den mittleren Bereich und das posteriore Ende des durch die braun gefärbten Otolithen (Pfeile) sichtbare Gleichgewichtsorgan. **A)** In XTcf-4-Morpholino-injizierten Embryonen beginnt das Ohrvesikel auf der uninjizierten Seite (1) viele Schnitte bevor es auf der injizierten Seite auftaucht (2). Nach ca. 30 Schnitten verschwindet es auf der injizierten Seite wieder (3), während es auf der uninjizierten Seite weiter vorhanden ist und erst nach ca. 120 Schnitte später endet. **B)** Im Gegensatz dazu zeigen mit Kontroll-Morpholino injizierte Embryonen eine gleichmäßige Ausdehnung des Ohrvesikels über ca. 120 Schnitte. Im Zweizellstadium wurden 100 pg EGFP mRNA zusammen mit 10 pmol XTcf-4-Morpholino oder 10 pmol Kontroll-Morpholino in eine Blastomere injiziert. Im späten Neurulastadium wurden die Embryonen entsprechend der injizierten Seite sortiert und „Kreisschwimmer“ im Entwicklungsstadium 50 (Nieuwkoop und Faber, 1967) fixiert. Nach Anfertigung von μm Technovitschnitten der Kopfregion wurden diese einer Methylblau-Fuchsin-Färbung unterzogen. * markiert die injizierte Seite. d = dorsal, v = ventral. In den Zeichnungen rechts ist die Lage der Schnitte durch das Ohrvesikel mit dem Gleichgewichtsorgan (rot) eingezeichnet.

Die Ergebnisse aus der Messung des vestibulären okulomotorischen Reflexes und der morphologische Analyse des Innenohres legen die Vermutung nahe, dass die Fehlsteuerung des Schwimmverhaltens ursächlich in einer Missbildung des Gleichgewichtsorganes begründet liegt.

5.6.2 Der XTcf-4 knock-down resultiert in morphologischen Veränderungen der Somiten

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für das auffallende Schwimmverhalten einseitig Morpholino-injizierter Embryonen wäre, dass die Entwicklung der Rumpf- und Schwanzmuskulatur von dem XTcf-4 knock-down beeinträchtigt wird. Dies würde außerdem die Krümmung der Embryonen erklären. Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurden Horizontalschnitte von Embryonen im Entwicklungsstadium 38 angefertigt, und an diesen eine Antikörperfärbung für Aktin durchgeführt. Dabei sind die Segmente nicht mehr eindeutig voneinander getrennt, sondern einzelne Fasern scheinen Segmentgrenzen zu durchbrechen und insgesamt erscheint die Separierung der Segmente unvollständig (Abb.35).

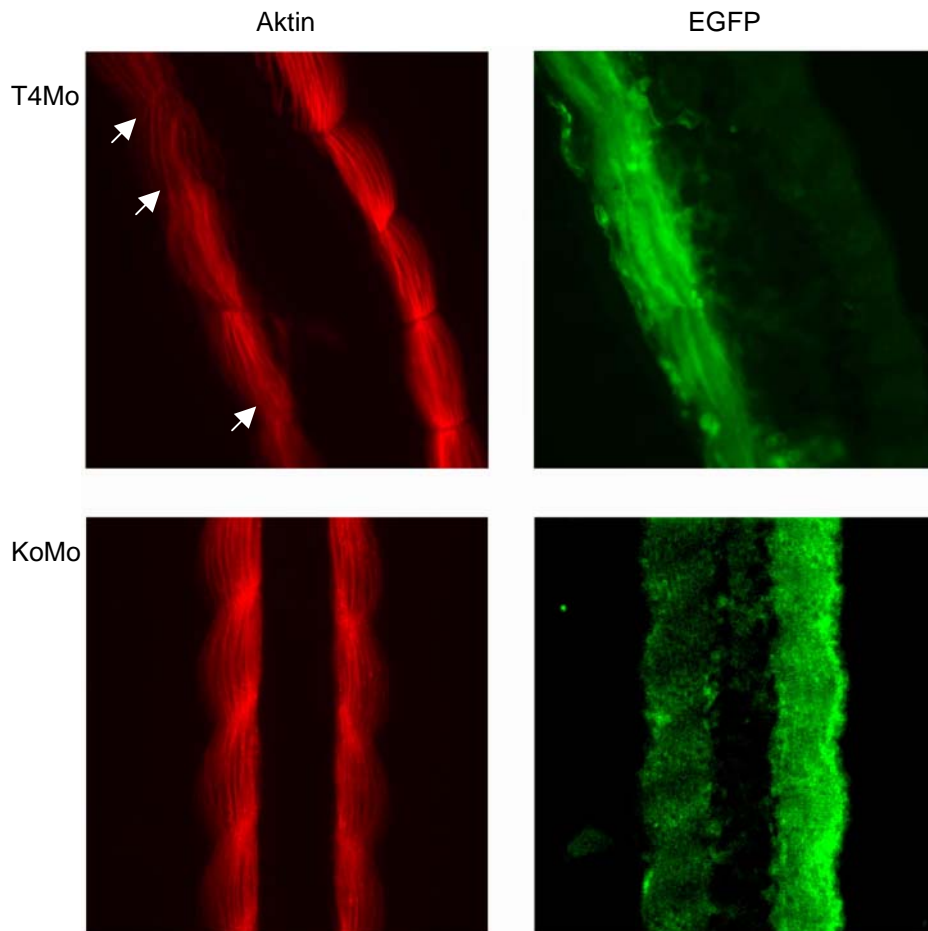


Abb.35: Aktin-Immunfärbung an Horizontalschnitten von einseitig XTcf-4-Morpholino (T4Mo) injizierten Embryonen im Entwicklungsstadium 38. Das co-injizierte EGFP markiert die injizierte Seite. Die Somitengrenzen auf der injizierten Seite sind teilweise aufgehoben und die Somiten weniger scharf voneinander getrennt (Pfeile). Nach Injektion des Kontroll-Morpholinos (KoMo) zeigt die Aktinfärbung keine Veränderungen in der Morphologie der Somiten.

Mit diesen Ergebnissen bestanden Hinweise, dass die Muskelentwicklung als Folge des XTcf-4 knock-down gestört ist, und der Schwimm-Phänotyp durch eine Kombination aus den Defekten im Gleichgewichtsorgan und in den Somiten hervorgerufen wird. Allerdings bestand ein Widerspruch zwischen den beobachteten Effekten in den Somiten und dem bislang bekannten Expressionsmuster von XTcf-4 an der Grenze von Vorder- zu Mittelhirn (König et al. 2000). Da XTcf-4 bisher nur mittels whole mount *in situ*-Hybridisierung detektiert und dabei keine Expression in den Somiten festgestellt wurde, bestand die Möglichkeit, das Protein mit einer immunhistochemischen Analyse in den Somiten zu identifizieren. Dazu wurde an 50 µm dicken Transversal- und Horizontalschnitten von

Embryonen im Stadium 38 eine Immunfärbung für XTcf-4 durchgeführt. In der Tat konnte das XTcf-4-Protein in den Somiten nachgewiesen werden. Dabei ist die Expression beschränkt auf die im Zentrum der Zellen liegenden Zellkerne (Abb.36). Es handelt sich dabei im Vergleich zu der Expression im Gehirn um eine relativ schwache Expression, was auch erklären könnte, dass diese Expression mit der *in situ*-Hybridisierung nicht detektiert wird.

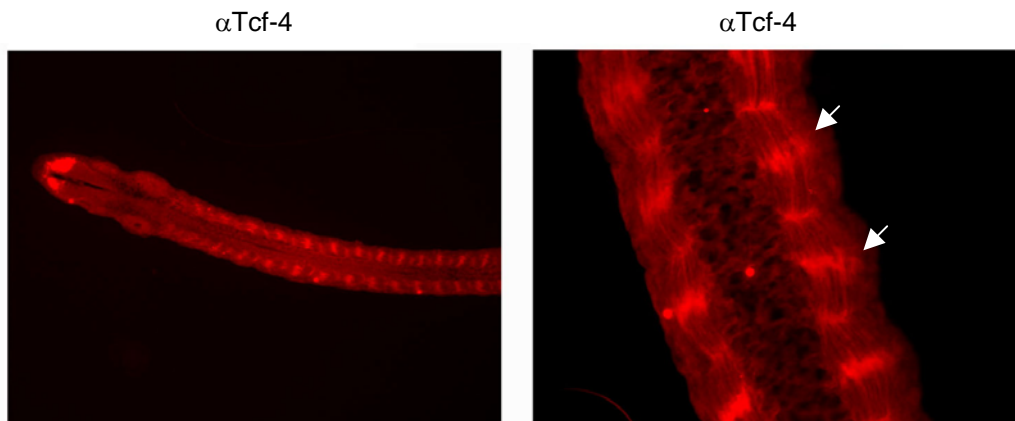


Abb.36: XTcf-4 Immunfärbung an horizontal geschnittenen Embryonen im Stadium 38. XTcf-4 wird im Gehirn (links oben) und auch in den Somiten detektiert. Die Expression ist dabei auf die Zellkerne im Zentrum der Somiten begrenzt (Pfeile). Die Färbung an den Somitengrenzen ist artefiziell.

Die Frage, ob der Phänotyp „Kreisschwimmer“ eine Folge der vom XTcf-4-Morpholino hervorgerufenen Biegung der Körperachse oder der Reduktion des sich entwickelnden Ohres ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Es scheint jedoch wahrscheinlich, dass das abnorme Schwimmverhalten aus der Kombination von beiden Effekten verursacht wird. Der molekularen Ursache des beobachteten Phänotyps sollte in zukünftigen Experimenten nachgegangen werden.

5.7 Identifizierung unterschiedlicher Zielgene von XTcf-3 und XTcf-4 mittels substraktiver suppressiver Hybridisierung

Nachdem XTcf-4 als Aktivator der Zellproliferation im dorsalen Mittelhirn identifiziert war, und die XTcf-4 Isoformen spezifische regionale Unterschiede in ihrer Funktion während der Entwicklung des Mittelhirnes zeigten, stellte sich die Frage nach Zielgenen, welche spezifisch von XTcf-4 reguliert werden. Für die Identifizierung von

Zielgenen ist die substraktive suppressive Hybridisierung (SSH) das Mittel der Wahl. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, zwei unterschiedliche cDNA-Populationen zu subtrahieren, wobei gemeinsam exprimierte Gene unterdrückt (suppressiv) und differenziell exprimierte Gene selektiv amplifiziert werden. Um zwei mRNA-Populationen voneinander subtrahieren zu können, müssen sie allerdings Unterschiede aufweisen. Aus diesem Grund wurde bei den Embryonen der einen Population die Synthese von XTcf-4 und folglich auch die seiner positiv regulierten Zielgene durch XTcf-4-Morpholino-Injektion blockiert. Da jedoch nur spezifische Zielgene von XTcf-4 interessant waren, und es sehr wahrscheinlich ist, dass sich XTcf-4 mit seinem nächsten Verwandten XTcf-3 bestimmte Zielgene teilt, wurde den Embryonen der Vergleichspopulation XTcf-3-Morpholino injiziert. Als glücklicher Nebeneffekt dieser Strategie würde man nach gegenseitiger Subtraktion neben den spezifischen XTcf-4-Zielgenen zusätzlich auch spezifische XTcf-3-Zielgene erhalten. Voraussetzung für diese Strategie ist aber, dass das XTcf-3-Morpholino die Translation von XTcf-4 nicht unterdrückt und umgekehrt. Für beide Morpholinos konnte dies bereits ausgeschlossen und die Spezifität sichergestellt werden (Abb.19 und 20).

5.7.1 Auswahl der RNA-Populationen für den substraktiven Screen

Für die Auswahl der RNA-Population ist es wichtig, dass in dem Gewebe sowohl XTcf-3 als auch XTcf-4 exprimiert sind. Dabei bieten die sogenannten animalen Kappen die Vorteile, dass sie als Folge der Neuralisierung beide Transkriptionsfaktoren exprimieren (Abb.37) und der Anteil an störendem Gewebe, das kein XTcf-3 und XTcf-4 exprimiert äußerst gering ist.

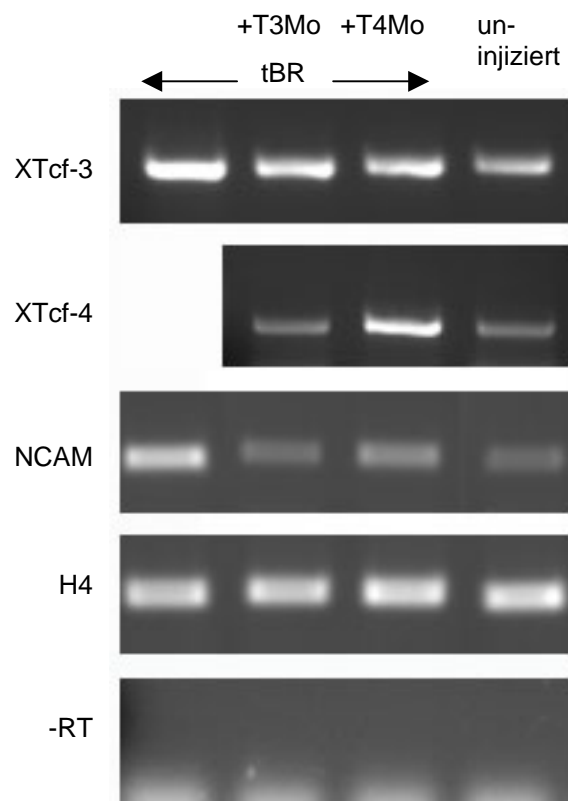


Abb.37: XTcf-3 und XTcf-4 werden in neuralisierten animalen Kappen exprimiert. RT-PCR von injizierten und uninjizierten animalen Kappen. Es wurden Embryonen im Zweizellstadium in den animalen Pol beider Blastomere je 100 pg tBR mRNA alleine oder in Kombination mit 100 pmol XTcf-3-Morpholino (T3Mo) oder XTcf-4-Morpholino (T4Mo) injiziert. Im Embryonalstadium 8 wurden die animalen Kappen geschnitten, bis Vergleichsembryonen Stadium 18 (Nieuwkoop und Faber, 1967) erreicht hatten kultiviert und dann die RNA extrahiert. Nach reverser Transkription wurden XTcf-3, XTcf-4, NCAM und H4 mittels PCR amplifiziert. NCAM zeigt eine erfolgreiche Neuralinduktion in den mit tBR injizierten Kappen. Die gleichmäßige Amplifikation des Haushaltsgens H4 deutet auf gleiche Mengen an eingesetzter RNA hin.

Bei der Animale Kappen-Methode macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass ektodermale Zellen aus dem Blastocoeldach von späten Blastulae als pluripotente Stammzellen durch Zugabe von neuralisierenden Faktoren in neurales Schicksal gelenkt werden können. Als neuralisierende Faktoren können u.a. die BMP-Antagonisten noggin, chordin und follistatin eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurde die mRNA eines dominant-negativen (trunkierten) BMP-Rezeptors (tBR) injiziert. (Abb.10).

