

**Identifizierung spezifischer Eigenschaften
individueller LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren
in der Neuralentwicklung 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

Stephanie van Venrooy
aus Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referentin: Prof. Dr. Doris Wedlich

Korreferent: Prof. Dr. Holger Puchta

Tag der mündlichen Prüfung: 04. - 08. Februar 2008

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde im Institut für molekulare Entwicklungs- und Zellphysiologie (Zoologie II) der Universität Karlsruhe in der Zeit von Oktober 2004 bis Oktober 2007 durchgeführt.

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

Stephanie van Venrooy, Dezember 2007

Verwendete Abkürzungen

Neben den verwendeten SI-Einheiten werden die folgenden Abkürzungen verwendet:

(v/v)	Volumen-Volumen-Verhältnis
(w/v)	Gewichts-Volumen-Verhältnis
AGR	Anterior Gradient
ARE	AU-reiche Elemente
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BCNE Center	Blastula BMP und Noggin exprimierendes Zentrum
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaare
cDNA	complementary DNA
Cirp	Cold-inducible RNA-binding Protein
CtBP	C-terminales Bindeprotein
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
ELAV	Embryonic Lethal, Abnormal Vision
Ela/HuR	ELAV-like RNA-binding Protein A/Hu-Antigen R
FGF	Fibroblast Growth Factor
Grg/TLE	Groucho/Transducin-like Enhancer of Split
<i>hdl</i>	<i>headless</i>
HMG	High Mobility Group
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein
IPTG	Isopropyl- β D-Thiogalactopyranosid
LB	Luria Bertani-Medium
LEF	Lymphoid Enhancer Factor
MBSH	Modified Barth's Solution mit HEPES
MEM	Modified Eagle's Medium
MO	Morpholino-Oligonukleotid
MOPS	3-Morpholino-Propansulfonsäure
NBT	4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NLS	Nuclear Localization Signal
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPE	Prä-Plakoden-Ektoderm
RNP	Ribonukleoprotein

RRM	RNA Recognition Motif
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
tBR	trunkierter BMP-Rezeptor
TCF	T-Cell Enhancer Factor
UTR	Untranslated Region
UV	ultra-violett
Wnt	Wingless/INT-related
<i>Xbra</i>	<i>Xenopus brachyury</i>
Xk	<i>Xenopus</i> -Keratin
<i>Xnr3</i>	<i>Xenopus nodal-related 3</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die LEF/TCF-Familie	1
1.2	Expression und Funktion von Tcf3 und Tcf4	3
1.2.1	Expression von <i>Tcf3</i>	3
1.2.2	Phänotypische Auswirkungen der Depletion von Tcf3	5
1.2.3	Expression von <i>Tcf4</i>	7
1.2.4	Phänotypische Auswirkungen der Depletion von Tcf4	9
1.3	Neuralinduktion und Musterung des Ektoderms	11
2	Zielsetzung der Arbeit	17
3	Materialien	18
4	Methoden	29
4.1	Entwicklungsbiologische und Immunbiologische Methoden	29
4.1.1	Tierhaltung	29
4.1.2	Eiablage	29
4.1.3	Testisextraktion	29
4.1.4	<i>In-vitro</i> -Fertilisation	30
4.1.5	Entfernen der Gallerthülle	30
4.1.6	Mikroinjektion	30
4.1.7	Embryonenpflege	31
4.1.8	Präparation ektodermaler Explantate (animale Kappen)	31
4.1.9	Präparation von Explantaten der dorsalen Marginalzone	32
4.1.10	Embryoneneinbettung in Gelatine und Anfertigung von Gefrierschnitten	32
4.1.11	Immunfärbung auf Cryoschnitten	33
4.1.12	Ganzkeimfärbung – Whole mount <i>in situ</i> -Hybridisierung	33
4.1.13	Embryoneneinbettung in Agarose und Anfertigen von Vibratomschnitten	35
4.2	Proteinbiochemische Methoden	35
4.2.1	Proteinextraktion aus Embryonen	35
4.2.2	Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	36
4.2.3	Proteinanalyse mittels Western Blot	37
4.3	Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden	38
4.3.1	Restriktionsanalyse von DNA	38
4.3.2	Fällung und Reinigung von DNA und RNA	38
4.3.3	Analytische Flachbett-Gelelektrophorese	39

4.3.4	Präparative Flachbett-Gelelektrophorese	40
4.3.5	Ligation von DNA-Fragmenten	40
4.3.6	Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien	41
4.3.7	Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien.....	41
4.3.8	Blau-Weiß-Selektion.....	41
4.3.9	Isolierung bakterieller Plasmid-DNA im Klein- und Mittelmaßstab	42
4.3.10	TELT-Plasmid-Präparation.....	43
4.3.11	<i>In-vitro</i> -Transkription	43
4.3.12	RNA-Isolierung aus Embryonen bzw. Explantaten	43
4.3.13	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	44
4.3.14	cDNA-Synthese.....	45
4.3.15	Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels PCR.....	45
4.4	Identifizierung putativer Zielgene	45
4.4.1	Dot Blot.....	45
4.4.2	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mittels PCR.....	46
4.4.3	Radioaktive Markierung mit dem „Random Primed DNA Labeling Kit“	46
4.4.5	Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde	47
4.5	Ermittlung des mRNA/Gesamt-RNA-Verhältnisses.....	47
4.5.1	Synthese radioaktiv markierter cDNA.....	47
4.5.2	Auftrennung der radioaktiv markierten cDNA-Fragmente mittels Polyacrylamidgelelektrophorese	48
5	Ergebnisse.....	49
5.1	Durchmustern der Tcf3-Zielgen- und der Tcf4-Zielgen-cDNA-Bank	49
5.1.1	Klassifizierung	49
5.2	Identifizierung der potentiellen Zielgene	51
5.2.1	Identifizierung im Southern Blot.....	51
5.2.2	Identifizierung durch Sequenzanalyse	52
5.3	Einordnung der putativen Zielgene	52
5.4	Verifizierung der Kandidatengene.....	58
5.4.1	Verifizierung der Kandidatengene in Neurula-Embryonen.....	58
5.4.2	Verifizierung in neuralisierten animalen Kappen	61
5.4.3	Untersuchung des räumlichen und zeitlichen Expressionsmusters der Kandidatengene	65
5.4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Verifizierung der Kandidaten	71

5.5	Cirp als Tcf3-Zielgen	74
5.5.1	Cirp ist mit Tcf3 kolokalisiert	74
5.5.2	Cirp ist vom endogen vorhandenen Tcf3 abhängig.....	77
5.5.3	Cirp ist ein Tcf3-spezifisches Zielgen	77
5.5.4	Cirp ist in neuralisierten animalen Kappen ein Wnt-unabhängiges Zielgen	78
5.5.5	Cirp-Konstrukte für Funktionsgewinn- und Funktionsverlust-Studien	79
5.5.6	Funktionsverlust von Cirp und von Tcf3 führt zu vergleichbaren Phänotypen.....	83
5.6	Cirp-Funktion	87
5.6.1	Endogenes Cirp ist nicht für die konvergente Extension erforderlich.....	87
5.6.2	Endogenes Cirp wird für die Proliferation benötigt	88
5.6.3	Endogenes Cirp stabilisiert mRNAs.....	89
6	Diskussion	92
6.1	Phänotypische Auswirkung der Tcf3-Depletion	92
6.2	Tcf3 und Tcf4 haben Subtyp-spezifische Zielgene	95
6.2.1	Zytoskelett-assoziierte Zielgene.....	97
6.2.2	Zementdrüsen-spezifische Zielgene.....	98
6.2.3	Chromatin-assoziierte Zielgene.....	98
6.2.4	RNA-assoziierte Zielgene.....	101
6.3	Cirp.....	103
6.3.1	Regulation der Cirp-Expression.....	103
6.3.2	Funktion von Cirp.....	105
6.3.3	Molekulare Mechanismen der Cirp-Funktion.....	107
7	Zusammenfassung	111
8	Literatur.....	112
Anhang	124	
Anhang-Tabellen.....	124	
Anhang-Literatur	128	
Danksagung	129	
Publikationen.....	130	
Lebenslauf	131	

1 Einleitung

1.1 Die LEF/TCF-Familie

Die Transkriptionsfaktoren der LEF/TCF-Familie (Lymphoid enhancer factor, LEF/T-cell enhancer factor, TCF) sind evolutionär hoch konserviert und kommen von Cnidariern über Nematoden und Dipteren bis hin zu Vertebraten vor. Während *Hydra*, *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila* jeweils nur ein LEF/TCF-Ortholog aufweisen (Hobmayer et al., 2000; Lin et al., 1995; Brunner et al., 1997), besteht die LEF/TCF-Familie in *Xenopus*, Zebrafisch und bei Amnioten aus den vier Mitgliedern Tcf3, Tcf4, Tcf1 und Lef1 (Abb. 1).