Somit enthalten die XTcf-3-Morpholino injizierten Kappen die Gesamt-mRNA der Kappen einschließlich der von XTcf-4-Zielgenen, jedoch ohne XTcf-3-Zielgene. Die XTcf-4-Morpholino injizierten Explantate enthalten XTcf-3 Zielgene aber keine XTcf-4 Zielgene.

Im Vorfeld des substraktiven Screens wurde mit RT-PCR die Expression verschiedener im Gehirn exprimierter Gene mit der RNA von je 10 injizierten Kappen untersucht, um abzuklären ob Unterschiede zwischen XTcf-3-Morpholino injizierten- und XTcf-4 Morpholino injizierten Explantaten bestehen. Dabei wurden Unterschiede in der Expression von Xanf1 und Xanf2 (*Xenopus* anterior forebrain) festgestellt. Beide Gene sind in XTcf-4-Morpholino injizierten animalen Kappen hochreguliert während das XTcf-3-Morpholino keinen Effekt zu haben scheint (Abb.38).

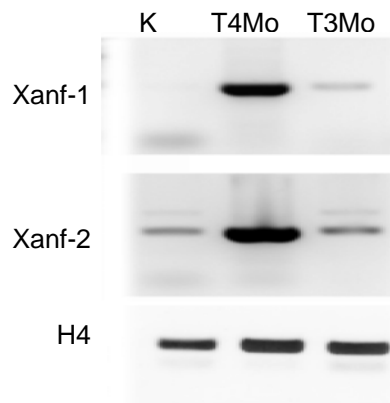


Abb.38: Expression der anterioren neuralen Markergene Xanf1 und Xanf2 in animalen Kappen XTcf-3-Morpholino (T3Mo)- oder XTcf-4-Morpholino (T4Mo) injizierter Embryonen. Nach XTcf-4-Morpholino-Injektion ist die Expression der beiden Gene Xanf-1 und Xanf-2 stark hochreguliert, wobei sie nach XTcf-3-Morpholino Injektion auf dem Niveau der uninjizierten Kontrollen (K) bleibt. Jeweils 15 zweizelligen Embryonen wurden 100 pg tBR mRNA in Kombination mit je 100 pmol XTcf-3- oder XTcf-4-Morpholino in den animalen Pol beider Blastomere injiziert. Im Stadium 8 wurden die animalen Kappen explantiert, bis zum Stadium 18 kultiviert und dann die RNA extrahiert. Nach reverser Transkription wurden Xanf-1, Xanf-2 und H4 mit den entsprechenden Primern amplifiziert.

Um am Ende die Gesamtmasse von 2 ng mRNA je Population zu erhalten mussten aufgrund der geringen Größe der Explantate jeweils 2000 XTcf-4-Morpholino- und XTcf-3-Morpholino injizierte Embryonen gesammelt werden. Zur Qualitätsüberprüfung wurden bei jedem Ansatz aus zusätzlich explantierten 15 Explantaten uninjizierter Embryonen und 15 Explantaten der Morpholino injizierten Populationen die Expression von Xanf1 und Xanf2 untersucht (Abb.39). So konnte gewährleistet werden, dass nur solche Explantate gesammelt wurden, bei denen die

Ergebnisse

Injektion erfolgreich war und die oben erwähnten Unterschiede in der Xanf1- und Xanf2 Expression zeigten. Ansätze, die dieses Ergebnis nicht zeigten, wurden verworfen.

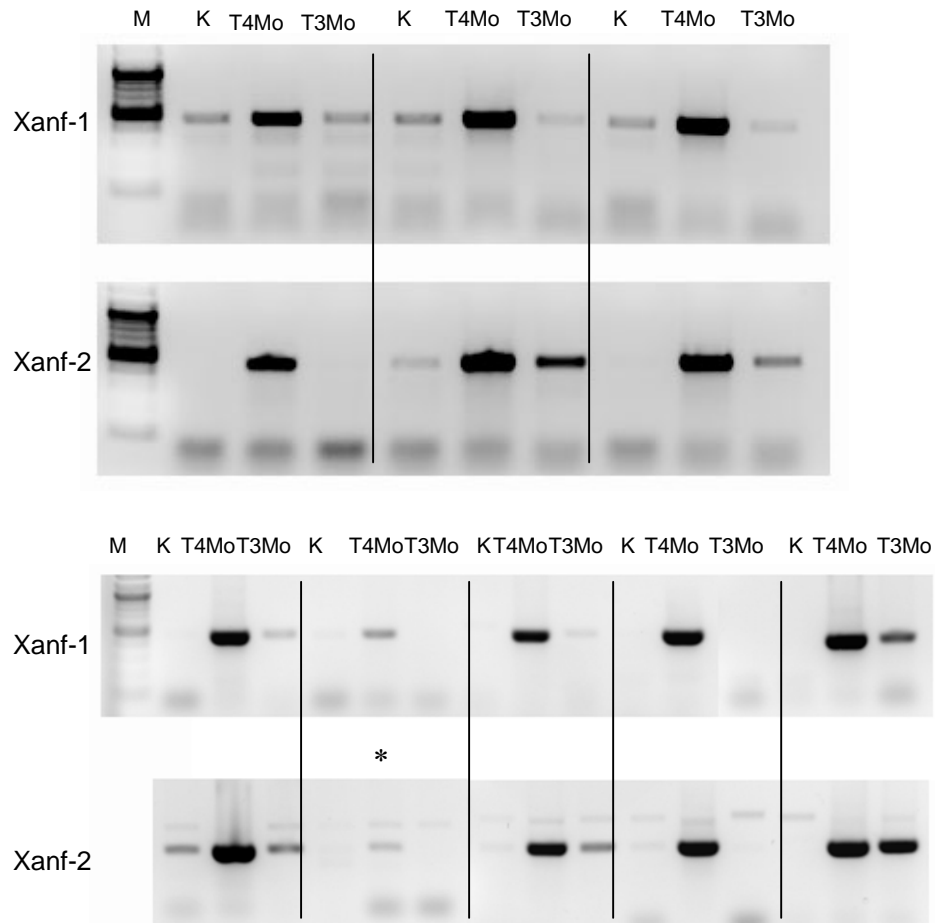


Abb.39: Qualitätskontrolle der für den substraktiven Screen benutzten RNA-Populationen. Jeder dieser Dreiersätze stellt einen Injektionstag dar. Deutlich ist die Aufregulation der beiden Markergene Xanf-1 und Xanf-2 nach XTcf-4-Morpholino (T4Mo) Injektion zu sehen. Das XTcf-3-Morpholino (T3Mo) zeigt auf diese beiden Gene keinen oder nur einen sehr geringen Effekt. In uninjizierten Kontroll-Explantaten (K) ist die Expression der Markergene ebenfalls nicht erhöht. Zur weiteren Verwendung wurden nur solche Sätze verwendet, die dieses Expressionsmuster aufwiesen. * markiert einen Ansatz, der verworfen wurde, da hier das XTcf-4-Morpholino nicht zur deutlichen Induktion der beiden Gene führte. M: Marker (2-log-Marker)

5.7.2 Mit substraktivem Screen werden Zielgene von XTcf-3 und XTcf-4 selektiv amplifiziert

Aus der Gesamt-RNA von jeweils ca. 2000 animale Kappen wurde zunächst mit sogenannten „Dynabeads“, Perlen mit angehefteten Poly T-Strängen die mRNA isoliert. Um die einzelnen Schritte im Verlauf des Screens auf ihren Erfolg zu überprüfen, wurde als Positivkontrolle mRNA aus menschlichem Skelettmuskelgewebe mitgeführt.

Nach Umschreiben der mRNA in doppelsträngige cDNA wurde diese mit der Restriktionsendonuklease RsaI in ca. 400 bp lange Fragmente verdaut. Nach Anheftung spezifischer Adaptoren wurde die T3Mo-cDNA Population von der T4Mo-cDNA Population subtrahiert und umgekehrt. In anschließenden PCR-Schritten wurden differentiell exprimierte Gene angereichert.

Wie erwartet zeigt die Auftrennung der Amplifikate mittels Agarosegelelektrophorese eine durchschnittliche Größe von ca. 400 Basenpaaren (Abb.40).

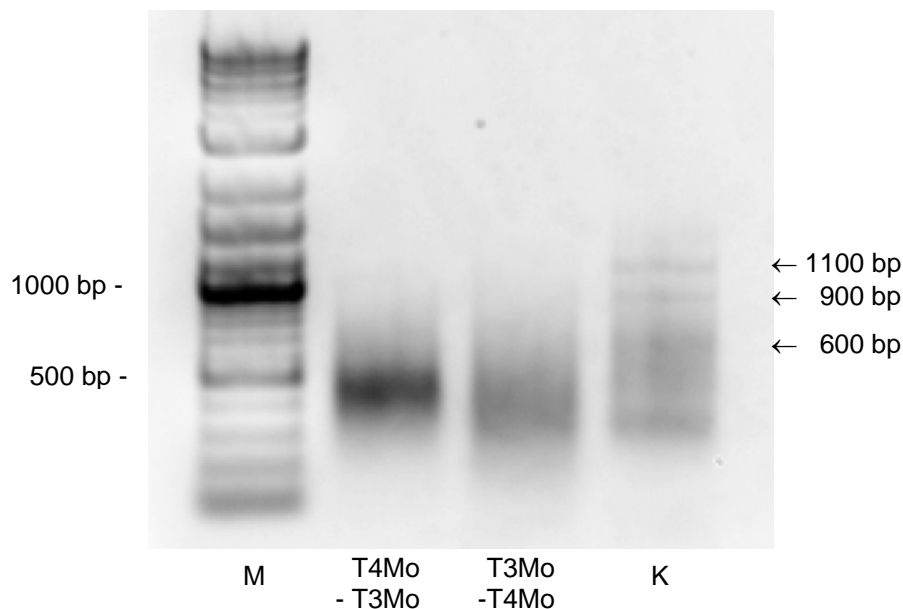


Abb.40: Mischpopulation selektiv exprimierter cDNAs nach erfolgter Substraktion. Die aus den Subtraktionen T3Mo-T4Mo und T4Mo-T3Mo übrig gebliebenen Fragmente wurden in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Amplifikationen angereichert. Die meisten cDNA-Fragmente sind zwischen 300 und 600 bp lang. Diese Fragmente wurden im nächsten Schritt in den pGEM-T-Vektor ligiert. In der Kontrolle (K) sind Fragmente der Größe 600, 900 und 1100 Basen zu erkennen. M: Marker (2-log-Marker)

Sämtliche Gene, die in der Kontroll-mRNA vorhanden waren, sollten in der Positivkontrolle, weil sie sowohl im „tester“ als auch im „driver“ vorkommen, eliminiert werden. Nur im „tester“ vorkommend sollten die HaeIII-geschnittenen Phagen-DNA-Fragmente der Länge 600, 900, 1100 und 1300 Basen selektiv amplifiziert werden. Fragmente der Größe 600, 900 und 1100 Basen wurden in der Positivkontrolle nachgewiesen, was bestätigt, dass die beiden Hybridisierungsschritte mit der anschließenden PCR prinzipiell korrekt abliefen.

Die PCR-Produkte beider Ansätze waren nun das Ausgangsmaterial für die cDNA-Bibliotheken. Die Fragmente wurden in den pGEM-T-Vektor ligiert, in Bakterien vervielfältigt und die Plasmide isoliert. Auf diese Weise entstand eine cDNA-Bibliothek „potentielle“ XTcf-3-Zielgene mit 522 Klonen und eine cDNA-Bibliothek „potentielle“ XTcf-4-Zielgene mit 248 Klonen.

Die Klone der cDNA-Bibliothek wurden mit plasmidspezifischen Primern amplifiziert und auf ihre Größenverteilung hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass die durchschnittliche Größe der Amplifikate mit 200-500 bp den erwarteten 400 bp entspricht. Aliquots der Amplifikate wurden auf Nitrozellulose aufgebracht und mit radioaktiv markierter cDNA der Ausgangspopulation bzw. der revers subtrahierten Population hybridisiert (Abb.41).

Ergebnisse

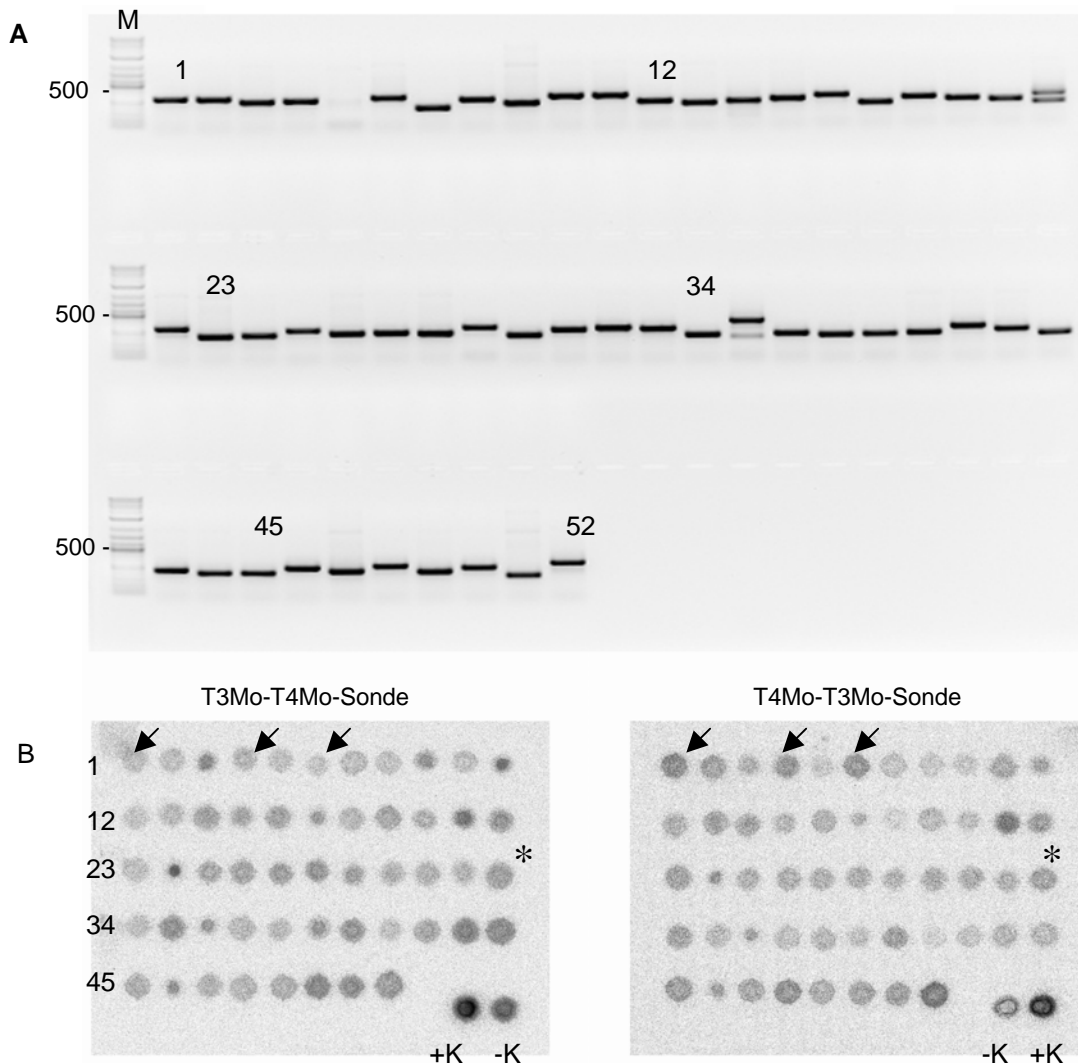


Abb.41: (A) Größenverteilung einzelner T4Mo-T3Mo Klone. Amplifiziert wurde mittels SP6- und T7-Primern das in den pGEM-T Vektor ligierte DNA-Fragment. Die Länge der Fragmente liegt in diesem Fall zwischen 200 bp und 500 bp. **(B)** Auf Nitrozellulose aufgetragenes PCR-Produkt. Es wurden jeweils 2 μ l auf zwei Membranen identisch aufgetropft. Nach der Hybridisierung mit den beiden radioaktiv markierten Sonden (links: T3Mo-T4Mo-Sonde; rechts: T4Mo-T3Mo-Sonde) wurden Filmplatten belichtet und mit einem Phosphoimager die Filmschwärzung detektiert. Die Postitivkontrollen und Negativkontrollen zeigen deutliche Unterschiede in der Signalintensität, erkennen jedoch nicht ausschließlich die Sonde der selben Subtraktion (+K), sondern auch die der jeweils inversen Subtraktion (-K). M: Marker (100 bp-Marker)