Die Vertreter der LEF/TCF-Familie sind sequenz-spezifisch DNA-bindende Transkriptionsfaktoren, die den Wnt/ β -Catenin-Signalweg im Kern vermitteln, indem sie β -Catenin rekrutieren. Während die LEF/TCFs in der Lage sind, spezifisch an Zielsequenzen zu binden, verfügt β -Catenin über die Transkriptionsaktivierungsdomäne, um Zielgen-Promotoren zu aktivieren (Brannon et al., 1997).

Mit ihrer hoch konservierten N-terminalen β -Catenin-Bindungsdomäne sind alle LEF/TCFs in der Lage, β -Catenin zu binden (Behrens et al., 1996; Huber et al., 1996; Molenaar et al., 1996). Daneben verfügen sie über ein Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal, NLS) (Prieve et al., 1998) und eine unter den Mitgliedern zu annähernd 100% identische High-Mobility-Group-(HMG)-DNA-Bindungsdomäne, welche in der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix die Konsensus-Sequenz CTTTGT/AT/A erkennt (van de Wetering und Clevers, 1992). Diese Bindung hat eine starke Krümmung in der DNA zur Folge, welche ebenfalls zur Genregulation beitragen kann (Giese et al., 1995).

Interessanterweise vermittelt die HMG-Box neben der Bindung an die DNA auch die Kooperation mit Smads (*C. elegans* Sma [smaller worms] und *Drosophila* MAD [mother against decapentaplegic] verwandte Proteine), den Effektoren des Transforming Growth Factor β /BMP-Signalwegs (Nishita et al., 2000).

Der Bereich zwischen der β -Catenin-Bindungsdomäne und der HMG-Box wird als Kontext-abhängige regulatorische Domäne (context-dependent regulatory domain, CRD) bezeichnet. Diese Region variiert zwischen den LEF/TCFs und trägt zu ihren Subtyp-spezifischen Eigenschaften bei. So befindet sich in dieser Domäne ein alternativ gespleißtes Exon, das bei XTcf3 und XTcf4 mit dem Korepressor HIC-5 (hydrogen peroxide-induced clone 5) interagieren kann (Ghogomu et al., 2006). Des Weiteren vermittelt das Vorhandensein von zwei kleinen das Exon flankierenden Aminosäure-Motiven die repressiven Eigenschaften der XTcf4-Spleißvarianten XTcf4A und XTcf4B (Gradl et al., 2002; Liu et al., 2005).

β-Catenin

TCF3 1 MPQLNSGGGD-----ELGANDELIRFKDEGE-QEEKSPGEGS---AEGDLADVKSSLVNESENHSSDSDSE-----VERRPPPR-ETF-EKPRDYLSEAFRRQQDAAFFKGPYYA
 TCF4 1 MPQLNGGGGD-----DLGANDEMISFKDEGE-QDEKICPISS---AERDLADVKSSLVNESETHPHSSSDSE-----TERRPPPRPESFRDKSRDSLEDAAKRP-DGGLFKGPTYG
 TCF1 1 MPQMNSAGED-----DLGASDEMISFKDEGD-QEEKIRENGF---TERDLADLKSSLVNESEVASHPRVPETHPEAIRRAQDVQ-LVY-QDKFSAHMEDGIKHQDEGMKSGSGYP
 LEF1 1 MPQL-SGAGGGNGVGGDPCLCATDEMIFFKDEGDPQKEKIYAEISNPEEGLDADIKSSLVNETETIIPSSNSHE-----ISRRLDS-YHE-KSREHEPEDAGKHPDGLYSGKPSYT

Grg/TLE

TCF3 GYP-FLMIPDLGGH-YLPNGALSPSARA-----YLQMKWPLLDSPSTA----GLKDARSPPSAHL-SNKVPVVQHPHHMHLTPLITYSNEHFSPTGPPGHLSPE
 TCF4 GYP-FIMIPDLSS-PYLPNGSLSPTRARQCVNVPLDLHLASCCSPFMQYLQMKWPLLDVQAGSLQGRQGMKDRSPSAHIVSNKVPVVQHPHHVHLTPLITYSNEHFTPGNPPHQLAD
 TCF1 GYP-FLMLSD---PYLSNGSVSA-----L-SNKVPVVQPSHGVHPLIP---YNSSEFSHGSHSPLHPVD
 LEF1 GYPSYIMPMNNEPYMSNGSLSP-----PIP-RT-SNKVPVVQPSHAVHPLTPLITYSDEHFAFGVHPHSHIPSD

Grg/TLE

TCF3 IDPKTGIPRPPHSELSPYYPLSPGAVGQIPHPLGWLVPCQGGQPMYSIPGGFRHPYP-ALAMNASMSLVSSRFSPH--MV-PPHSLHTSGIPHPAIVSPIVKQEPSSGNISPNL--
 TCF4 VDPKTGIPRPPHPPDISPYPLSPGAVGQIPHPLGWLVPCQGGQPVYPIITGGFRHPYPTALTVNASMSLVSSRFSPH--MV--PPHSLHTTGIPHPAIVNPTVKQESSQSDMGSLH--
 TCF1 LNKKQGVHRPSQTPDVPVTFYPLSPGGVGGQISPSMGW---QSQPVYPIPCGFRQPY-----SATMSSGSPYSRFPHPMLLS-P---SMHTTGIPHPAII-----PHSGNKMDMIYE
 LEF1 INTKQGMHRHPQAPDLPTFYPMSPGSGVQMTPLPLGWY-----PHH-MVSGPPGP--HATGIPHPAIVNPTVKQEPHNDNDLHMH--

HIC5

DNA-Bindung

NLS

TCF3 -STKSNVVVKKEE-KKPHIKKPLNAFMYMKEMRAKVVAECTLKESAAINQILGRRWHLSRREEQAKYELPRKERQLHSQLYPSWSARDNYGKKKKRKRKQSPENENYTKTKMVCV
 TCF4 -SSKHQDSKKEEK-KKPHIKKPLNAFMYMKEMRAKVVAECTLKESAAINQILGRRWHALSREEQAKYELARKERQLHMQLYPGWSARDNYGKKKKRKRKQSQEANEHSECYLNPL
 TCF1 RNMKQHSSEPKREKPKPAIKKPLNAFMYMKEMRANVIAECTLKESAAINQILGRRWHALSREEQSKYELARKERQLHMQLYPGWSARDNYGKKKKEKNQRKAPGFQ--FRKKKCIYR
 LEF1 -MKPHHEQRKBQEP-KRPHIKKPLNAFMYMKEMRANVIAECTLKESAAINQILGRRWHALSREEQSKYELARKERQLHMQLYPGWSARDNYGKKKKRKRKQESTSGAGPRMTAAYI

Smads

CtBP

TCF3 HFPSDKSCDSPASSHGMLDSPAATSAALA--SPAAPAATHSEQAQLSLTTKPEARALSHSAFLASKSPSSSSLSGHLSPVGSPLLSRPIPLTSSILSPGVFSPALQALPLLQAO
 TCF4 SLPPITEGKRSFATYKVKAAALARPLQMEAY
 TCF1 YLQEGRCGSPVSSDGSIDSPPSPINSLQCLPSSAYSAKLSSPA-----DTAESAQTFSPPSSSTARSSLSVAGYKGAFLSETVNSKNS
 LEF1

CtBP

TCF3 PLSLVTRSSD 551
 TCF4 482
 TCF1 464
 LEF1 372

Abb. 1 Sequenzvergleich der vier *Xenopus* LEF/TCF-Familien-Mitglieder. Die hochkonservierte β-Catenin-Bindungsdomäne sowie diejenige für die DNA-Bindung und das Kernlokalisations-Signal (nuclear localization signal, NLS) haben alle Vertreter gemeinsam. Des Weiteren sind Bindungsdomänen für gemeinsame und spezifische Interaktionspartner angegeben.