Jede der beiden Membranen mit jeweils 50-70 verschiedenen Klonen wurde dann mit je einer der beiden Sonden inkubiert. Nach Hybridisierung, Belichtung der Filmplatten und Digitalisierung der Daten galt es nun solche Klone auszusuchen, die auf der Membran mit derselben Sonde ein stärkeres Signal zeigen als auf der Membran mit der jeweils anderen Sonde. Beispiel: Bei den auf die beiden Membranen aufgetragenen, handelt es sich um T4Mo-T3Mo-Klone. Eine Membran wird mit der Sonde der Subtraktion T4Mo-T3Mo, die andere Membran mit der Sonde der inversen Subtraktion T3Mo-T4Mo inkubiert. In diesem Fall waren nur Klone interessant, die

nach Hybridisierung mit der T4Mo-T3Mo-Sonde ein stärkeres Signal zeigen als mit der T3Mo-T4Mo-Sonde. Beide Sonden erkennen teilweise dieselben (Abb.41B, Sterne), teilweise unterschiedliche Klone (Abb.41B, Pfeile). Um die Auswertung zu erleichtern, wurde eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Qualität der Sonden variiert zwischen den einzelnen Experimenten, weshalb diese Kontrollen für jedes Experiment mitgeführt werden mussten. Da die Sonden jedoch nicht ausschließlich ihre Positivkontrolle erkennen, sondern auch, allerdings in geringerem Maße mit der Negativkontrolle hybridisieren, wurde aus den Werten der beiden Signalintensitäten eines Klonen ein Quotient berechnet, der das Verhältnis der Hybridisierung mit den jeweiligen Klonen zeigt.

Zur Vereinfachung der Auswertung wurden die einzelnen Klone auf Grundlage ihrer unterschiedlichen Signalintensitäten nach Hybridisierung der beiden Sonden in ein Koordinatensystem eingetragen. Aufgrund der breiten Streuung der Signalintensitäten der verschiedenen Klone konnte eine Verteilung erwartet werden, bei der Klone besser zwischen den Sonden diskriminieren als die Positivkontrolle (Kategorie I), Klone die schlechter als die Positivkontrolle, aber besser als die Negativkontrolle diskriminieren (Kategorien II und III) und solche, die schlechter als die Negativkontrolle zwischen den Sonden unterscheiden (Kategorie IV). In diese Kategorien wurde das Spektrum der Klone dann aufgeteilt, wobei der zwischen Positivkontrolle und Negativkontrolle liegende Bereich mit einer Winkelhalbierenden in zwei Bereiche geteilt wurde (Abb.42).

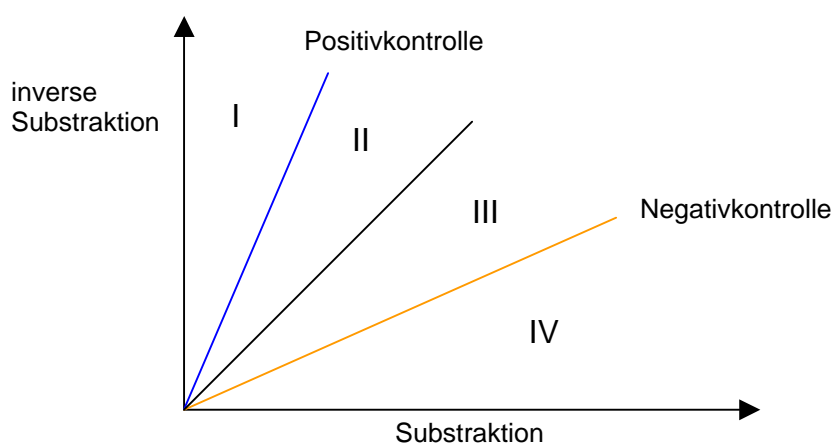


Abb.42: Schaubild zur Analyse der Lokalisation der vier Kategorien. Kategorie I Klone diskriminieren stärker zwischen den beiden Sonden als die Positivkontrolle. Klone der Kategorie II und III diskriminieren schlechter als die Positivkontrolle aber besser als die Negativkontrolle. Die Klone der Kategorie IV dagegen diskriminieren schlechter als die Negativkontrolle zwischen den eingesetzten Sonden.

Ergebnisse

Nach Auswertung von jeweils 60-70 T3Mo-T4Mo- und T4Mo-T3Mo-Klonen ergab sich wie erwartet die oben erläuterte Verteilung. Die einzelnen Klone konnten nun sehr einfach den jeweiligen Kategorien zugeordnet werden (Abb.43 und 44).

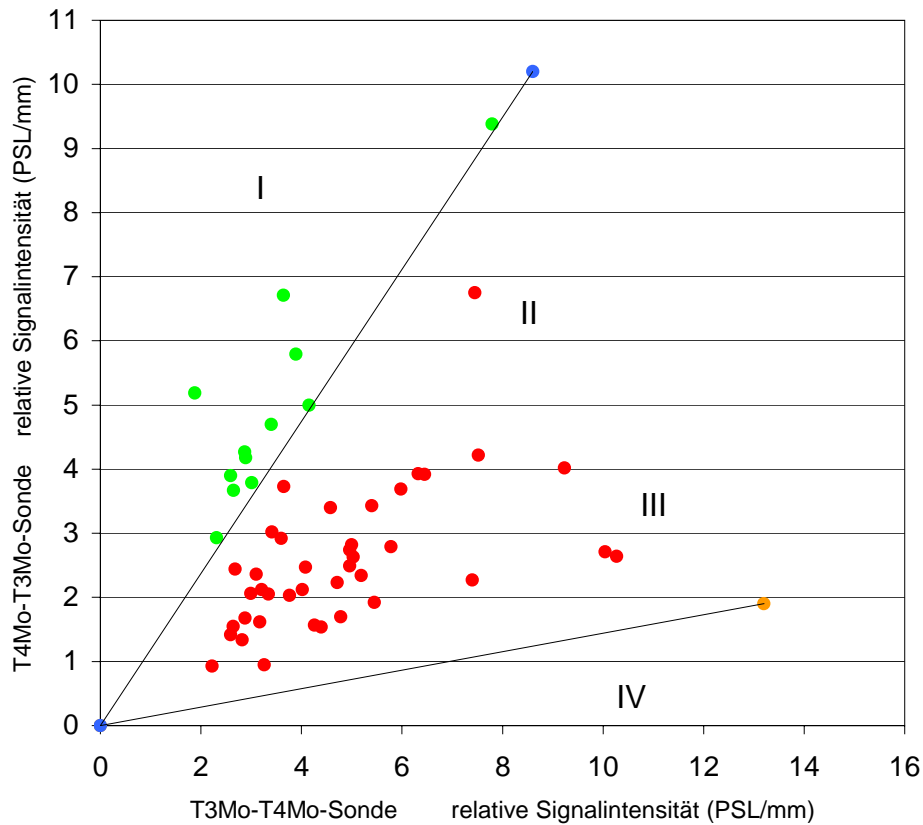


Abb.43: Relative Signalintensität einzelner Klone nach Subtraktion T4Mo-T3Mo mit den Sonden der Subtraktion (T4Mo-T3Mo-Sonde) und der inversen Subtraktion (T3Mo-T4Mo-Sonde). Grün gekennzeichnete Klone diskriminieren stärker zwischen den beiden Sonden als die Positivkontrolle (blau) und sind deshalb interessante Kandidatengene. Die rot gekennzeichneten Klone diskriminieren weniger stark zwischen den beiden Sonden. Die Negativkontrolle ist orange gekennzeichnet.

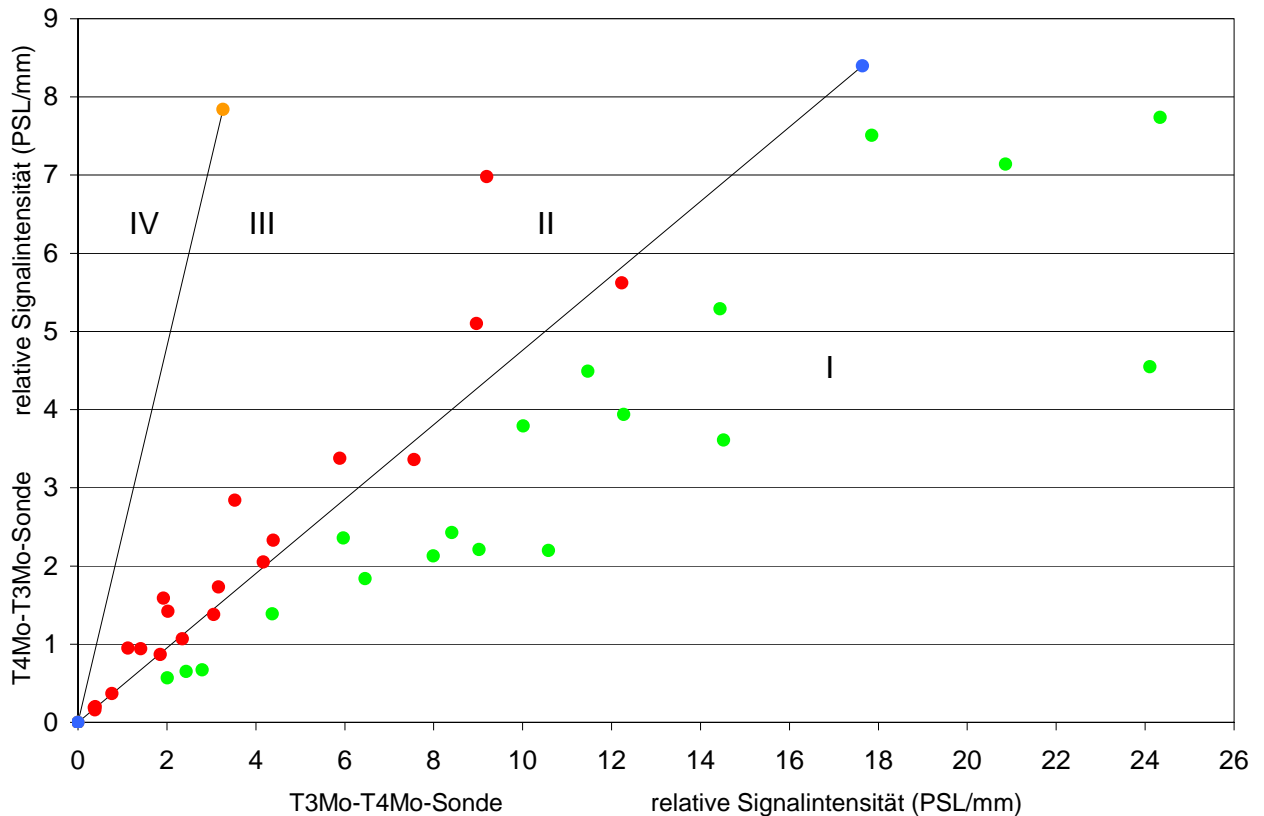


Abb.44: Relative Signalintensität einzelner Klone nach Subtraktion T3Mo-T4Mo mit den Sonden der Subtraktion (T3Mo-T4Mo-Sonde) und der inversen Subtraktion (T4Mo-T3Mo-Sonde). Grün gekennzeichnete Klone diskriminieren stärker zwischen den beiden Sonden als die Positivkontrolle (blau) und sind deshalb interessante Kandidatengene. Die rot gekennzeichneten Klone diskriminieren weniger stark zwischen den beiden Sonden. Die Negativkontrolle ist orange gekennzeichnet.

Kategorie I Klone diskriminieren stärker zwischen den beiden Sonden als die Positivkontrolle und sind im Diagramm grün dargestellt. Für die Kategorien II und III wurde der Bereich zwischen der Positivkontrolle und der Negativkontrolle geteilt. Klone der Kategorie II diskriminieren schlechter als die Positivkontrolle und liegen in dem Bereich der näher zur Positivkontrolle ist. Kategorie III Klone diskriminieren ebenfalls schlechter als die Positivkontrolle, sind aber näher zur Negativkontrolle lokalisiert. Klone der Kategorie IV diskriminieren schlechter als die Negativkontrolle (Abb.43 + 44).

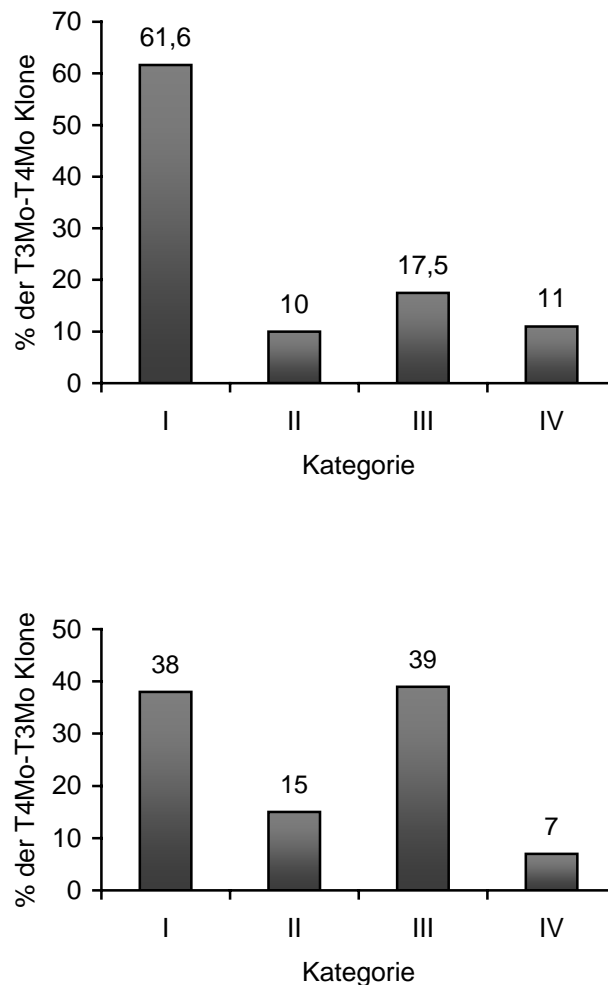


Abb.45: Verteilung der Klone in den vier Kategorien. Im Falle der T3Mo-T4Mo Subtraktion (oben) werden deutlich mehr Kategorie I Klone (61,6%) gefunden als nach der T4Mo-T3Mo Subtraktion (38%) (unten). In beiden Fällen ist jedoch die Anzahl an Kategorie II Klonen (10% und 15%) überraschend gering im Vergleich zu Kategorie III Klonen (17,5% und 39%).