Grg: Groucho; TLE: transducin-like enhancer of split; HIC-5: hydrogen peroxide-induced clone 5; Smad: Konstruktion aus *C. elegans* Sma (smaller worms) und *Drosophila* MAD (mother against decapentaplegic); CtBP: C-terminales Bindeprotein.

Daneben ist allen LEF/TCFs die Proteininteraktion mit den Korepressoren der Groucho-Familie Grg (**groucho related genes**)/TLE(**transducin-like enhancer of split**) gemeinsam, wobei sich diese Bindungsdomäne über einen weiten Bereich der nur wenig konservierten CRD erstreckt (Levanon et al., 1998; Brantjes et al., 2001).

Eine weitere zu den Subtyp-spezifischen Unterschieden beitragende Domäne ist der C-Terminus. In Säugern treten bei allen LEF/TCFs außer Tcf3 alternativ gespleißte C-Termini auf. Bei Tcf1 weist der alternativ vorhandene E-Terminus eine als Cystein-Haken bezeichnete DNA-Bindungsdomäne auf, welche die Aktivierung spezifischer Zielgene vermittelt (Hecht und Stemmler, 2003; Atcha et al., 2007). Der Tcf3 spezifische E-Terminus ist dagegen in der Lage den Korepressor C-terminales Bindeprotein (CtBP) zu rekrutieren. Interessanterweise weist der Tcf4 E-Terminus beide Motive auf und kann damit sowohl die aktivierenden als auch die reprimierenden Funktionen ausüben (Atcha et al., 2007; Valenta et al., 2003). In *Xenopus* zeichnet sich allein XTcf3 durch einen C-Terminus aus, an den der Korepressor C-terminales Bindeprotein (CtBP) binden kann (Brannon et al., 1999).

1.2 Expression und Funktion von *Tcf3* und *Tcf4*

1.2.1 Expression von *Tcf3*

XTcf3-mRNAs kommen bereits maternal vor, wobei sie sich stärker in der animalen als in der vegetalen Hälfte der *Xenopus*-Oozyte konzentrieren. Spätestens ab dem 32-Zell-Stadium ist *XTcf3* dann gleichmäßig im gesamten frühen *Xenopus*-Embryo vorhanden (Standley et al., 2006). Das zygotische *XTcf3* wird dagegen im Verlauf der Gastrulation im anterioren Bereich des Embryos am intensivsten exprimiert. In frühen Neurula-Embryonen können *XTcf3*-Transkripte im Mesoderm und mit einer deutlichen posterioren Grenze in der sensorischen Schicht des Neuroektoderms detektiert werden. Im posterioren Bereich steigert sich die *XTcf3*-Expression während der späten Neurula auf ein zum anterioren Expressionsfeld vergleichbares Maß. Beginnend mit den frühen Schwanzknospen-Stadien wird *XTcf3* verstärkt im ZNS, den Augen, den Ohrvesikeln, dem Kopfmesenchym und den Kiemenbögen einschließlich des Endoderms exprimiert. Auch in den Neuralleisten und ihren Derivaten können *XTcf3*-Transkripte nachgewiesen werden. Daneben gibt es in der Schwanzknospe eine deutliche *XTcf3*-Expression (Molenaar et al., 1998).

Auch Zebrafisch-*Tcf3* (*zTcf3*) wird in Blastula-Stadien ubiquitär exprimiert. Im Schild-Stadium reichern sich die *zTcf3*-Transkripte im dorsalen einwandernden Mesoderm an und markieren während der Gastrulation und der frühen Somitogenese das Achsenmesoderm (Pelegrini und Maischein, 1998). Zu diesem Zeitpunkt ist auch im Neuroektoderm eine starke Expression nachweisbar. Im Schwanzknospen-Stadium weist *zTcf3* dann ein abgestuftes Expressionsmuster im anterioren Neuroektoderm auf, wobei die meisten Transkripte an der

anterioren Grenze der Neuralplatte detektiert werden können, während an der Mittelhirn-/Hinterhirn-Grenze kein *zTcf3* exprimiert wird (Kim et al., 2000). Mit der fortschreitenden Somitogenese vermindert sich die *zTcf3*-Expression im Rumpf mit Ausnahme der Schwanzknospe (Pelegri und Maischein, 1998).

Auch bei der Maus-Entwicklung wird *mTcf3* im frühen Gastrula-Stadium (Embryo-Tag 6.5, E6.5) im gesamten Embryo exprimiert. Zusätzlich sind alle extraembryonalen Gewebe mit Ausnahme des ekto-plazentalen Zapfens und der Gebärmutter-schleimhaut *mTcf3*-positiv. Mit dem Neuralplatten- und Prä-Somiten-Stadium (E7.5) schwächt sich die *mTcf3*-Expression insgesamt ab, wobei die stärksten Signale im anterioren Bereich des Embryos erhalten bleiben. Im 8-12-Somitenpaar-Stadium (E8.5) wird *mTcf3* vorwiegend in den Vorderhirn-, Mittelhirn- und Hinterhirn-Anlagen exprimiert und kann darüberhinaus in den sich bildenden Somiten nachgewiesen werden, während die Expression im posterioren Bereich des Embryos kaum noch nachweisbar ist (Korinek et al., 1998; Galceran et al., 1999). Ab dem 35-39-Somitenpaar-Stadium (E10.5) schränkt sich die *mTcf3*-Expression im Kopfbereich auf das mediale Pallium (dorsale Telencephalon-Wand) (Galceran et al., 2000) und das ventrale Diencephalon sowie die Rathke-Tasche ein (Brinkmeier et al., 2007). Zwischen dem 45-47- und dem 60-Somitenpaar-Stadium (E11.5 bis E14.5) überwiegt dann die *mTcf3*-Expression im rostralen Bereich des ventralen Diencephalons (Brinkmeier et al., 2007).

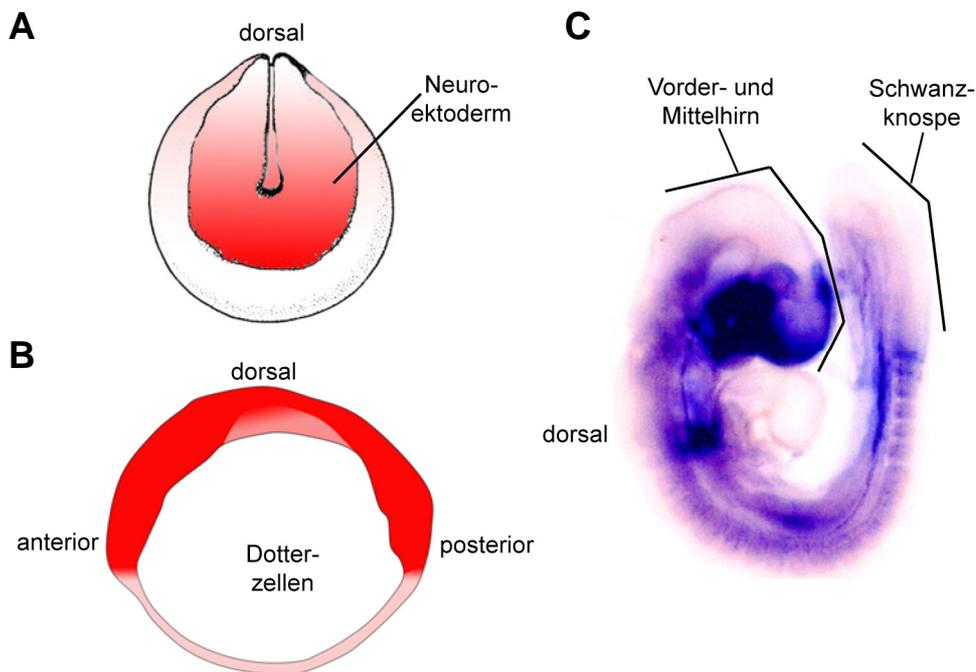


Abb. 2 Vergleich der Tcf3-Expressionsmuster im *Xenopus*- (A), Zebrafisch- (B) und murinen Embryo (C). **A** Schema der XTcf3-Expression im späten Neurula-Embryo (Stadium 18), anteriore Ansicht. **B** Schema der zTcf3-Expression im späten Gastrula-Embryo (9 Stunden Postfertilisation), seitliche Ansicht. **C** In der Ganzkeimfärbung detektierte mTcf3-Transkripte (blau) im 21-29-Somitenpaar-Stadium (E9.5), seitliche Ansicht (entnommen aus Galceran et al, 1999).

Allen drei Spezies ist eine frühe ubiquitäre *Tcf3*-Expression gemeinsam, die sich in späteren Stadien vorwiegend auf das anteriore Neuroektoderm sowie in geringeren Mengen auf das anteriore Endomesoderm konzentriert (Abb. 2). Während der weiteren Entwicklung wird *Tcf3* sowohl in Zebrafisch- als auch in *Xenopus*-Embryonen bei einer insgesamt im Rumpfbereich verminderten *Tcf3*-Expression weiter in der Schwanzknospe exprimiert.

1.2.2 Phänotypische Auswirkungen der Depletion von Tcf3

Depletion von maternalem XTcf3 durch Behandlung der *Xenopus*-Oozyte mit Antisense-Oligonukleotiden führt in Embryonen zu Beeinträchtigungen während der Gastrulation wie dem misslungenen Schließen des Blastoporus und der Ausstülpung des Urdarms. Embryonen, welche die Gastrula durchlaufen, weisen im Schwanzknospen- und Kaulquappen-Stadium einen dorso-anteriorisierten Phänotyp mit vergrößerter *Chorda dorsalis* und einer Ausdehnung anteriorer Endoderm-Bereiche auf. Gleichzeitig ist der Dickdarm reduziert. In XTcf3-depletierten Gastrulae werden die den Organisator kennzeichnenden Gene wie *siamois*, *Xnr3* (*Xenopus nodal-related 3*), *gooseoid*, *chordin*, *cerberus* und *Xnr6* (*Xenopus nodal-related 6*) verstärkt exprimiert. Zusätzlich kommt es während der Gastrulation zu einer ektopischen Expression von *siamois*, *Xnr3* und *chordin* in der ventralen Hälfte von XTcf3-depletierten Embryonen, während *Bmp4* und *Xwnt8* unverändert exprimiert werden (Houston et al., 2002).

Überraschenderweise zeigen *XTcf1/XTcf3*-Doppel-depletierte Embryonen während der frühen Gastrula eine Reduktion der *siamois*- und *Xnr3*-Expression, während die maternale Depletion nur eines der beiden Transkriptionsfaktoren die *siamois*- und *Xnr3*-Expression im Organisator steigert und ektopisch ausdehnt (Standley et al., 2006). Dies deutet auf noch nicht untersuchte Redundanzen von *XTcf1* und *XTcf3* hin.

Im Verlauf des Durchmusterens induzierter Mutanten, deren frühe Neurogenese gestört ist, konnte die Zebrafisch-Mutante *headless/hdl* identifiziert werden. Die entsprechende Mutation betrifft das *zTcf3*-Gen und führt zu einem trunkierten zTcf3-Protein, dem die HMG-Box und das Kern-Lokalisierungs-Signal fehlen. Diese Zebrafisch-Mutanten zeichnen sich dadurch aus, dass ihnen die Augen, das Vorderhirn und Teile des Mittelhirns fehlen. Dabei sind anteriore Neuralmarker reduziert, während sich die Expression der die Mittelhirn-/Hinterhirn-Grenze markierenden Gene rostral ausdehnt. Das Expressionsmuster eines Hinterhirnspezifischen Gens bleibt dagegen unbeeinträchtigt. Im Gegensatz zu *Xenopus* XTcf3-depletierten Gastrulae scheint die Genexpression im Organisator in *hdl*-Mutanten weitgehend unverändert. Allerdings dehnt sich das *dickkopf-1* (*dkk1*)-Expressionsfeld aus, während *wnt8* im Verlauf der frühen Gastrula ektopisch in der dorsalen Marginalzone exprimiert wird. Weder Cerberus noch Dickkopf können in *hdl*-Mutanten den Verlust anteriorer Strukturen ausgleichen. Sowohl *zTcf3* in seiner vollen Länge als auch eine

trunkierte Variante ohne β -Catenin-Bindungsdomäne können dagegen den Wildtyp-Phänotyp mit gleicher Penetranz (90%) wiederherstellen (Kim et al., 2000). Des Weiteren ist ein zweites vorwiegend im C-Terminus divergierendes zTcf3-Homolog, zTcf3b, in der Lage den Phänotyp von *hdl*-Mutanten zu rekonstituieren, jedoch nicht zLef1 (Dorsky et al., 2003).

Über homologe Rekombinationsereignisse und gezielte Kreuzungen konnten Mäuse mit einer *Tcf3*-Ausfallmutation erzeugt werden. Dieser Verlust führt zu früher embryonaler Letalität. Murine Embryonen mit mäßigen Beeinträchtigungen zeigen nach einer *Tcf3*-Nullmutation Verdoppelung der sich entwickelnden Neuralfaltten im anterioren Bereich. Gelegentlich entsteht eine zusätzliche Somitenreihe. Stark beeinträchtigte Embryonen haben keine oder nur stark verkümmerte Neuralfaltten, darüber hinaus fehlen ihnen die Somiten und das Herz. Übereinstimmend mit den milden Phänotypen entstehen jedoch vielfache Neuralrinnen. Weitere Defekte beziehen sich in Post-Gastrula-Embryonen mit ähnlichen Folgen wie bei Zebrafisch *hdl*-Mutanten auf das Vorderhirn. Die Expression von Vorderhirn-Marker-Genen ist in murinen *Tcf3*^{-/-}-Embryonen deutlich reduziert. Gleichzeitig expandiert die Expression eines Mittelhirn-Markers nach rostral, während die eines Hinterhirn-Markers sich abschwächt. Des Weiteren geht der *mTcf3*-Verlust mit einer Zunahme an Achsenmesoderm wie Knoten und *Chorda dorsalis* auf Kosten anderer mesodermaler Zelltypen einher, was als Analogie zur vergrößerten *Chorda dorsalis* in XTcf3-depletierten *Xenopus*-Embryonen aufgefasst werden könnte. Dabei gibt in murinen *Tcf3*^{-/-}-Embryonen die den Primitivstreifen und das axiale Mesendoderm markierende *Brachyury*-Expression die Vervielfältigung dieser Strukturen wieder. Während die Expression eines für das laterale Mesoderm spezifischen Markergens reduziert ist (Merrill et al., 2004).

Durch den Einsatz von Antisense-Morpholino-Oligonukleotiden, die komplementär zur 5'-Sequenz oder zu den ersten 25 Basen 3' des AUG-Translationsstarts einer betreffenden mRNA konzipiert sind, ist es möglich, deren Translation gezielt zu blockieren (zusammengefasst in Heasman, 2002). Dadurch kann das betreffende Protein je nach maternalem Pool während der frühen Embryogenese im *Xenopus*-Embryo in unterschiedlichen Bereichen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten depletiert werden (Heasman et al., 2000).

Morpholino-vermittelter XTcf3-„Knockdown“ führt bei Applikation in der dorsalen Marginalzone zu kopflosen Embryonen, während eine Depletion von XTcf1 und XLef1 in diesem Bereich vorwiegend zu einem seitlichen Abbiegen der Körperachse führt (Liu et al., 2005).

Während die *Tcf3*-Ausfallmutation in murinen Embryonen zur Vervielfältigung des *brachyury*-exprimierenden axialen Mesendoderms führt, ist in *Xenopus*-Embryonen endogenes XTcf3 wie auch XTcf1 für die Mesoderm-Induktion auf nicht-redundante Weise erforderlich. Dies

zeigt sich an der Reduktion des pan-mesodermalen Markers *brachyury* (*xbra*) nach *XTcf3*-Depletion sowie dem Verlust der *xbra*-Expression nach *XTcf1*-Verminderung. Die *xbra*-Expression kann nach *XTcf1*-Depletion nicht durch *XTcf3* wiederhergestellt werden und umgekehrt ist *XTcf1* nicht nach *XTcf3*-Verminderung wirksam. Eine Wiederherstellung der *xbra*-Expression in *XTcf1*-Morpholino-behandelten Embryonen ist dagegen durch *XTcf4C* und *XLef1* möglich. Des Weiteren ist *XTcf4A* für die Revidierung der *xbra*-Reduktion nach *XTcf3*-Depletion geeignet. Dabei ist die *xbra*-Expression weder vom endogenen *XTcf4* noch vom endogenen *XLef1* abhängig. Neben *xbra* sind die das ventro-laterale Mesoderm kennzeichnenden Markergene *Xpo* (**X***enopus*-**p**osterior) und *XmyoD* (**X***enopus* **m**yo**g**enic **d**ifferentiation) sowohl von endogenem *XTcf3* und *XTcf1* als auch vom endogenen *XLef1* abhängig, nicht aber von endogenem *XTcf4* (Liu et al., 2005).