Die ungleiche Verteilung der Klone in den vier verschiedenen Kategorien (Abb.45) deutet darauf hin, dass es sich nicht um eine Zufallsverteilung handelt. So lässt die große Anzahl an Klonen der Kategorie I im Vergleich zu den drei anderen Kategorien im Falle der T3Mo-T4Mo-Subtraktion darauf schließen, dass der substraktive Screen gut verlaufen ist. Im Falle der T4Mo-T3Mo-Subtraktion sieht die Verteilung etwas ungünstiger aus, da eine große Anzahl an Klonen in die Kategorie III fällt. Jedoch auch hier handelt es sich offensichtlich nicht um Zufallsverteilungen so dass der substraktive Screen auch hier erfolgreich war. Außerdem deuten die 11% und 7% Kategorie IV-Klone darauf hin, dass sich auch in der Kategorie I Klone befinden, die falsch positiv und somit keine echten Zielgene von XTcf-3 oder XTcf-4 sind

Ergebnisse

Bei einer ersten Sequenzierung von 16 potentiellen XTcf-4 Zielgenen (T3Mo-T4Mo Subtraktion) wurde überwiegend das Haushaltsgen EF1 α identifiziert. Auch die weiteren sequenzierten Klone waren, da ribosomal eher falsch-positiv.

Als potentielle Zielgene von XTcf-3 (T4Mo-T3Mo Subtraktion) wurden bei der Sequenzierung von 6 Klonen 3 interessante gefunden: XAG (Xenopus anterior gradient), Gluthamin-Fructose-6P-Transaminase und α -Tubulin. Mit Auswertung der übrigen Klone der Kategorie I und evtl. auch der Kategorie II sollen weitere potentielle Zielgene von XTcf-3 oder XTcf-4 gefunden und mit Experimenten zur Charakterisierung der Gene bestätigt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der substraktive Screen erfolgreich verlaufen ist, obwohl auch falsch-positive Klone aufgetreten sind. Diese auszuschließen und weitere positive zu identifizieren ist das Ziel zukünftiger Experimente.

6. Diskussion

6.1 Der kanonische Wnt-Signalweg reguliert die XTcf-4 Expression

Der Einfluss der Wnt/ β -Catenin (kanonische)-Signalkaskade reicht von der Bildung der Achsen, über die Mesoderminduktion bis hin zur Neuralleisteninduktion (Cadigan und Nusse, 1997; Gradl et al., 1999; Logan und Nusse, 2004; Ille und Sommer, 2005). Doch noch immer ist sehr wenig darüber bekannt, warum zahlreiche Mitglieder der *Xenopus* Wnt-Familie konzentriert im sich entwickelnden Mittelhirn exprimiert sind, und welche Funktion sie dort ausüben. Diese Akkumulation verschiedener Wnts könnte auf ein zusätzliches regionales Organisationszentrum hindeuten welches zusätzlich zu den bekannten Organisationszentren „anteriore Neuralrippe“, „Telencephalon/Diencephalon-Grenze“ und „Isthmus“, die antero-posteriore Musterung des Gehirnes reguliert und an der Vorderhirn/Mittelhirn-Grenze lokalisiert ist. Als Organisationszentrum sollte die Vorderhirn/Mittelhirn-Grenze eine Quelle für sezernierte Wachstumsfaktoren sein, und dadurch das Zellschicksal in benachbarten Geweben beeinflussen, d. h. ein Organisationszentrum determiniert die Identität benachbarter Gewebe. Tatsächlich führt das Vorhandensein der Wnt-Signalmoleküle zu einer Anhäufung von β -Catenin in Zellkernen des Mesencephalon (Schohl und Fagotto, 2002). Somit liegt im anterioren Mesencephalon ein räumlich distinktes Areal mit aktivierter Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade vor. In dieser Region ist der Transkriptionsfaktor XTcf-4 nahezu identisch zu Xwnt-2b exprimiert (König et al., 2000). XTcf-4 ist das bisher einzig bekannte in diesem Bereich exprimierte Mitglied der Lef/Tcf-Familie. Die drei anderen Lef/Tcfs XLeF-1, XTcf-1 und XTcf-3 werden in anderen Gehirnregionen und dort weniger scharf begrenzt exprimiert (Molenaar et al, 1998, König et al, 2000, Roel et al, 2003).

Nach einem Morpholino knock-down von Xwnt-2b war XTcf-4 herunterreguliert, während die beiden Mittelhirn-Markergene Pax-6 und Otx-2 von dem Xwnt-2b-Morpholino unbeeinflusst waren. Da XTcf-4 der prominenteste Vertreter der Lef/Tcfs im Mittelhirn ist wird die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges durch Xwnt-2b im Mesencephalon höchstwahrscheinlich von XTcf-4 als Transduktor in den Zellkern weitergeleitet. XTcf-4 als Zielgen und gleichzeitig als Transkriptionsfaktor des kanonischen Wnt-Signalweges kontrolliert damit seine eigene Expression über eine autoregulatorische Schleife (Abb.46). Ähnliche Mechanismen, wurden für die

Lef-1 Expression in humanen Krebszellen, (Hovanes et al., 2001) oder im Telencephalon von Mäusen (Galceran et al., 2000) beschrieben. Der Promotor des humanen Lef-1 besitzt dabei funktionelle Lef/Tcf-Bindestellen für eine selektive Aktivierung des kompletten Lef-1 (Hovanes et al., 2001), wobei für Lef-1 eine dominant-negative Isoform ohne β -Catenin-Bindestelle durch eine aktive Form ersetzt wird. Auch für Tcf-1 wurden autoregulatorische Mechanismen beschrieben (Roose et al., 1999), doch eine direkte Abhängigkeit der Expression der Lef/Tcfs von Wnt-Liganden war bisher unbekannt. Die autoregulatorische XTcf-4-Regulation erfolgt vermutlich direkt, da 5' des Translationsstarts von XTcf-4 zahlreiche putative Lef/Tcf-Bindestellen identifiziert wurden (Lattanzio, R., 2004, Diplomarbeit). Tatsächlich lässt sich ein 2000 Basenpaar langes XTcf-4-Promotor-Konstrukt durch Lef/Tcfs in Transfektionsexperimenten aktivieren (D. Gradl persönliche Mitteilung). Somit gibt es erste Hinweise, dass die in der vorliegenden Arbeit gefundene Abhängigkeit der XTcf-4-Expression von einem aktiven Wnt/ β -Catenin-Signalweg darauf zurückzuführen ist, dass XTcf-4 ein direktes Wnt-Zielgen ist.

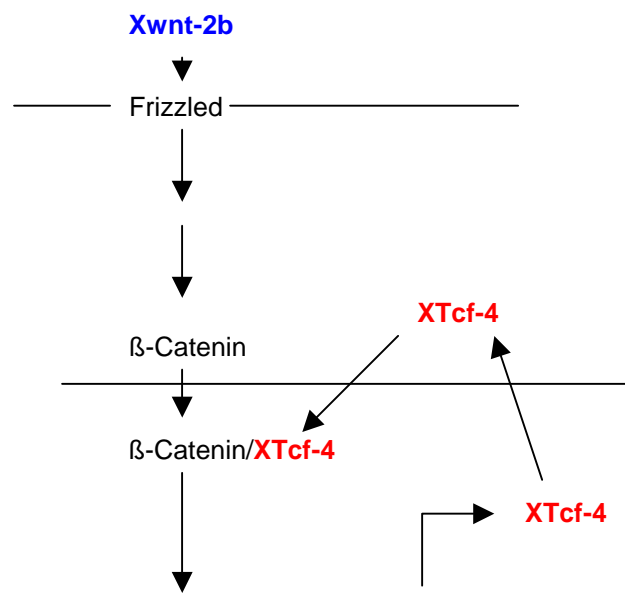


Abb.46: Modell der Regulation von XTcf-4 im Mittelhirn über die Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade, aktiviert von Xwnt-2b. XTcf-4 reguliert dabei als Transkriptionsfaktor und als Zielgen dieses Signalweges seine eigene Expression über eine autoregulatorische Schleife.

Xwnt-2b ist an der Vorderhirn/Mittelhirn-Grenze jedoch nicht das einzige Wnt, sondern es ist in dieser Region mit den anderen Familienmitgliedern Xwnt-1 und Xwnt-3A co-exprimiert (König, A., 2003, Diplomarbeit). Aufgrund dessen ist eine redundante Wirkung dieser drei Wnts wahrscheinlich, was auch erklärt, dass die

Reduktion von XTcf-4 als Folge des Xwnt-2b knock-down nicht komplett sein kann. Die co-exprimierten Wnts führen vermutlich zu einer Stabilisierung von β -Catenin, die ausreichend ist, die XTcf-4-Expression, wenn auch in deutlich reduziertem Ausmaß, aufrechtzuerhalten. Diese verbleibende XTcf-4-Expression wiederum reicht offensichtlich aus, die Expression der Mittelhirnmarker Pax-6 und Otx-2 zu gewährleisten.

Ähnlich der Expression von XTcf-4 war auch die Expression des Transkriptionsfaktors En-2 von Xwnt-2b abhängig. Jedoch auch En-2 war nur partiell runterreguliert, was wohl auf redundante Wirkungen der verschiedenen Wnts zurückzuführen ist. Die Herunterregulierung überrascht, da En-2 als Isthmus-spezifischer Transkriptionsfaktor nicht mit Xwnt-2b co-lokalisiert ist. Da Wnts jedoch sezernierte Proteine sind, wirken sie nicht unbedingt ausschließlich am Expressionsort, sondern können ihre Wirkung auch auf benachbarte Areale ausdehnen. Da En-2 bekanntermaßen ein direktes Zielgen des Wnt/ β -Catenin-Signalweges ist (McGrew et al., 1999), liegt die Vermutung nahe, dass durch den knock-down von Xwnt-2b die sensitivsten Markergene, die direkten Wnt/ β -Catenin-Zielgene XTcf-4 und En-2 betroffen sind. Andere mittelhirnspezifische Markergene, die nicht direkt von Wnt-Signalen abhängen, wie Pax-6 und Otx-2 sind davon nicht betroffen. Daneben besteht die Möglichkeit dass es sich um einen sekundären Effekt der vom Xwnt-2b-Morpholino reduzierten XTcf-4-Expression handelt.

6.2 XTcf-4 reguliert die Entwicklung des Mittelhirnes

Im Gegensatz zu Agonisten des Wnt/ β -Catenin-Signalweges wie Xwnt-8, β -Catenin oder Lef-1 führt eine ventrale Überexpression, ausgelöst durch Injektion von XTcf-4-mRNA, nicht zur Ausbildung ektopischer Körperachsen. Im Gegenteil, XTcf-4 inhibiert sogar die Fähigkeit von murinem Lef-1, sekundäre Achsen zu induzieren (Gradl et al., 2002). Um die Rolle von XTcf-4 in der Entwicklung des Gehirnes von *Xenopus laevis* besser zu verstehen, wurde es im Morpholino knock-down-Ansatz ausgeschaltet. Der so ausgelöste Verlust von XTcf-4 führt zur Reduktion von dorsalem Neuralgewebe im Mittelhirn. Jedoch auch die weiter posterior gelegene Mittelhirn/Hinterhirn-Grenze (Isthmus) zeigt Defekte als Folge des XTcf-4 knock-down. Diese Defekte bleiben trotz erneuter Expression von XTcf-4 in

Kaulquappenstadien bestehen, d. h. das Vorhandensein von XTcf-4 in späten Stadien kann die von dem knock-down hervorgerufene Fehlbildung hauptsächlich im posterioren Mittelhirn nicht rückgängig machen.

Im Vergleich zu der Tcf-3 Zebrafisch-Mutante *headless*, der anteriore Kopfstrukturen fehlen (Kim et al., 2000), bleibt der Effekt des XTcf-4 knock-down im Gehirn von *Xenopus* auf den Bereich des Mittelhirnes und den posterior davon gelegenen Isthmus begrenzt. Es konnten jedoch keine Veränderungen oder Verschiebungen in der antero-posterioren Musterung des Gehirnes festgestellt werden. Diese waren erwartet, denn Kiecker und Niehrs (2002) zeigten an animalen Kappen, dass ein Gradient von Wnt-Signalen das Gehirn in antero-posteriore Richtung mustert. Offensichtlich ist XTcf-4 in diese antero-posteriore Musterung nicht involviert. Allerdings waren nach dem XTcf-4 knock-down neben En-2 auch die Isthmus-Markergene Fgf-8 und Wnt-1 stark reduziert bis völlig verschwunden. Als einziger Isthmusmarker ist En-2 sowohl von dem Xwnt-2b- als auch vom XTcf-4 knock-down betroffen, und zeigt in beiden Fällen eine reduzierte Expression. Dafür gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten: (1.) da die Expression von Otx-2 zusammen mit Gbx-2 den Isthmus determiniert (Wurst und Bally-Cuif, 2001), ist nach dem Verlust von Otx-2, als Folge des XTcf-4 knock-down keine Bildung des Isthmus und der dort exprimierten Gene zu erwarten. Somit handelt es sich bei dem Verlust der Markergenexpression am Isthmus um einen sekundären Effekt und der Vorderhirn/Mittelhirn-Grenze könnte die Funktion eines Organisationszentrums zugesprochen werden. (2.) Es handelt sich um einen allgemeinen Verlust von dorsalem mesencephalem Gewebe, womit alle dorsalen Mittelhirn-Markergene einschließlich der dorsalen posterioren Isthmus-Markergene Fgf8, Wnt-1 und En-2 verloren gehen. Damit wäre die Vorderhirn/Mittelhirn-Grenze kein Organisationszentrum. (3.) XTcf-4 ist der Transkriptionsfaktor, den Wnt-1 bei der Bildung des Isthmus benutzt. Wnt-1 knock-out-Mäusen fehlt ähnlich wie den XTcf-4 knock-down-*Xenopus*-Embryonen der Isthmus (McMahon und Bradley, 1990; Thomas und Capecchi, 1990; McMahon et al., 1992), oder (4.) der Verlust der Isthmus-Markergene ist eine Konsequenz der direkten En-2-Unterdrückung. Diese Möglichkeit erscheint allerdings sehr unwahrscheinlich, da En-2-Transkripte auch in Xwnt-2b knock-down-Embryonen verschwinden, die Expression von Fgf8 und Wnt-1 aber bestehen bleibt.