Somit kann der Verlust von *Tcf3* bei *Xenopus*-, Zebrafisch- und murinen Embryonen zum Verlust von Kopfstrukturen führen. Auf Ebene der Markergene lassen sich diese anterioren Trunkierungen in Zebrafisch- und Maus-Embryonen auf ein reduziertes Vorderhirn zu Gunsten eines ausgedehnten Mittelhirns zurückführen. Weitere Effekte betreffen in *Xenopus*- und murinen Embryonen eine ektopische Ausdehnung von Organisator-Strukturen, welche in *Xenopus* eine vergrößerte *Chorda dorsalis* und in murinen Embryonen eine Vervielfachung der Achsen zur Folge haben. Des Weiteren sind sowohl in *XTcf3*-depletierten *Xenopus*-Embryonen als auch in murinen *Tcf3*^{-/-}-Embryonen das laterale Mesoderm markierende Gene reduziert.

1.2.3 Expression von *Tcf4*

Die *XTcf4*-mRNA ist bereits maternal vorhanden und gleichmäßig in der Oozyte verteilt. Beim maternalen *XTcf4* handelt es sich vorwiegend um die Isoformen *XTcf4A* und *XTcf4B* (Houston et al., 2002; Standley et al., 2006). Die zygotische *XTcf4*-Expression setzt dagegen mit der Isoform *XTcf4C* beginnend in der späten Neurula ein. Die *XTcf4*-Transkripte sind als zwei Punkte im Gehirn nachweisbar, wobei sich das Expressionsfeld entlang der antero-posterioren Achse von der dorsalen Spitze zu den oberen lateralen Bereichen des Gehirns verschiebt. Die *XTcf4*-Expression ist während der Organogenese im weitesten anterior gelegenen Teil des Mittelhirns im dorsalen Thalamus nachweisbar und kennzeichnet die Vorderhirn-/Mittelhirn-Grenze mit dem Prätectum als caudale Beschränkung (König et al., 2000). Im Kaulquappen-Stadium können *XTcf4*-Transkripte schließlich im gesamten Mittelhirn wie auch im Gastrointestinal-Trakt detektiert werden (König, Dissertation 2003). Zebrafisch-*Tcf4* (*zTcf4*) wird vom Schwanzknospen-Stadium an in der zukünftigen Vorderhirn-Region in einem von anterior nach posterior abfallenden Gradienten exprimiert. Im 18-Somiten-Stadium (18 hpf, Stunden Postfertilisation) ist die *zTcf4*-Expression im

ventralen Telencephalon nachweisbar, daneben wird *zTcf4* deutlich im Diencephalon exprimiert. Im 30-Somiten-Stadium (24 hpf) ist das *zTcf4*-Expressionsmuster auf ein Gebiet eingeschränkt, das die am weitesten dorsal und posterior gelegenen Bereiche des Diencephalons umfasst und sich etwas in das anteriore Mittelhirn ausdehnt. Dabei grenzt die *zTcf4*-Expression anterior und ventral an die *Zona limitans intrathalamica* und ist vom ventralen Diencephalon ausgeschlossen. Im Brustflossenknospen-Elongationsstadium („long-pec stage“) (48 hpf) wird *zTcf4* im dorsalen Thalamus, dem Prätectum, dem optischen Tectum und im *Torus semicircularis* des Mittelhirns exprimiert. Zusätzlich ist *zTcf4* in den Rhombomeren 4 und 5 im Hinterhirn nachweisbar. In drei Tage alten Embryonen wird *zTcf4* schließlich im sich entwickelnden Darm exprimiert (Young et al., 2002).

In gastrulierenden Mäuse-Embryonen (E7.0) kann murines *Tcf4* in geringen Mengen im anterioren Endoderm der Bildung der Kopffalten vorausgehend detektiert werden. Im Neuralplatten- und Prä-Somiten-Stadium (E7.5) wird *mTcf4* stark an der am weitesten rostral gelegenen Grenze der Neuralplatte exprimiert sowie mit einem nach posterior abfallenden Gradienten in den Rhombomeren 5, 3 und 1 des Hinterhirns (Cho und Dressler, 1998).

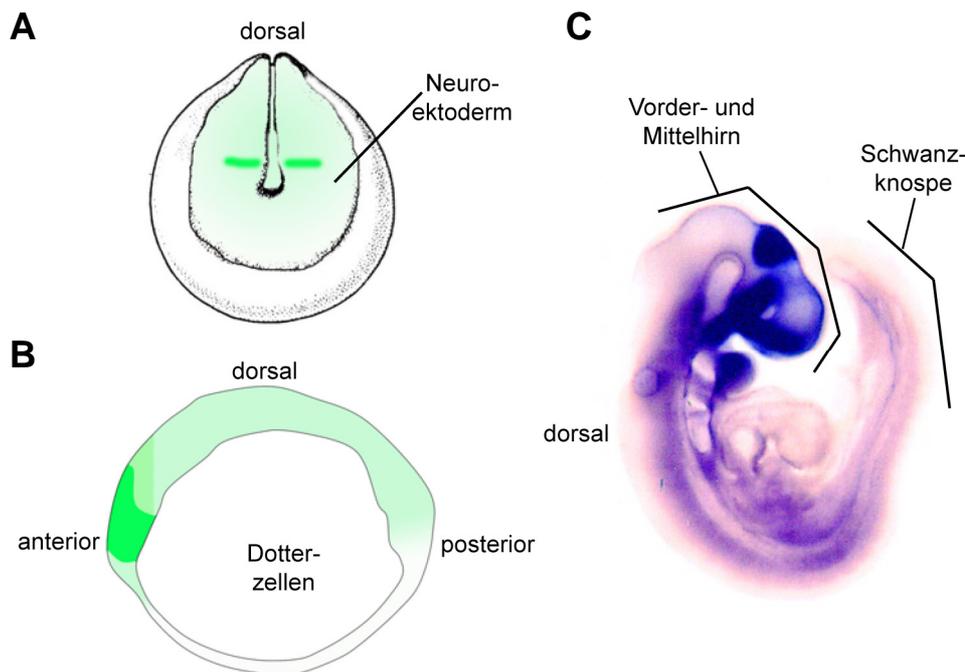


Abb. 3 Vergleich der *Tcf4*-Expressionsmuster im *Xenopus*- (A), Zebrafisch- (B) und murinen Embryo (C). **A** Schema der *XTcf4*-Expression im späten Neurula-Embryo (Stadium 18), anteriore Ansicht. **B** Schema der *zTcf4*-Expression im späten Gastrula-Embryo (9 Stunden Postfertilisation), seitliche Ansicht. **C** Ganzkeimfärbung an einem murinen Embryo im 21-29-Somitenpaar-Stadium (E9.5), seitliche Ansicht (entnommen aus Galceran et al., 1999).

Ab dem 8-12-Somitenpaar-Stadium (E8.5) wird *mTcf4* vorwiegend in den Vorderhirn- und Mittelhirn-Anlagen exprimiert und konzentriert sich im 13-20-Somitenpaar-Stadium (E9.0)

neben dem Mittelhirn auf die otische Plakode und das Prosomer p2 des Diencephalons (Galceran et al., 1999). Im 21-29-Somitenpaar-Stadium (E9.5) kann *mTcf4* nicht mehr im Hinterhirn detektiert werden (Cho und Dressler, 1998). Stattdessen wird murines *Tcf4* vom 35-39- bis zum 51-Somitenpaar-Stadium (E10.5 bis E12.5) in den caudalen und rostralen Bereichen des ventralen Diencephalons sowie in der Rathke-Tasche exprimiert. Im 55-Somitenpaar-Stadium (E13.5) schränkt sich die *mTcf4*-Expression auf den rostralen Bereich des ventralen Diencephalons und den dorsalen Teil der Rathke-Tasche ein (Brinkmeier et al., 2007). Des Weiteren sind in diesem Stadium *mTcf4*-Transkripte im Dach des Mesencephalons (dem Tectum) und im dorsalen Thalamus nachweisbar, wohingegen die *Zona limitans intrathalamica* wie in Zebrafisch-Embryonen von *mTcf4*-Transkripten frei bleibt. Zeitgleich kann *mTcf4* im Darm-Epithel detektiert werden. Innerhalb des Darms verläuft die *mTcf4*-Expression entlang einer rostro-caudalen Achse, wobei sie am distalen Dickdarm am höchsten ist (Korinek et al., 1998).

Auch in den Gliedmaßen-Knospen wird *mTcf4* ab dem 35-39-Somitenpaar-Stadium (E10.5) exprimiert. Diese Expression hält bis zum 48-55-Somitenpaar-Stadium (E12.5) an, in dem die *mTcf4*-Transkripte im Bereich der sich bildenden Zehen und Finger nachweisbar sind (Cho und Dressler, 1998).

Ogleich in *Xenopus*- und Zebrafisch-Embryonen schon vor der ersten Zellteilung nachweisbar, zeichnet sich die *Tcf4*-Expression in allen betrachteten Spezies durch ihre Konzentration auf das Vorder- und Mittelhirn während der Neuralentwicklung aus (Abb. 3). Allen drei Spezies gemeinsam ist des Weiteren die Expression im dorsalen Thalamus, wobei in Zebrafisch- und murinen Embryonen die *Zona limitans intrathalamica* von *Tcf4*-Transkripten frei bleibt. Während sich die *Tcf4*-Expression in *Xenopus* schließlich auf das gesamte Mittelhirn ausdehnt, haben murine und Zebrafisch-Embryonen eine transiente Expression im Hinterhirn gemeinsam. Des Weiteren weisen alle betrachteten Spezies eine späte Expression im Gastrointestinal-Trakt auf.

1.2.4 Phänotypische Auswirkungen der Depletion von *Tcf4*

Depletion von maternalem XTcf4 führt in XTcf4⁻-Gastrulae zu einer verringerten Expression der Wnt-Zielgene *chordin* und *Xnr3*, während die Expression von *siamois* verlangsamt ist. Des Weiteren ist die Expression zygotischer Gene, die für die anteriore Spezifizierung verantwortlich sind, wie *Xhex* (**X***enopus* **h**ematopoietically **e**xpressed **h**omeobox), *cerberus* und *dickkopf* nach XTcf4-Depletion vermindert. Im Schwanzknospen-Stadium weisen XTcf4⁻-Embryonen einen Verlust von Kopf-Strukturen auf (Standley et al., 2006).

Homozygote *zTcf4*^{exl/exl}-Mutanten-Fische produzieren ein sehr kurzes trunkiertes zTcf4-Protein. Sie sind lebensfähig und entwickeln sich in den ersten Lebenswochen normal,

erreichen aber nicht die Körpergröße ihrer Wildtyp-Geschwister. Sechs Wochen alten $zTcf4^{exl/exl}$ -Mutanten-Fischen fehlen Darmfalten im Mittel- und Enddarm, während der Vorderdarm unverändert bleibt. Dieser Verlust an Darmfalten beruht auf einer reduzierten Proliferation im Mittel- und Enddarm. In der Folge überlebt weniger als 1% der $zTcf4^{exl/exl}$ -Mutanten-Fische bis zum Erwachsenen-Alter (Muncan et al., 2007).

Im Vergleich dazu sterben murine Embryonen mit einer $Tcf4$ -Nullmutation kurz nach der Geburt. In murinen Embryonen mit mehr als 60 Somiten (E16.5) ist den $zTcf4^{exl/exl}$ -Mutanten-Fischen vergleichbar die Zahl der Zotten im Dünndarm herabgesetzt und in den Intervillus-Bereichen, welche später die Krypten bilden werden, gibt es weniger Epithelzellen. Während mit den Enterozyten und den Becherzellen die beiden vorherrschenden epithelialen Zelltypen des Dünndarms vorhanden sind, fehlen die enteroendokrinen Zellen, was wahrscheinlich auf dem Fehlen reifer Stammzellen beruht. Darüber hinaus ist in der Intervillus-Region bei murinen $Tcf4^{-/-}$ -Embryonen im Gegensatz zu Wildtyp-Embryonen keine Proliferation nachweisbar und die Zellen im Intervillus-Bereich gleichen bezogen auf ihre Zelltyp-spezifischen Charakteristika den Villi-Zellen (Korinek et al., 1998).

Neben der gestörten Dünndarm-Entwicklung kommt es bei $Tcf4^{-/-}$ -Embryonen im 60-Somitenpaar-Stadium (E14.5) zu einer Wucherung des anterioren Hypophysen-Lappens. Diese Wucherung behindert die Gaumen-Entwicklung, da sich die Hypophyse nach ventral ausdehnt (Brinkmeier et al., 2003). Diese Ausdehnung wird durch eine ektopische rostral und ventral expandierte $six6$ (**s**ine **o**culus **h**omeobox **h**omolog **6**)-Expression benachbart zum ventralen Diencephalon markiert. In diesem Bereich ist das Gebiet proliferierender Zellen in $Tcf4^{-/-}$ -Embryonen ektopisch ausgeweitet (Brinkmeier et al., 2007).

Bei der $Tcf4/Tcf1$ -Doppel-Ausfallmutante führt der gleichzeitige Verlust von murinem $Tcf4$ und $Tcf1$ zu embryonaler Letalität (Gregorieff et al., 2004). Mäuse mit einer homozygoten $Tcf1$ -Ausfallmutation sind dagegen gesund und haben trotz einer geringeren Anzahl von T-Zellen und einem verkleinerten Thymus eine normale Lebensspanne. Abgesehen vom Lymphsystem weisen die inneren Organe bei $mTcf1^{-/-}$ -Mäusen keine größeren Abweichungen auf (Verbeek et al., 1995). $Tcf4^{-/-}/Tcf1^{-/-}$ -Embryonen zeichnen sich jedoch im 56-60-Somitenpaar-Stadium durch Missbildungen bei der Entwicklung caudaler Strukturen aus, ohne dass anteriore Strukturen beeinträchtigt sind. So fehlen den $Tcf4^{-/-}/Tcf1^{-/-}$ -Embryonen die Hintergliedmaßen, der Rumpf und der Schwanz, während die Vordergliedmaßen nicht missgebildet sind. In stark verkürzten Embryonen liegen die inneren Organe frei, was auf eine fehlerhafte Entwicklung der Abdominalwand hinweist. Darüber hinaus fehlen den $Tcf4^{-/-}/Tcf1^{-/-}$ -Embryonen die Genitalhöcker, der Dickdarm und Teile des Urogenitalsinus. Auch weisen sie Anzeichen für eine Gabelung des Neuralrohrs auf, was nicht auf ein beeinträchtigt paraxiales Mesoderm zurückzuführen ist. Die Analyse der Expression mehrerer Markergene wie $Wnt5a$, $Cdx2$ (**c**audal **t**ype **h**omeobox **2**), $Wnt3a$ und

brachyury zeigt, dass die Musterungsdefekte in *Tcf4^{-/-}/Tcf1^{-/-}*-Embryonen auch nicht von einem Verlust mesodermaler Vorläufer herrühren. Als Folge einer homöotischen Transformation innerhalb des Magen-Darmtraktes ist dieser in *Tcf4^{-/-}/Tcf1^{-/-}*-Embryonen anteriorisiert, was sich in einer caudalen Ausdehnung von Vorderdarm-Markern äußert sowie in der Verdoppelung von Vorderdarm-Strukturen (Gregorieff et al., 2004).

Im Gegensatz zu *XTcf3* ist frühes *XTcf4* für die Mesoderm-Entwicklung nicht erforderlich. Die Expression des pan-mesodermalen Markers *brachyury* (*xbra*) ist nach Morpholino-vermittelter *XTcf4*-Depletion im Bereich der dorsalen Marginalzone unverändert. Auch die Expression der das ventro-laterale Mesoderm kennzeichnenden Markergene *XmyoD* und *Xpo* ist von endogenem *XTcf4* unabhängig (Liu et al., 2005).

Zygotisches *XTcf4* ist jedoch für die Zellproliferation im Mittelhirn wesentlich, wo sein Morpholino-vermittelter Verlust zu einer Abnahme an dorsalem Neuralgewebe führt. Während *XTcf4A* als Antagonist der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade für die Aufrechterhaltung des dorsalen Mittelhirns und die Expression Mittelhirn-spezifischer Markergene (*pax-6* [paired box 6] und *wnt-2b*) benötigt wird, ist die Expression Isthmus-spezifischer Markergene *XTcf4A* unabhängig. Stattdessen benötigen die Isthmus-Markergene *en-2* (*engrailed-2*) und *fgf-8* das endogene *XTcf4C*, den Agonisten der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade (Kunz et al., 2004).