Insgesamt scheint die Ursache für die Unterdrückung der Isthmus-Bildung also darin begründet zu sein, dass En-2 ein direktes Wnt-Zielgen ist und vor allem dass allgemein Mittelhirnstrukturen durch fehlendes XTcf-4-Protein in ihrer Ausprägung verkleinert sind. Der Verlust an dorsalem Neuralgewebe wird wie gezeigt, von einer dramatisch reduzierten Zellproliferation in dieser Region verursacht. XTcf-4 als Regulator der Zellproliferation während der Entwicklung des Gehirnes wird gestützt von Ergebnissen von Megason und McMahon (2002), die zeigten, dass ein Wnt/ β -Catenin Signal zur Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen im Rückenmark von Hühnerembryonen von entscheidender Bedeutung ist. Außerdem konnten sie mit Hilfe von dominant negativem Tcf-4 die Expression von cyclinD1 sowie die Zellproliferation in oben genanntem Gewebe unterbinden. Auch Lef-1-defiziente Mäuse zeigen eine 30%ige Reduktion an proliferierenden Zellen im dorsalen Bereich des Nachhirnes, dem medialen Pallium (Galceran et al., 2000). Überraschenderweise zeigten Tcf-4 knock-out Mäuse, obwohl Tcf-4 sowohl im Gehirn von Mäusen als auch in dem von anderen Vertebraten exprimiert wird (Cho and Dressler, 1998; Young et al., 2002), keine auffälligen Fehlbildungen im Gehirn, stattdessen sterben sie nach der Geburt am Fehlen einer Stammzellpopulation im Darm (Korinek et al., 1998b). Als Grund dafür kommen redundante Wirkungen der verschiedenen Lef/Tcf-Familienmitgliedern in Frage, wie sie beispielsweise von Lef-1 und Tcf-1 in doppel knock-out Mäusen berichtet wurden (Galceran et al., 1999). Der knock-out von Lef-1 führt bei Mäusen zu Fehlbildungen in anterioren Gehirnstrukturen wie dem Telencephalon und Hippocampus und Tcf-3-defizienten Zebrafisch-Embryonen fehlt das komplette Vorderhirn (Cheol-Hee et al., 2000). In Kombination mit dem Ergebnis, dass der Verlust von XTcf-4 im Gehirn von *Xenopus* zu dorsalen Defekten im Mittelhirn führt, ergibt sich ein Bild der verschiedenen Mitglieder der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren, die in unterschiedlichen Regionen im Gehirn die Entwicklung kontrollieren.

Somit handelt es sich bei der Vorderhirn/Mittelhirn-Grenze wohl nicht um ein klassisches Organisationszentrum, das Signale in Vorder- und Mittelhirn sendet, und deren Musterung kontrolliert.

6.3 XTcf-4 Isoformen besitzen unterschiedliche Funktionen in der Entwicklung des Mittelhirnes

Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, ob XTcf-4 der entscheidende Transkriptionsfaktor ist, der am Isthmus Wnt/ β -Catenin-Signale überträgt. Dazu wurden die Isoformen XTcf-4A und XTcf-4C auf die Fähigkeit, die Reduktion der NCAM-Expression im dorsalen Mittelhirn rückgängig zu machen und das reduzierte Gewebe wieder herzustellen, untersucht.

In *Xenopus* existieren drei verschiedene XTcf-4 Isoformen. Sie unterscheiden sich durch das Fehlen oder Vorhandensein der beiden ein aktivierendes Exon flankierende reprimierenden Motive LVPQ und SFLSS (Gradl et al., 2002). In dem Bereich, in dem das XTcf-4-Morpholino an die mRNA bindet sind die drei Isoformen jedoch identisch, womit das Morpholino die Translation aller drei Formen blockiert. Dabei hat sich gezeigt, dass die Varianten XTcf-4A und XTcf-4C in der Lage sind, das dorsale Neuralgewebe im Mittelhirn und als Konsequenz daraus, die NCAM-Expression wieder herzustellen, wobei diese Fähigkeit bei XTcf-4A stärker ausgeprägt ist als bei XTcf-4C. Aber auch in ihrer Funktion während der Gehirnentwicklung unterscheidet sich das als Repressor des Wnt/ β -Catenin Signalweges wirkende XTcf-4A von dem Aktivator XTcf-4C. XTcf-4A ist für die Erhaltung von dorsalem Mittelhirngewebe und die Expression der spezifisch in diesem Bereich exprimierten Gene Pax6 und Xwnt-2b (Kunz et al., 2004) notwendig. Die Expression der Isthmus-spezifischen Markergene En-2, Fgf-8 und Wnt-1 wird von ihm nicht beeinflusst. Diese sind offensichtlich von der Spleißvariante XTcf-4C abhängig, da diese die Fähigkeit besitzt, die Expression dieser Markergene nach XTcf-4-Morpholino knock-down wieder herzustellen.

Bei der Analyse zur Wiederherstellung NCAM-exprimierenden Gewebes muss jedoch bedacht werden, dass die antero-posteriore Ausdehnung des Mittelhirnes deutlich größer ist als die der Mittelhirn/Hinterhirn-Grenze. Darum ist die Anzahl aus dem Mittelhirn erhaltener Transversalschnitte größer als die von der Mittelhirn/Hinterhirn-Grenze erhältlichen, womit ein Wiederherstellen der NCAM-Expression mit XTcf-A im Mittelhirn erfolgreicher erscheinen kann als am Isthmus. Damit lässt sich jedoch nicht erklären, dass XTcf-4C dorsales Mittelhirngewebe schlechter wiederherstellt als XTcf-4A. Außerdem deuten auch die Ergebnisse der Ganzkeimfärbung darauf hin, dass XTcf-4A für die Entwicklung des dorsalen

Mittelhirnes und XTcf-4C für die Entwicklung der Mittelhirn/Hinterhirn-Grenze verantwortlich ist. Dies stimmt mit den Expressionsmustern dieser beiden Isoformen überein, nach denen XTcf-4A im anterioren Mittelhirn und XTcf-4C im posterioren Mittelhirn exprimiert ist (König, A., 2003, Diplomarbeit)

Nach Kombination dieser Daten mit dem Modell des posteriorisierenden Wnt-Gradienten (Kiecker und Niehrs, 2002), wird folgendes Modell der unterschiedlichen Funktionen der XTcf-4-Isoformen in der Entwicklung des embryonalen Mittelhirnes vorgeschlagen: Die beiden XTcf-4-Isoformen mit ihrer differentiellen Aktivität verschärfen den Wnt-Gradienten. XTcf-4A das als Repressor von Wnt-Zielgenen bekannt ist, reprimiert im Mittelhirn die Wirkung von posteriorisierenden Wnt-Signalen, während XTcf-4C als Aktivator am Isthmus die posteriorisierende Wnt-Wirkung verstärkt (Abb.47).

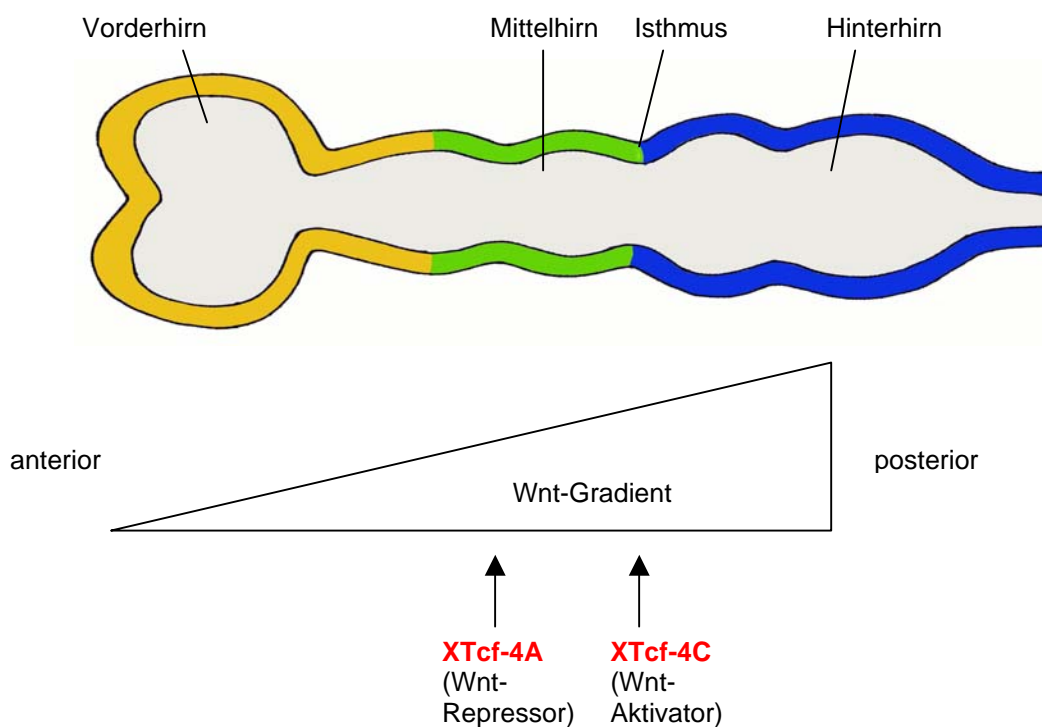


Abb.47: Modell der Funktionen von XTcf-4A und XTcf-4C im Mittelhirn. Die beiden Varianten nehmen Einfluss auf den Wnt-Gradienten und verstärken dessen Wirkung. XTcf-4A unterdrückt die posteriorisierende Wirkung im Mittelhirn und XTcf-4C verstärkt die posteriorisierende Wirkung im posterioren Mittelhirn und am Isthmus.

Tatsächlich werden die beiden Isoformen im Kaulquappenstadium lokal unterschiedlich exprimiert. XTcf-4A erscheint im anterioren Mittelhirn und XTcf-4 im posterioren Mittelhirn (König, A., 2003, Doktorarbeit). In dieses Modell fügen sich auch XTcf-3 und Lef-1 sehr gut ein. XTcf-3 wirkt als Repressor (Gradl et al., 2002)

und ist verstärkt im Vorderhirn exprimiert. XLef-1 gilt als Aktivator und im posterioren Mittelhirn und Isthmus lokalisiert (Molenaar et al., 1998).

6.4 Der XTcf-4 knock-down führt zur Reduktion der Ohrvesikel

XTcf-4 knock-down Embryonen zeigen neben den Defekten im Mittelhirn eine Reduktion des sich entwickelnden Ohres und der Otolithen. Dabei sind die für den Gleichgewichtssinn wichtigen Otolithen sowohl in Größe als auch in ihrer Anzahl verringert. Eine Expression von XTcf-4 im sich entwickelnden Ohr konnte nicht eindeutig nachgewiesen, allerdings auch nicht ausgeschlossen werden. Die drei anderen Familienmitglieder Lef-1, Tcf-1 und Tcf-3 konnten in *Xenopus* im sich entwickelnden Ohr nachgewiesen werden (Molenaar et al., 1998, Roel et al., 2003), ihre Funktion an diesem Ort ist jedoch nicht bekannt. Erst kürzlich wurde eine Enhancer-Sequenz des für die Ohrentwicklung wichtigen Wachstumsfaktors Fgf10 mit einer Tcf/Lef-Bindestelle identifiziert (Ohuchi et al., 2005). Dieser Enhancer steuert die Fgf10-Expression während der Entwicklung des Innenohres in der Maus. Im Hühnchen wird Tcf-3 im Stadium HH12 neben Neuralrohr und Chorda auch im Ohrvesikel exprimiert (Schmidt, et al. 2004). Andere Publikationen berichten von der Expression verschiedener Wnt-Signalmoleküle im Innenohr der Maus (Ladher et al., 2000), der Ratte (Daudet et al., 2002) und des Hühnchens (Stevens et al., 2003). Allerdings sind bislang keine Phänotypen bekannt, die nach Deletion von einem oder mehreren Mitgliedern der Lef/Tcf-Familie Defekte in der Entwicklung des Innenohres zeigen. Interessant wäre auch, ob in XTcf-4-defizienten *Xenopus*-Kaulquappen oder adulten Fröschen das Seitenlinienorgan Defekte aufweist. Dies könnte nach den Veränderungen im Innenohr angenommen werden, da sich das Gleichgewichtssystem der Vertebraten in dem sogenannten membranösen Labyrinthsystem befindet, welches sich aus dem anterioren Ende des Seitenliniensystems entwickelt.

6.5 XTcf-4 wird in den Somiten exprimiert und der XTcf-4 knock-down führt zu Defekten in den Somiten

In der Vergangenheit konnten Transkripte von XTcf-4 nur in Gehirn, Leber, Pankreas und Darm detektiert werden (König, A., 2003, Doktorarbeit) Mit Hilfe einer Immunfärbung konnte überzeugend belegt werden, dass XTcf-4 neben der prominenten Expression im anterioren Mesencephalon außerdem in den Somiten von *Xenopus laevis* exprimiert wird. Die Detektion dieses Proteins erfolgte mittels eines α -Tcf-3/4 Antikörpers. Somit besteht theoretisch die Möglichkeit, dass es sich bei dem in den Segmenten nachgewiesenen Protein um XTcf-3 handelt. Dafür spricht, dass wie schon erwähnt XTcf-4 bislang in den Somiten nicht nachgewiesen werden konnte. Gegen eine Detektion von XTcf-3 und für eine Detektion von XTcf-4 sprechen allerdings die Tatsachen, dass 1. ein derartiges Expressionsmuster auch für XTcf-3 nicht bekannt ist und 2. derselbe Antikörper XTcf-4 im Mittelhirn, jedoch nicht XTcf-3 im Vorderhirn erkennt. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei dem identifizierten Protein tatsächlich um XTcf-4 handelt. Die Expression beschränkt sich dabei auf die Zellkerne im Zentrum der Somiten. Keines der bisher bekannten Mitglieder der Lef/Tcf Familie zeigt ein ähnliches Expressionsmuster. Transkripte von Lef1 und Tcf1 werden zwar kolokalisiert in der Maus im präsomitischen Mesoderm (PSM) gefunden (Galceran et al., 2004), jedoch nicht in den schon ausgebildeten Somiten. Im Huhn werden sowohl Lef1 und Tcf-1 als auch β -Catenin sehr dynamisch und teilweise überlappend auch in Myotomen der Somiten exprimiert (Schmidt et al., 2004). Außerdem ist bekannt, dass die Wnt/ β -Catenin Signalkaskade, in diesem Fall aktiviert von Wnt3a eine wichtige Rolle bei der Etablierung der sogenannten Segmentierungsuhr, einem molekularen Oszillator, der im PSM die Segmentierung in Vertebraten reguliert, spielt (Aulehla et al., 2003). Dabei führt die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges zu einer Aktivierung der Axin2-Transkription durch Dishevelled, welches seinerseits den Notch-Signalweg blockiert. Axin2 akkumuliert und inhibiert die Wnt-Signalkaskade über eine negative Rückkopplung. Die Blockade des Notch-Signalweges wird aufgehoben und dieser wieder aktiviert. Dieser sich wiederholende Zyklus schnürt aufeinanderfolgend Segmente am PSM ab. Mit dem XTcf-4 knock-down wird das Axin2-aktivierende Signal der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade stark abgeschwächt, und der Oszillator unterbrochen oder gestört.

Somit lassen sich die Defekte in der Separation der Segmente als Folge der XTcf-4-Morpholino Injektion erklären.

Der Verlust von XTcf-4 als Folge der XTcf-4-Morpholino Injektion führt zu unzureichend getrennten Myotomen, zu Muskelfasern die über Myotomgrenzen hinweg reichen und zur Krümmung der Körperachse zur injizierten Seite. Neben der Kontrolle der Segmentierung spielen Wnt3a und auch Wnt1 bei der Induktion der Myotomentwicklung eine entscheidende Rolle. Dabei werden Wnt-Liganden im Neuralrohr und der Epidermis sezerniert und aktivieren in den Somiten die Entwicklung der Myotome (Münsterberg et al., 1995; Stern et al., 1995; Ikeya and Takada, 1998). Das in den Myotomen/Somiten exprimierte XTcf-4 könnte dabei als nuklearer Transduktor dieser Wnt-Signale fungieren. So resultiert beispielsweise die gezielte Inaktivierung von Lef-1 in Mäusen in Deformationen des Schwanzes und im Fehlen von segmentierten Somiten. Neugeborene Tiere zeigen Fehlbildungen in den Somitenderivaten Wirbelsäule und Rippen. Die Wnt/ β -Catenin –Signalkaskade nimmt im PSM über Lef-1 und die indirekte Regulation von Delta-like1, Kontakt zum Notch Signalweg auf und so Einfluss auf den Prozess der Somitogenese (Galceran et al., 2004). Ein Mechanismus, bei dem Wnt1 oder Wnt3, aus der Epidermis oder dem Neuralrohr sezerniert, in den benachbarten Somiten über XTcf-4 die Myotombildung induziert wäre somit durchaus möglich. Um diese Annahme jedoch besser verifizieren zu können, werden in Zukunft weitere Experimente nötig sein.

Zuerst müsste der zeitliche Rahmen genau eingegrenzt werden, in dem XTcf-4 in den Somiten oder Myotomen exprimiert wird. In den der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimenten wurden Embryonen im Stadium 38 untersucht. Es wäre jedoch wichtig zu wissen, ob XTcf-4 schon während der Somitenbildung im PSM exprimiert wird, oder ob es ausschließlich an der Induktion der Myotomdifferenzierung beteiligt ist. Eine Funktion, die auf die Myotomdifferenzierung beschränkt ist, scheint aber unwahrscheinlich, da die Segmentierung schon zuvor stattfindet und diese offensichtlich gestört ist. Aufschlussreich wäre auch die Untersuchung der Expression verschiedener Mitglieder des Notch-Signalweges im Laufe der Somitogenese in XTcf-4 knock-down Embryonen um auch eine eventuelle Verbindung zu diesem Signalweg über XTcf-4 zu identifizieren.

6.6 Der XTcf-4 knock-down führt zu einem ungewöhnlichen Schwimmverhalten

Die XTcf-4 knock-down Embryonen zeigen im Kaulquappenstadium ein abnormes rotierendes Schwimmverhalten. Als Erklärung dafür kommen alle vom XTcf-4-Morpholino verursachten Defekte, sowohl im Mittelhirn, als auch im Ohr und den Somiten in Frage.

Der Phänotyp kann eine Konsequenz der Defekte im dorsalen Mittelhirn sein, wenn Bereiche betroffen sind, die die Koordination im Raum steuern. Die Steuerung des Gleichgewichtssinnes erfolgt in einem Teil des Rhombencephalon, dem Cerebellum. So hat der Ausfall des Cerebellum die Unfähigkeit zur koordinierten Bewegung zur Folge (Lexikon der Biologie, 1995). Da dort auch der Nervus statoacusticus innerviert, scheinen die Defekte im Mittelhirn das Schwimmverhalten nicht unmittelbar zu verursachen.

Die Reduktion des Ohrvesikel einschließlich der Otolithen im Gleichgewichtsorgan ist eine weitere Erklärung, zumal von Embryonen berichtet wurde, die nach Gravitationsdepletion ein sehr ähnliches Schwimmverhalten zeigten (Prof. E. Horn persönliche Mitteilung). In beiden Fällen war außerdem der vestibuläre- okulomotorische Reflex reduziert. Dieser Reflex ist ein „Gegenrollen“ der Augen, das mit der Lageänderung des Kopfes einhergeht, damit die Umwelt stets in derselben Orientierung auf der Retina abgebildet werden kann. Senkrechte Linien bleiben damit auch bei seitlichem Neigen des Kopfes senkrecht auf der Retina abgebildet, da die Lage der Augen bezüglich der Umwelt nicht verändert wird. Das gestörte Schwimmverhalten wäre demnach eine direkte Folge fehlerhafter Gravitationsrezeption.

Aber auch die Defekte in den Somiten und der daraus entwickelnden Rumpfmuskulatur könnten ein kreisförmiges Schwimmen verursachen. Die einseitige Verkürzung der Muskulatur mit einer daraus resultierenden Biegung der Körperachse scheint auf den ersten Blick die naheliegendste Erklärung zu sein. Allerdings zeigten nicht alle „Kreisschwimmer“ eine gebogene Körperachse. Um jedoch endgültig aufzuklären, welcher Faktor, oder ob vielleicht die Kombination aller drei Faktoren den Phänotyp auslöst, werden in Zukunft weitere Untersuchungen nötig sein.

6.7 Identifizierung unterschiedlicher Zielgene von XTcf-3 und XTcf-4 mittels subtraktiver suppressiver Hybridisierung

Aufgrund der Tatsache, dass das XTcf-4-Morpholino spezifische Effekte hervorruft, existieren vermutlich für XTcf-4 spezifische Zielgene. Diese Vermutung wurde durch Experimente bestätigt in denen XTcf-4 und XTcf-3 unterschiedliche Affinitäten zu Promotoren der Wnt/ β -Catenin-Zielgenen *fibronectin* und *siamois* besitzen (Pukrop et al., 2001). Außerdem wurde gezeigt, dass Promotoren existieren, die von Tcf-4 aktiviert und von Tcf-3 reprimiert werden (Pukrop et al., 2001). Somit konnte angenommen werden, dass diese beiden Transkriptionsfaktoren neben gemeinsamen auch unterschiedliche Zielgene besitzen. Als XTcf-4-Zielgene können Gene erwartet werden, die spezifisch im Mittelhirn exprimiert werden und/oder die Zellproliferation steuern oder zumindest beeinflussen. XTcf-3-Zielgene werden aufgrund des XTcf-3-Expressionsusters hauptsächlich im anterioren Teil des zentralen Nervensystems erwartet. Zur Identifizierung dieser unterschiedlichen Zielgene wurde ein subtraktiver Screen durchgeführt. Nachdem gezeigt werden konnte, dass neuralisierte animale Kappen zum Einen XTcf-3 und XTcf-4 exprimieren und zum Andern nach XTcf-3-Morpholino- oder XTcf-4-Morpholino-Injektion Xanf1 und Xanf2 unterschiedlich exprimieren, wurden sie als ideales System für die Quelle der verschiedenen mRNA-Populationen gewählt. Dabei hatte die Subtraktion der XTcf-4-Morpholino (T4Mo) injizierten- von der XTcf-3-Morpholino (T3Mo) injizierten Population im Vergleich zur Subtraktion der XTcf-4-Morpholino von einer uninjizierten Kontrollpopulation die entscheidenden Vorteile, dass 1. nur spezifische XTcf-4 Zielgene identifiziert, und gemeinsame Zielgene mit XTcf-3 im Screen eliminiert werden, und 2. mit der inversen Subtraktion T4Mo-T3Mo als positiver Nebeneffekt auch spezifische Zielgene von XTcf-3 gefunden werden. Nach der T4Mo-T3Mo Subtraktion bleiben also Gene übrig, die entweder von XTcf-3 aktiviert oder von XTcf-4 reprimiert werden, mit der T3Mo-T4Mo Subtraktion sollen Gene isoliert werden, die von XTcf-4 aktiviert oder von XTcf-3 reprimiert werden. Die nach den beiden Subtraktionen erhaltenen Klone wurden dann in Abhängigkeit von ihrer Affinität zu den beiden verwendeten Sonden in vier Kategorien eingeteilt. In Kategorie IV erscheinen Klone, die zwischen den beiden Sonden weniger Unterschiede zeigen als die verwendete Negativkontrolle. Diese Gene sind offensichtlich negativ, sie werden nicht für weitere Untersuchungen herangezogen.

Klone der beiden Kategorien III und II liegen mit ihrer Fähigkeit zwischen den beiden Sonden zu diskriminieren zwischen der Positiv- und der Negativkontrolle. Sie sind theoretisch als negativ anzusehen, allerdings ist es möglich dass hauptsächlich die Kategorie II Klone enthält, die falsch negativ sind. Aus diesem Grund stehen diese Klone zur Verfügung um sie gegebenenfalls weiter zu analysieren. Klone der Kategorie I zeigen in ihrer Affinität zu den Sonden größere Unterschiede als die Positivkontrolle und sollten darum positiv sein. Die Tatsache, dass bei der T3Mo-T4Mo Subtraktion ca. 2/3 der Klone in diese Kategorie fallen deutet daraufhin, dass diese Subtraktion auch wirklich erfolgreich war. Tatsächlich wurde in dieser Kategorie sehr häufig das Haushaltsgen $EF1\alpha$ (elongation factor 1α) als Zielgen von XTcf-4 identifiziert. Entweder spiegelt dies eine verstärkte Proliferation und damit eine erhöhte Präsenz von Haushaltsgenen gegenüber „Differenzierungsgenen“ wieder, oder es befinden sich bei dieser Subtraktion zahlreiche falsch-positive Klone.

Die Verteilung der Klone aus der T4Mo-T3Mo Subtraktion in den Kategorien sieht zwar auf den ersten Blick nicht ganz so positiv aus, da der Anteil an Kategorie III-Klonen mit 39% relativ hoch ist und nur 38% Klone der Kategorie I gefunden wurden. Allerdings wurden in dieser Kategorie mit XAG (*Xenopus anterior gradient*) ein Gen identifiziert, das als Markergen der Zementdrüse im anterioren Kopfbereich von *Xenopus* Embryonen exprimiert wird (Sive et al., 1989) und inzwischen mit einer PCR-Amplifikation bestätigt werden konnte (persönliche Mitteilung Stephanie van Venrooy). α -Tubulin, das ebenfalls als potentielles XTcf-3 Zielgen identifiziert wurde, bildet zusammen mit β -Tubulin die Mikrotubuli. Tubulin kommt in praktisch allen eukaryotischen Zellen vor, aber besonders stark wird es im Gehirn von Wirbeltieren exprimiert, als Ausdruck der hohen Dichte der Mikrotubuli in den langen Nervenzellfortsätzen (Alberts et al., 1997). α -Tubulin spielt außerdem mit seiner Beteiligung an der Mitosespindel eine entscheidende Rolle im erfolgreichen Ablauf der Mitose und somit auch der Zellproliferation (Chu et al., 1989). Eine Funktion von α -Tubulin bei der Kontrolle des Wachstums und der Regeneration speziell in Neuronen im Gehirn von Ratten konnte nachgewiesen werden (Gloster et al., 1994). Sollte XTcf-3 ähnlich wie XTcf-4 (Kunz et al., 2004) eine regulierende Funktion in der Zellproliferation ausüben, könnte dies darauf hindeuten, dass α -Tubulin tatsächlich ein Zielgen von XTcf-3 ist. Als weiteres potentielles Zielgen von XTcf-3 identifiziert ist die Gluthamin-Fructose 6P-Transaminase als Induktor der TGF-beta1-Synthese in Fibroblasten exprimiert (Weigert et al., 2001). In weiteren Experimenten müssen

diese Gene als tatsächliche Zielgene jedoch bestätigt und dann charakterisiert werden. Dabei ist auch interessant, welche der identifizierten Gene den XTcf-4 knock-down-Phänotypen wieder aufheben können. Außerdem sollen die häufig gefundenen Gene EF1 α und α -Tubulin mittels Hybridisierung identifiziert und ausgeschlossen werden, um auch seltenere Zielgene aufzudecken. Neben XAG soll von anderen in Zukunft identifizierten potentiellen Zielgenen das Expressionsmuster im *Xenopus* Embryo mit Ganzkeimfärbung charakterisiert werden, um zu überprüfen, ob die Expressionsmuster räumlich und zeitlich mit denen von XTcf-3 oder XTcf-4 überlappen. Im Moment kann noch nicht unterschieden werden, ob potentielle XTcf-4-Gene tatsächlich von XTcf-4 aktiviert oder nicht doch von XTcf-3 blockiert werden, und umgekehrt. Die cDNA-Bibliothek ist jedoch vorhanden und muss jetzt „nur“ noch analysiert werden. Abschließend kann gesagt werden, dass offensichtlich Gene existieren, die von XTcf-4 und XTcf-3 differentiell reguliert werden.

7. Zusammenfassung

Im *Xenopus* Embryo sind nach der primären antero-posterioren Musterung der Neuralplatte XTcf-4 und zahlreiche Wnt-Signalmoleküle im posterioren Vorderhirn und im Mittelhirn co-exprimiert. Besonders auffällig ist dabei die nahezu komplette Überlappung der Expressionsfelder von Xwnt-2b und XTcf-4 (König et al., 2000). Um die endogene Funktion von Xwnt-2b und XTcf-4 in der Gehirnentwicklung zu untersuchen und zu klären ob sich an der Vorderhirn/Mittelhirn-Grenze ein Organisationszentrum befindet, wurde die Morpholin-knock-down-Methode gewählt. Damit wurde gezeigt, dass die Expression von XTcf-4 von Xwnt-2b abhängt und Xwnt-2b wiederum unter der Kontrolle von XTcf-4 steht. Die Analyse verschiedener Markergene machte deutlich, dass diese autoregulatorische Schleife für eine normale Entwicklung des Mittelhirnes und der Mittelhirn/Hinterhirn-Grenze (Isthmus) notwendig ist. Die Hauptaufgabe von XTcf-4 ist dabei, die Proliferation im dorsalen Mittelhirn zu fördern und damit die laterale Ausdehnung von dorsalen Mittelhirnstrukturen zu regulieren. An Experimenten in denen der XTcf-4 knock-down mittels Co-Injektion der Isoformen XTcf-4A und XTcf-4C aufgehoben wurde, konnte gezeigt werden, dass diese beiden Isoformen die Entwicklung unterschiedlicher Bereiche des Gehirns kontrollieren. XTcf-4A ist für die Entwicklung des Mittelhirnes entscheidend, hat jedoch auf Isthmus-spezifische Markergene keine Wirkung. XTcf-4C dagegen aktiviert Isthmus-spezifische Markergene, hat aber nur geringe Effekte auf die Mittelhirnentwicklung. Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Autoregulation des kanonischen Wnt-Signalweges und die alternative Expression verschiedener XTcf-4 Isoformen für die Musterung des sich entwickelnden zentralen Nervensystems entscheidend sind, die Region um die Vorderhirn/Mittelhirn-Grenze sehr wahrscheinlich aber nicht den Charakter eines Organisationszentrums hat.

Als weiteren XTcf-4 knock-down Phänotypen zeigen die *Xenopus*-Embryonen als Kaulquappen ein kreisförmiges Schwimmverhalten. Als Ursache wurde eine gekrümmte anterior-posteriore Körperachse und/oder eine Reduktion der Otolithen im Gleichgewichtsorgan des Innenohres festgestellt. Der Grund für die Körperkrümmung scheint in einer unvollständigen Separation der Somiten zu liegen, die vom knock-down einer zuvor noch unbekannt in den Somiten lokalisierten XTcf-4-Expression hervorgerufen wird.