Während *XTcf4* in *Xenopus* sowohl für die Entstehung von Kopf-Strukturen als auch für die Aufrechterhaltung der Zellpopulation im dorsalen Mittelhirn wesentlich ist, führt der *Tcf4*-Verlust in murinen Embryonen überraschenderweise zu eher geringen Veränderungen im Bereich des Hypophysen-Vorderlappens, einem Derivat der Rathke-Tasche. Indessen ist für *zTcf4*-Mutanten in Zebrafisch zum bisherigen Zeitpunkt noch kein den Kopfbereich betreffender Phänotyp detektiert worden.

1.3 Neuralinduktion und Musterung des Ektoderms

Die Etablierung der dorso-ventralen Körperachse ist eines der frühesten Ereignisse im Verlauf der Entwicklung des Vertebraten-Embryos. Gleichzeitig führt sie zu einer ersten Musterung des Ektoderms. Während sich das dorsale Ektoderm zur Neuralplatte und schlussendlich zum gesamten zentralen Nervensystem entwickelt, entsteht aus dem ventralen Ektoderm die Epidermis und ihre Derivate.

Die früheste dorso-ventrale Asymmetrie entsteht als Folge der durch den Spermien-Eintritt induzierten kortikalen Rotation, wobei dorsale Determinanten wie Dishevelled in den dem Spermien-Eintrittspunkt gegenüber liegenden Bereich transportiert werden (Miller et al., 1999). Durch diese Translokation wird β -Catenin in den dorsalen Zellen des Blastula-

Embryos stabilisiert (Schneider et al., 1996), wo sich das Nieuwkoop-Zentrum bildet. Dieses induziert in den darüber liegenden Zellen den Spemann-Organisator. Dazu aktiviert β -Catenin zusammen mit Tcf3 (**T-cell enhancer factor 3**) die Transkription von *siamois* und *twin*, welche wiederum zur Expression des Organisator-spezifischen Gens *gooseoid* beitragen (Brannon et al., 1997).

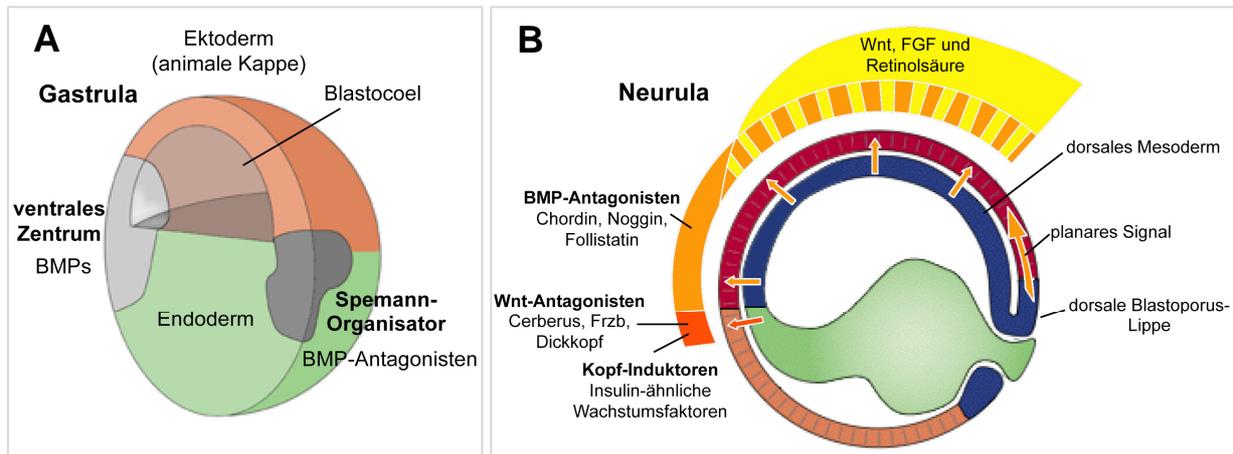


Abb. 4 Schematische Darstellung des Gastrula- beziehungsweise Neurula-Embryos im Querschnitt. **A** Während von der ventralen Seite des Embryos BMP-Signale ausgehen, sezerniert der Organisator BMP-Antagonisten. In der Folge etabliert sich im Ektoderm entlang der dorso-ventralen Achse ein BMP-Signal-Gradient (verändert nach De Robertis, 2006). **B** Das einwandernde Mesendoderm mustert das darüber liegende Ektoderm (verändert nach De Robertis et al., 2000; und Gilbert, 2006).

Das Organisator-Gewebe wird mit der beginnenden Gastrulation als dorsale Blastoporus-Lippe morphologisch erkennbar. Es umfasst den Bereich, an dem die Gastrulationsbewegungen einsetzen. Diese Bewegungen sind nicht nur die Grundlage für die Ausbildung der drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Endoderm), sondern führen auch zur Errichtung der antero-posterioren Körperachse. Wie Spemann und Mangold bereits 1924 in Transplantations-Experimenten mit Salamander-Gastrulae zeigten, ist die dorsale Blastoporus-Lippe in der Lage, durch Rekrutieren benachbarter Zellen eine zweite embryonale Achse zu induzieren. Diese zweite Körper-Achse zeichnet sich durch das Vorhandensein aller Achsenstrukturen einschließlich eines vollständigen zentralen Nervensystems aus (Spemann und Mangold, 1924).

Die Differenzierung des dorsalen Ektoderms zu Neuroektoderm wird im Verlauf der Gastrulation durch radiale Signale der entlang des Blastocoeldachs einwandernden Zellen des Organisators induziert (Abb. 4 B). Während die ersten eingewanderten Zellen das anteriore Ende des Embryos erreichen und das anteriore Endoderm bilden, kommt das sich daran anschließende Prächordal-Mesendoderm in der späten Gastrula unterhalb der

anterioren Neuralplatte zu liegen. Indessen bilden die zuletzt eingewanderten Zellen des Organisators das bis zum posterioren Ende des Embryos reichende Chorda-Mesoderm. Nieuwkoop (Nieuwkoop et al., 1952; Nieuwkoop und Nigtevecht, 1954) entwickelte das „Aktivierungs-Transformierungs-Modell“, um die Fähigkeit des Organisators zu erklären, das Nervensystem sowohl zu induzieren als auch zu mustern. Danach spezifiziert die anfängliche Induktion durch das früh eingewanderte Endomesoderm anteriores Neuralgewebe („Aktivierung“).

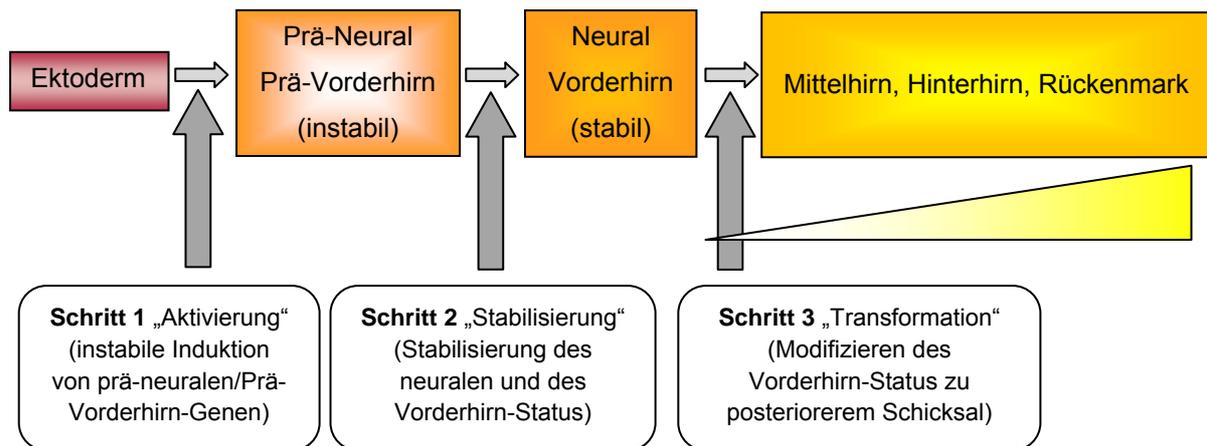


Abb. 5 Drei-Schritt-Modell der Neuralinduktion nach Stern et al. (2006). Die Induktion und anschließende antero-posteriore Musterung des Neurektoderms erfordern Aktivierung, Stabilisierung und Transformation.