Um die Spezifität der XTcf-4 Wirkung auf die Embryonalentwicklung genauer zu analysieren wurden mittels substraktiver Hybridisierung cDNA-Bibliotheken erstellt, in denen Gene angereichert sind, die selektiv von XTcf-4 oder XTcf-3 reguliert werden. Die ersten Sequenzierungen ergaben mit EF1 α ein Haushaltsgen als potentiell XTcf-4-Zielgen und mit XAG-1 (*Xenopus* anterior gradient), Gluthamin-Fructose-6P-Transaminase und α -Tubulin potentielle XTcf-3-Zielgene, die entweder allgemein in neuralem Gewebe verstärkt exprimiert werden, oder wie XAG-1 im anterioren Bereich des Neuroektoderms akkumulieren, und damit den Erwartungen für potentielle XTcf-3-Zielgene entsprechen. Mit weiteren Untersuchungen sollen nun weitere Zielgen identifiziert, die bestehenden Ergebnisse bestätigt und die Expressionsmuster und die genaue Funktion dieser Gene in der Entwicklung des zentralen Nervensystems geklärt werden.

8. Literatur

- **Altmann, C. R., Brivanlou, A. H.** (2001) Neural patterning in the vertebrate embryo. *International Review of Cytology* 203, 447-482.
- **Aulehla, A., Wehrle, C., Brand-Saberi, B., Kemler, R., Gossler, A., Kanzler, B., Herrmann, G.** (2003) Wnt3a plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis. *Dev. Cell* 4, 395-406.
- **Barker, N., Morin, P. J., Clevers, H.** (2000) The Yin-Yan of TCF/ β -Catenin Signaling. *Advances in Cancer Research* 77, 1-24.
- **Boland, G. M., Perkins, G., Hall, D. J., Tuan, R. S.** (2004) Wnt3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* 93, 1210-1230.
- **Brannon, M., Gomperts, M., Sumoy, L., Moon, R. T., Kimelman, D.** (1997) A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes Dev.* 11, 2359-2370.
- **Brantjes, H., Barker, N., van Es, J., Clevers, H.** (2002) TCF: lady justice casting the final verdict on the outcome of Wnt signalling. *Biol. Chem.* 383, 255-261.
- **Bruhn, L. Munnerlyn, A., Grosschedl, R.** (1997) ALY, a context-dependent coactivator of LEF-1 and AML-1, is required for TCR α enhancer function. *Genes Dev.* 11, 640-653.
- **Brunner, E., Peter, O., Schweizer, L., Basler, K.** (1997). Pangolin encodes a Lef-1 homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wingless signal in *Drosophila*. *Nature* 385, 289-833.
- **Cadigan, K. M., Nusse, R.** (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* 11, 3286-3305.
- **Carlsson, P., Waterman, M. L., Jones, K. A.** (1993) The hLEF/TCF-1 α HMG protein contains a context-dependent transcriptional activation domain that induces the TCR alpha enhancer in T cells. *Genes Dev.* 7, 2418-2430.
- **Chang, C., and Hemmati-Brivanlou, A.** (1998) Neural crest induction by Xwnt7B in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 194, 129-134.
- **Chen, G., Fernandez, J., Mische, S., Courey, A. J.** (1999) A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev.* 13, 2218-2230.

- **Cho, E. A. and Dressler, G. R.** (1998) Tcf-4 binds β -Catenin and is expressed in distinct regions of the embryonic brain. *Mech. Dev.* 77, 9-18.
- **Chu, D. T., Klymkowsky, M. W.** (1989) The appearance of acetylated alpha-tubulin during early development and cellular differentiation in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 136, 104-117.
- **Crossley, P. H., Martinez, S. and Martin, G. R.** (1996) Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature* 380, 66-68.
- **Daudet, N., Ripoll, C., Moles, J. P., Rebillard, G.** (2002) Expression of members of Wnt and Frizzled gene families in the postnatal rat cochlea. *Brain Res Mol Brain Res* 105, 98-107.
- **De Robertis, E. M. & Kuroda, H.** (2004) Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 285-308.
- **Dorsky, R. I., Itoh, M., Moon, R. T., Chitnis, A.** (2003) Two tcf3 genes cooperate to pattern the zebrafish brain. *Development* 130, 1937-1947.
- **Galceran, J., Farinas, L., Depew, M. J., Clevers, H., Grosschedl, R.** (1999) Wnt3a^{-/-} like phenotype and limb deficiency in Lef^{-/-}Tcf1^{-/-} mice. *Genes Dev.* 13, 709-719.
- **Galceran, J., Miyashita-Lin, E. M., Devaney, E., Rubenstein, J. L. R., Grosschedl, R.** (2000) Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF-1. *Development* 127, 469-482.
- **Galceran, J., Sustmann, C., Hsu, S.-H., Folberth, S., Grosschedl, R.** (2004) LEF1-mediated regulation of *Delta-like1* links Wnt and Notch signaling in somitogenesis. *Genes Dev.* 18, 2718-2723.
- **Giese, K., Cox, J., Grosschedl, R.** (1992) The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell* 69, 185-195.
- **Giese, K., Kingsley, C., Kirshner, J., Grosschedl, R.** (1995) Assembly and function of a TCR α enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. *Genes Dev.* 9, 995-1008.
- **Gilbert, S. F.** (2003) *Developmental Biology*, Seventh Edition. Sinauer USA
- **Glinka, A., Wu, W., Onichtchouk, D., Blumenstock, C., Niehrs, C.** (1997) Head induction by simultaneous repression of Bmp and Wnt signalling in *Xenopus*. *Nature* 389, 517-519.

- **Gloster, A., Wu, W., Speelman, A., Weiss, S., Causing, C., Pozniak, C., Reynolds, B., Chang, E., Toma, J. G., Miller, F. D.** (1994) The T alpha 1 alpha-tubulin promoter specifies gene expression as a function of neuronal growth and regeneration in transgenic mice. *J. Neurosci.* 14, 7319-7330.
- **Goodman, R. H. and Smolik, S.** (2000) CBP/p300 in cell growth, transformation and development. *Genes Dev.* 14, 1553-1577.
- **Gould, A., Itasaki, N., Krumlauf, R.** (1998) Initiation of rhombomeric Hoxb4 expression requires induction by somites and a retinoid pathway. *Neuron* 21, 39-51.
- **Gradi, D. and Wedlich, D.** (1999) The nuclear endpoint of the oncogenic wnt/ β -catenin pathway: How to achieve specificity. *Recent Research Developments in Molecular & Cellular Biology*. S. G. Pandalai, Editor.
- **Gradi, D., König, A., Wedlich, D.** (2002) Functional diversity of Xenopus lymphoid enhancer factor/T-cell factor transcription factors relies on combinations of activating and repressing elements. *J. Biol. Chem.* 277, 14159-14171.
- **Gradi, D., Köhl, M., Wedlich, D.** (1999) The Wnt/Wg signal transducer beta-catenin controls fibronectin expression. *Mol Cell Biol.* 19, 5576-5587.
- **Graham, T. A., Weaver, C., Mao, F., Kimelman, D., Xu, W.** (2000) Crystal structure of a β -Catenin/Tcf complex. *Cell* 103, 885-896.
- **Gregorieff, A., Grosschedl, R., Clevers, H.** (Hindgut defects and transformation of the gastro-intestinal tract in Tcf4(-)/Tcf1(-) embryos. *EMBO J.* 23, 1825-1833.
- **Grosschedl, R., Giese, K., Pagel, J.** (1994) HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet.* 10, 94-100.
- **Grunz, H. und Tacke, L.** (1989) Neural differentiation of *Xenopus laevis* ectoderm takes place after disaggregation and delayed reaggregation without inducer. *Cell Differ. Dev.* 28, 211-217.
- **Harland, R.** (2000) Neural induction. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 357-362.
- **Hecht, A., Vleminckx, K., Stemmler, M. P., van Roy, F., Kemler, R.** (2000) The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of β -catenin in vertebrates. *EMBO J.* 19, 1839-1850.

- **Hemmati-Brivanlou, A. & Melton, D.** (1997) Vertebrate neural induction. *Annu. Rev. Neuroscience.* 20, 43-60.
- **Hemmati-Brivanlou, A., Kelly, O. G. & Melton, D. A.** (1994) Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* 77, 283-295.
- **Herder-Lexikon der Biologie**, Spektrum akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford 1994.
- **Herrmann, M.** (2003) Die Funktion von XTcf-4 in der Gehirnentwicklung von *Xenopus laevis*, Diplomarbeit.
- **Hongo, I., Kengaku, M., Okamoto, H.** (1999) FGF signaling and the anterior neural induction in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 216, 561-581.
- **Houston, D. W., Kofron, M., Resnik, E., Langland, R., Destree, O., Wylie, C., Heasman, J.** (2002) Repression of organizer genes in dorsal and ventral *Xenopus* cells mediated by maternal XTcf-3. *Development* 129, 4015-4025.
- **Hovanes, K., Li, T. W., Muguia, J. E., Truong, T., Milovanovic, T., Lawrence Marsh, J., Holcombe, R. F., Waterman, M. L.** (2001) β -Catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nat. Genet.* 28, 53-57.
- **Hurlstone, A., and Clevers, H.** (2002) T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *EMBO* 21, 2303-2311.
- **Ikeya, M. and Takada, S.** (1998) Wnt signaling from the dorsal neural tube is required for the formation of the medial dermomyotome. *Development* 125, 4969-4976.
- **Ille, F. und Sommer, L.** (2005) Wnt signaling: multiple functions in neural development. *CMLS* 62, 1-9.
- **Irving, C. and Mason, I.** (2000) Signalling by FGF8 from the isthmus patterns anterior hindbrain and establishes the anterior limit of Hox gene expression. *Development* 127, 177-186.
- **Ishitani, T., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K.** (2003) Regulation of lymphoid enhancer factor 1/T-cell factor by mitogen-activated protein kinase-related Nemo-like kinase-dependent phosphorylation in Wnt/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol.* 23, 1379-1389.

- **Kengaku, M. and Okamoto, H.** (1995) bFGF as a possible morphogen for the anteroposterior axis of the central nervous system in *Xenopus*. *Development* 121, 3121-3130.
- **Kiecker, C. and Niehrs, C.** (2001) A morphogen gradient of Wnt/ β -catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in *Xenopus*. *Development* 128, 4189-4201.
- **Kim, C. H., Oda, T., Itoh, M., Jang, D., Bruk Artinger, K., Chandrasekharappa, S. C., Driever, W., Chitnis, A. B.** (2000) Repressor activity of headless/Tcf3 is essential for vertebrate head formation. *Nature* 407, 913-916.
- **Koblar, S. A., Murphy, M., Barrett, G. L., Underhill, A., Gros, P., Bartlett, P. F.** (1999) Pax3 regulates neurogenesis in neural crest-derived precursor cells. *J. Neurosci. Res.* 56, 518-530.
- **Kolm, P. J., Apekin, V., Sive, H.** (1997) *Xenopus* hindbrain patterning requires retinoid signaling. *Dev. Biol.* 192, 1-16.
- **König, A.** (2003) Isolierung und Charakterisierung des Transkriptionsfaktors XTcf-4 in *Xenopus laevis*, Diplomarbeit
- **König, A., Gradl, D., Köhl, M., Wedlich, D.** (2000) The HMG-box transcription factor XTcf-4 demarcates the forebrain-midbrain boundary. *Mech. Dev.* 93, 211-214.
- **Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donsellar, E., Huls, G., Peters, P. J., Clevers, H.** (1998b) Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat. Genet.* 19, 379-383.
- **Korinek, V., Barker, N., Willert, K., Molenaar, M., Roose, J., Wagenaar, G., Markman, M., Lamers, W., Destree, O., Clevers, H.** (1998a) Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Mol. Cell. Biol.* 18, 1248-1256.
- **Kratochwil, K., Galceran, J., Tontsch, S., Roth, W., Grosschedl, R.** (2002) FGF4, a direct target of LEF1 and Wnt signaling, can rescue the arrest of tooth organogenesis in *Lef1*^{-/-} mice. *Gen. Dev.* 16, 3173-3815.
- **Kroll, K. L. & Amaya, E.** (1996) Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development* 122, 3173-3183.

- **Kunz, M.** (2002) Einfluss von Xwnt-2b auf die Musterung des Vorder- und Mittelhirn während der Embryogenese von *Xenopus laevis*, Diplomarbeit
- **Kunz, M., Herrmann, M., Wedlich, D., Gradl, D.** (2004) Autoregulation of canonical Wnt signaling controls midbrain development. *Dev. Biol.* 273, 390-401.
- **Labbe, E., Letamendia, A., Attisano, L.** (2000) Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor- β and wnt pathways. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 97, 8358-8363.
- **Ladher, R. K., Anakwe, K. U., Gurney, A. L., Schoenwolf, G. C., Francis-West, P. H.** (2000) Identification of synergistic signals initiating inner ear development. *Science* 290, 1904-1905.
- **Lamb, T. M. et al.** (1993) Neural induction by the secreted polypeptide noggin. *Science* 262, 713-718.
- **Landesmann, Y., Goodenough, D. A., Paul, D. L.** (2002) Xwnt-2 (Xwnt-2b) is maternally expressed in *Xenopus* oocytes and embryos. *Biochem. Biophys. Acta* 1576, 265-268.
- **Lattanzio, R.** (2004) Isolierung und Charakterisierung des XTcf-4-Promotors. Diplomarbeit.
- **Laurent, M. N., Blitz, I. L., Hashimoto, C., Rothbacher, U., Cho, K. W.** (1997) The *Xenopus* homeobox gene twin mediates Wnt induction of goosecoid in establishment of Spemann's organizer. *Development* 124, 4905-4916.
- **Lee, K. J. and Jessell, T. M.** (1999) The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 261-294.
- **Lin, R., Thompson, S., Priess, J. R.** (1995) pop-1 encodes an HMG box protein required for the specification of a mesoderm precursor in early *C. elegans* embryos. *Cell* 83, 599-609.
- **Logan, C. Y. and Nusse, R.** (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 781-810.
- **Lumsden, A. and Krumlauf, R.** (1996) Patterning the Vertebrate Neuraxis. *Science* 274, 1109-1115.

- **Lyu, J., Joo, C. K.** (2005) Wnt-7a up-regulates matrix-metalloproteinase-12 expression and promotes cell proliferation in corneal epithelial cells during wound healing. *J. Biol. Chem.* Mar. 31.
- **Maden, M., Gale, E., Kostetskii, I., Zile, M.** (1996) Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. *Curr. Biol.* 6, 417-426.
- **Mayor, R., Guerrero, N., Martinez, C.** (1997) Role of FGF and noggin in neural crest induction. *Dev. Biol.* 189, 1-12.
- **Mayor, R., Morgan, R., Sargent, M. G.** (1995) Induction of the prospective neural crest of *Xenopus*. *Development* 121, 767-777.
- **McGrew, L. L., Takemaru, K.-L., Bates, R., Moon, R. T.** (1999) Direct regulation of the *Xenopus* engrailed-2 promoter by the wnt signaling pathway, and a molecular screen for wnt-responsive genes, confirm a role for wnt signaling during neurals patterning in *Xenopus*. *Mech. Dev.* 87, 21-32.
- **McKendry, R., Hsu, S. C., Harland, R. M., Grosschedl, R.** (1997) LEF-1/TCF proteins mediate wnt-inducible transcription from the *Xenopus* nodal-related 3 promoter. *Dev Biol.* 192, 420-431.
- **McMahon, A. P., Bradley, A.** (1990) The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 62, 1073-1085.
- **McMahon, A. P., Joyner, A. L., Bradley, A., McMahon, J. A.** (1992) The midbrain-hindbrain phenotype of Wnt-1/Wnt-1-mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell* 69, 581-595.
- **Megason, S. G., McMahon, A. P.** (2002) A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development* 129, 2087-2098.
- **Merrill, B. J., Pasolli, H. A., Polak, L., Rendl, M., Garcia-Garcia, M. J., Anderson, K. V., Fuchs, E.** (2003) Tcf3: a transcriptional regulator of axis induction in the early embryo. *Development* 131, 263-274.
- **Molenaar, M., Roose, J., Peterson, J., Venanzi, S., Clevers, H., Destree, O.** (1998) Differential expression of the HMG box transcription factors XTcf-3 and XLef-1 during early *xenopus* development. *Mech Dev.* 75, 151-154.

- **Münsterberg, A. E., Kitajewski, J., Bumcrott, D. A., McMahon, A. P., Lassar, A. B.** (1995) Combinatorial signaling by sonic hedgehog and Wnt family members induce myogenic bHLH gene expression in the somite. *Genes Dev.* 9, 2911-2922.
- **Muhr, J., Jessell, T. M., Edlund, T.** (1997) Assignment of early caudal identity to neural plate cells by a signal from caudal paraxial mesoderm. *Neuron* 19, 487-502.
- **Munoz-Sanjuan, I., Brivanlou, A. H.** (2002) Neural Induction, the default model and embryonic stem cells. *Nature Reviews Neuroscience* 3, 271-280.
- **Nieuwkoop, P. D. und Faber, J.** (1967) Normtabelle von *Xenopus laevis*. Elsevier North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- **Ohuchi, H., Yasue, A., Ono, K., Sasaoka, S., Tomonari, S., Takagi, A., Itakura, M., Moriyama, K., Noji, S., Nohno, T.** (2005) Identification of cis-element regulating expression of the mouse Fgf10 gene during inner ear development. *Dev. Dyn.* 233, 177-187.
- **Oosterwegel M., van de Wetering, M., Clevers, H.** (1993) HMG box proteins in early T-cell differentiation. *Thymus* 22, 67-81.
- **Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B., 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.
- **Pukrop, T., Gradl, D., Henningfeld, K. A., Knöchel, W., Wedlich, D., Kühl, M.** (2001) Identification of two regulatory elements within the high mobility group box Transcription factor XTcf-4. *J. Biol. Chem.* 276, 8968-8978.
- **Rocheleau, C. E., Yasuda, J., Shin, T. H., Lin, R., Sawa, H., Okano, H., Priess, J. R., Davis, R. J., Mello, C. C.** (1999) WRM-1 activates the LIT-1 protein kinase to transduce anterior/posterior polarity signals in *C. elegans*. *Cell* 97, 717-726.
- **Roel, G., Hamilton, F. S., Yoony, G., Bain, A. A., Destree, O., Hoppler, S.** (2002) Lef-1 and Tcf-3 transcription factors mediate tissue-specific Wnt signaling during *Xenopus* development. *Curr. Biol.* 12, 1941-1945.
- **Roose, J., Hulst, 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-Tcf4 target Tcf1. *Science* 285, 1923-1926.

- **Roose, J., Molenaar, M., Peterson, J., Hurenkamp, J., Brantjes, H., Moerer, P., van de Wetering, M., Destree, O., Clevers, H.** (1998) The *Xenopus* Wnt effector Tcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* 395, 608-612.
- **Rowitch, D. H. and McMahon, A. P.** (1995) Pax2 expression in the murine neural plate precedes and encompasses the expression domains of Wnt-1 and En-1. *Mech. Dev.* 52, 3-8.
- **Rubenstein, J. L. and Puelles, L.** (1994) The embryonic vertebrate forebrain: The prosomeric model. *Science* 266, 578-580.
- **Rubenstein, J. L. and Shimamura, K.** (1997) Regulation and patterning and differentiation in the embryonic vertebrate forebrain. In "Molecular and Cellular Approaches to Neural Development" (W. M. Cowan, T. M. Jessell, and S. L. Zipursky, Eds.) pp. 356-390. Oxford University Press, New York.
- **Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F., Grosschedl, R.** (2001) PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev.* 15, 3088-3103.
- **Saint-Jeannet, J. P., He, X., Varmus, H. E., Dawid, I. B.** (1997) Regulation of dorsal fate in the neuraxis by Wnt-1 and Wnt-3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13713-13718.
- **Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H. & De Robertis, E. M.** (1995) Regulation of neural induction by the Chd and Bmp-4 antagonistic patterning signals in *Xenopus*. *Nature* 376, 333-336.
- **Schambony, A., Kunz, M., Gradl, D.** (2004) Cross-regulation of Wnt signaling and cell adhesion. *Differentiation* 72, 307-318.
- **Schmidt, M., Patterson, M., Farrell, E., Münsterberg, A.** (2004) Dynamic expression of Lef/Tcf family members and β -Catenin during chick gastrulation, neurulation, and early limb development. *Dev. Dyn.* 229, 703-707.
- **Schohl, A. and Fagotto, F.** (2002) β -Catenin, MAPK and Smad signalling during early *Xenopus* development. *Development* 129, 37-52.
- **Shimamura, K. and Rubenstein, J. L.** (1997) Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* 124, 2709-2718.

- **Sive, H. L., Hattori, K., Weintraub, H.** (1989) Progressive determination during formation of the anteroposterior axis in *Xenopus laevis*. *Cell* 58, 171-180.
- **Spemann, H. and Mangold, H.** (1924) Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. In B. H. Willier and J. M. Oppenheimer (eds.) *Foundations of Experimental Embryology*. Hafner, New York, pp. 144-184.
- **Stern, C. D.** (2001) Initial patterning of the central nervous system: how many organizers? *Nature Reviews Neuroscience* 2, 92-98.
- **Stern, H. M., Brown, A. M. C., Hauschka, S. D.** (1995) Myogenesis in paraxial mesoderm: Preferential induction by dorsal neural tube and by cells expressing Wnt-1. *Development* 121, 3675-3686.
- **Stevens, C. B., Davies, A. L., Battista, S., Lewis, J. H., Fekete, D. M.** (2003) Forced activation of Wnt signaling alters morphogenesis and sensory organ identity in the chicken inner ear. *Dev. Biol.* 261, 149-164.
- **Takamaru, K. I. and Moon, R. T.** (2000) The transcriptional coactivator CBP interacts with β -catenin to activate gene expression. *J. Cell Biol.* 149, 249-254.
- **Thomas, K. R., Capecchi, M. R.** (1990) Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development. *Nature* 346, 847-850.
- **Tsuda, H., Sasai, N., Matsuo-Takasaki, M., Sakuragi, M., Murakima, Y., Sasai, Y.** (2002) Dorsalization of the neural tube by *Xenopus* tiarin, a novel patterning factor secreted by the flanking nonneural head ectoderm. *Neuron* 33, 515-528.
- **Valenta, T., Lukas, J., Korinek, V.** (2003) HMG box transcription factor TCF-4's interaction with CtBP1 controls the expression of the Wnt target Axin2/Conductin in human embryonic kidney cells. *Nucleic Acids Res.* 31, 2369-2380.
- **van Beest, M., Dooijes, D., van de Wetering, M., Kjaerulff, S., Bonvin, A., Nielsen, O., Clevers, H.** (2000) Sequence-specific high mobility group box factors recognize 10-12 base pair minor groove motifs. *J. Biol. Chem.* 275, 27266-27273.

- **van de Wetering, M., Castrop, J., Korinek, V., Clevers, H.** (1996) Extensive alternative splicing and dual promotor usage generate Tcf-1 protein isoforms with differential transcription control properties. *Mol. Cell Biol.* 16, 745-752.
- **van der Wees, J., Schilthuis, J. G., Koster, C. H., Diesveld-Schipper, H., Folkers, G. E., van der Saag, P. T., Dawson, M. I., Shudo, K., van der Burg, B., Durston, A. J.** (1998) Inhibition of retinoic acid receptor-mediated signalling alters positional identity in the developing hindbrain. *Development* 125, 545-556.
- **van Genderen, C., Okamura, R. M., Farinas, I., Quo, R. G., Parslow, T. G., Bruhn, L., Grosschedl, R.** (1994) Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interaction is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes Dev.* 8, 2691-2703.
- **van Noort, M. and Clevers, H.** (2002) TCF transcription factors, mediators of Wnt-signaling in development and cancer. *Dev. Biol.* 244, 1-8.
- **Verbeek, S., Izon, D., Hifhuis, F., Robanus-Maandag, E., te Riele, H., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Wilson, A., MacDonald, H. R., Clevers, H.** (1995) A HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation. *Nature* 374, 70-74
- **Vleminckx, K., Kemler, R., Hecht, A.** (1999) The C-terminal transactivation domain of beta-catenin is necessary and sufficient for signaling by the LEF-1/ β -catenin complex in *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* 81, 65-74.
- **Wassarman, K. M. et al.** (1997) Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid-hindbrain organizer is dependent of Gbx2 gene function. *Development* 124, 2923-2934.
- **Weigert, C., Brodbeck, K., Lehmann, R., Haring, H. U., Schleicher, E. D.** (2001) Overexpression of glutamine:fructose-6-phosphate-amidotransferase induces transforming growth factor-beta1 synthesis in NIH-3T3 fibroblasts. *FEBS Lett.* 488, 95-99.
- **Wessely, O. and De Robertis, E. M.** (2002) Neural Plate patterning by secreted signals. *Neuron* 33, 489-494.
- **Wilson, P. A. and Hemmati-Brivanlou, A.** (1995) Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. *Nature* 376, 331-333.
- **Wilson, S. I. and Edlund, T.** (2001) Neural induction: toward a unifying mechanism. *Nature Neuroscience.* 4, 1161-1167.

- **Wurst, W. and Bally-Cuif, L.** (2001) Neural plate patterning: Upstream and downstream of the isthmic organizer. *Nature Reviews Neuroscience* 2, 99-108.
- **Yamamoto, H., Ihara, M., Matsuura, Y., Kikuchi, A.** (2003) Sumoylation is involved in beta-catenin-dependent activation of Tcf-4. *EMBO J.* 22, 2047-2059.
- **Young, R. M., Reyes, A. E., Allende, M. L.** (2002) Expression and splice variant analysis of the zebrafish tcf4 transcription factor. *Mech. Dev.* 117, 269-273.
- **Yun, M. S., Kim, S. E., Jeon, S. H., Lee, J. S., Choi, K. Y.** (2005) Both ERK and Wnt/beta-catenin pathways are involved in Wnt3a-induced proliferation. *J. Cell. Sci.* 118, 313-322.
- **Zimmermann, L. B., De Jesus-Escobar, J. M., Harland, R. M.** (1996) The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86, 599-606.

9. Anhang

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Mitarbeitern des Zoologischen Instituts II herzlich danken, die mich mit Rat und Tat unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Frau **Prof. Dr. Doris Wedlich**, für die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Institut für Entwicklungs- und Tierphysiologie anzufertigen.

Herrn **Dr. Dietmar Gradl** für eine Betreuung wie man sie sich nur wünschen kann; für die stetige Hilfsbereitschaft, Unterstützung und Beratung und für das große persönliche Engagement. Ohne ihn wäre diese Arbeit in der vorliegenden Form nicht zustande gekommen.

Herrn **PD. Dr. Bernd Sures**, Institut für Parasitologie und Ökologie, Universität Karlsruhe, für die Übernahme des Co-Referates.

Stefanie van Venrooy für die gute Zusammenarbeit und ihre Hilfe bei den zahllosen Plasmid-Präparationen.

Den anderen Mitgliedern der „AG Gradl“ **Michael Herrmann, Stephen Mbiga Ghogomu, Ariane Tomsche, Sabrina König** und **Martin Ritthaler** für ihre Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima.

Monika Dicker, Melanie Hill und **Mareen Welzel**, den „guten Geistern“ des Instituts, für ihre Arbeit im Hintergrund, die Versorgung der Frösche und all die anderen wichtigen Dinge die sie erledigen.

Publikationen

Veröffentlichungen:

- **Kunz, M., Herrmann, M., Wedlich, D., Gradi, D.** (2004). Autoregulation of canonical Wnt signaling controls midbrain development. *Dev. Biol.* 273, 390-401.
- **Schambony, A., Kunz, M., Gradi, D.** (2004). Cross-regulation of Wnt signaling and cell adhesion. *Differentiation* 72, 307-318.
- **Etard, C., Gradi, D., Kunz, M., Eilers, M., Wedlich, D.** (2005). Pontin and Reptin regulate cell proliferation in early *Xenopus* embryos in collaboration with c-Myc and Miz1. *Mech. Dev.* 122, 545-556.

Poster:

- **Kunz, M., Gradi, D., König, A., Wedlich, D.:** Xwnt-2b and Tcf-4 regulate brain patterning in *Xenopus laevis*. 4th GfE-School. Günzburg, Oktober, 2002.
- **Kunz, M., Gradi, D., Herrmann, M., Wedlich, D.:** Brain-patterning in *Xenopus laevis*: the endogenous role of Xwnt-2b. DGZ – annual meeting of cell biology and development. Bonn, März 2003.
- **Van Venrooy, S., Kunz, M., Wedlich, D., Gradi, D.:** Lef/Tcf transcription factors modulate the specification of neural tissue. DGZ – annual meeting of cell biology and development. Heidelberg, März 2005.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Martin Kunz
Geburtsdatum: 02. August 1972
Geburtsort: Karlsruhe
Familienstand: ledig

Schulbildung: 1979 – 1988 Grund- und Hauptschule, Johann-Peter-Hebel-Schule, Schöllbronn

1988 – 1990 Wirtschaftsschule, Wilhelm-Röpke-Schule, Ettlingen

1990 – 1993 Agrarwissenschaftliches Gymnasium, Bertha von Suttner-Schule, Ettlingen

Zivildienst: 1993 – 1995 bei der Bezirksstelle für Naturschutz und Landschaftspflege in der damaligen Vogelschutzwarte Baden Württemberg, Karlsruhe

Studium: 1995 – 2002 Biologiestudium an der Universität Karlsruhe (TH)
Hauptfächer: Zoologie, Genetik
Nebenfächer: Umwelttoxikologie, Paläontologie

Diplomarbeit: 08.2001 – 04.2002 am Institut für Molekulare Entwicklungs- und Zellphysiologie, Universität Karlsruhe:
Einfluss von Xwnt-2b auf die Musterung des Vorder- und Mittelhirn während der Embryogenese von *Xenopus laevis*

Promotion: seit 07.2002 am Institut für Molekulare Entwicklungs- und Zellphysiologie, Universität Karlsruhe:
Die Rolle der Lef/Tcf-Transkriptionsfaktoren in der Gehirnentwicklung von *Xenopus laevis*