Während Signale des später einwandernden Mesoderms den Charakter des zukünftigen Neuralgewebes zu einem schrittweise zunehmend posterioren Schicksal modifizieren („Transformation“) (Nieuwkoop et al., 1952; Nieuwkoop und Nigtevecht, 1954). Das „drei-Schritt-Modell“ nach Stern (Stern et al., 2006) wandelt Nieuwkoops Modell insofern ab, als es einen stabilisierenden Zwischenschritt einführt (Abb. 5).

Danach reicht die „Aktivierung“ nicht aus, um das Neural- oder Vorderhirn-Schicksal zu induzieren, sondern führt zu einem frühen noch instabilen Prä-neural-/Prä-Vorderhirn-Zustand. Dem entsprechend zeichnen sich Zellen oberhalb des Nieuwkoop-Zentrums bereits im Blastula-Embryo durch die Fähigkeit aus, nach Isolierung Neuralgewebe bilden zu können. Wegen der Expression der BMP (**b**one **m**orphogenetic **p**rotein)-Antagonisten Chordin und Noggin wird dieser Bereich als BCNE-Zentrum bezeichnet („**b**lastula **c**hordin and **n**oggin **e**xpressing center“) (Kuroda et al., 2004). Wobei zumindest für die Chordin-Expression gezeigt werden konnte, dass sie von β -Catenin abhängig ist (Heasman et al., 2000). Die Konsolidierung des Neuralschicksals erfolgt jedoch erst durch spätere stabilisierende Signale. Im Kopfbereich geht die Stabilisierung wahrscheinlich vom Prächordal-Mesoderm aus und legt sowohl den Neural- als auch den Vorderhirn-Charakter fest. Indessen ist im Rumpf wahrscheinlich das Chordamesoderm für die Stabilisierung

verantwortlich, während vom paraxialen Mesoderm transformierende Signale ausgehen (Stern et al., 2006).

Auf molekularer Ebene setzt die Fähigkeit des dorsalen Ektoderms, das Neuralschicksal zu erwerben, den Ausschluss von BMP-Signalen voraus (Wilson und Hemmati-Brivanlou, 1995). Diese gehen als Teil der BMP4-Synexpressions-Gruppe von einem ventralen Signalzentrum aus und aktivieren epidermale Gene im Ektoderm. Indem der Organisator Proteine wie Noggin, Chordin und Follistatin sezerniert, werden die BMP-Signale im benachbarten dorsalen Ektoderm blockiert (Abb. 4 A). Neben der Inhibierung von BMP-Signalen sind für die Neuralinduktion zusätzlich frühe FGF (**F**ibroblast **G**rowth **F**actor)-Signale erforderlich (Delaune et al., 2005), die den Boden für die Stabilisierung des Neuralschicksals bereiten könnten und damit als frühe aktivierende Signale in Frage kommen.

Für die Induktion der am weitesten anterior gelegenen Kopf-Strukturen müssen dagegen nicht nur BMP- sondern auch Wnt-Signale blockiert werden, was durch die vom Endomesoderm sezernierten „Kopfinduktoren“ Cerberus, Frzb (**f**rizzled related protein) und Dickkopf geschieht (zusammengefasst in Kawano und Kypta, 2003). Daneben tragen Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren zur Stabilisierung des Vorderhirn-Schicksals bei, indem sie durch eine FGF-ähnliche Signalkaskade die Transduktion sowohl von BMP- als auch von Wnt-Signalen unterbinden (Pera et al., 2003).

Im Rumpf kommen sowohl Wnt-Signale als auch ein Gradient des Vitamin A-Derivats Retinolsäure neben dem basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) als Vermittler eines transformierenden Signals in Frage (Altmann und Brivanlou, 2001) (Abb. 4 B).

Das Zusammenspiel von morphogenetischen Bewegungen und Signalkaskaden mustert folglich das dorsale Ektoderm bereits im Gastrula-Embryo entlang seiner antero-posterioren Achse (Abb. 6 A). Eine weitere Musterungsebene der dorsalen Epithelschicht ist die medio-laterale Achse. Entsprechend ihrem Abstand von der dorsalen Mittellinie werden durch die abnehmende Konzentration an BMP-Antagonisten die drei frühen neurogenen Bereiche Neuralplatte, Neuralleiste und Prä-Plakoden-Ektoderm induziert (Abb. 6 B). Während die Neuralleistenzellen an den Seitenrändern der Neuralplatte entstehen, befindet sich das Prä-Plakoden-Ektoderm (PPE) im anterioren Bereich des Embryos medial zur Epidermis sowie lateral zu den Neuralleisten und der Neuralplatte (Abb. 6 D). Nur an der anteriorsten Ausdehnung der Neuralplatte gibt es keine Neuralleisten, so dass sich das PPE direkt benachbart zur Neuralplatte befindet und Teile der anterioren Neuralfalte bilden kann (Schlosser und Ahrens, 2004) (Abb. 6 C). Sowohl Plakoden als auch Neuralleistenzellen entstammen dem an die laterale Flanke der Neuralplatte grenzenden Ektoderm und tragen

zur Ausbildung des peripheren Nervensystems bei (Le Douarin und Smith, 1988). Für die Induktion der Neuralleiste werden mit der Wnt-Signalkaskade, dem FGF- und dem Retinolsäure-Weg die gleichen Signalwege benötigt, die auch an der Ausbildung der posterioren Achse der Neuralplatte beteiligt sind. Durch ihre Aktivität kann in der anterioren Neuralplatte ein Neuralleisten-Schicksal herbeigeführt werden (Villanueva et al., 2002). Sowohl die Neuralleiste als auch das Prä-Plakoden-Ektoderm benötigen die kombinierte Aktivität neural-induzierender und posteriorisierender Faktoren. Dennoch bevorteilen verschiedene Konzentrationen an BMP-Antagonisten ein Schicksal gegenüber dem anderen und posteriorisierende Faktoren fördern stärker das Neuralleisten- als das Plakoden-Schicksal (Brugmann und Moody, 2005).

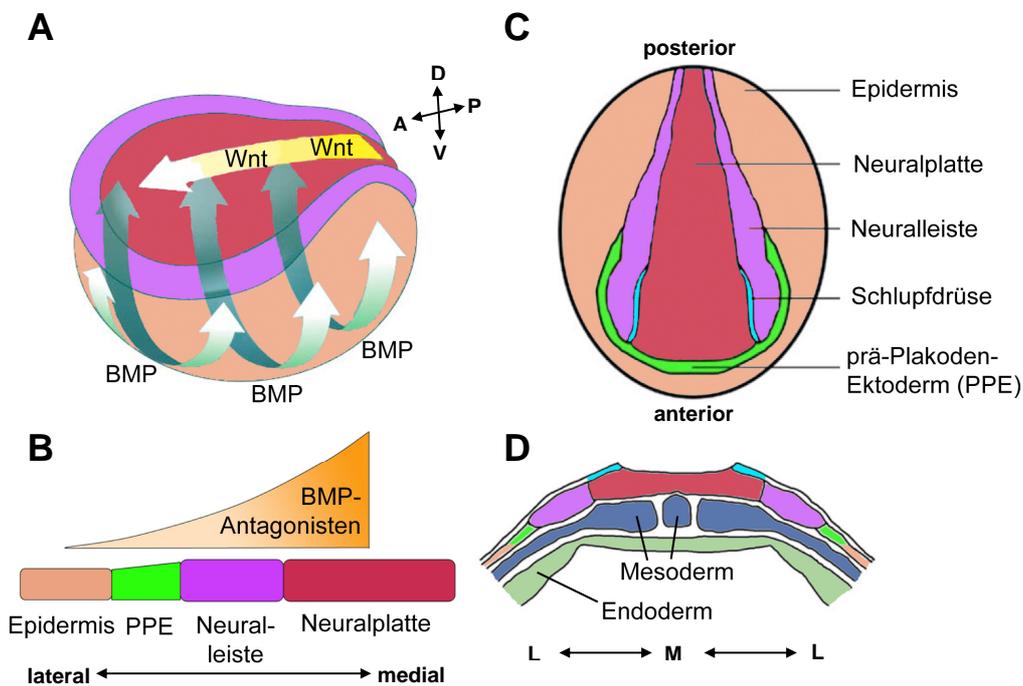


Abb. 6 Musterung des Neuroektoderms entlang der Körperachsen.

A Seitliche Ansicht eines Embryos im Neuralplatten-Stadium. Modell eines Doppel-Gradienten. Während Wnt-Signale ein zunehmend posteriores Schicksal induzieren, mustern BMP-Signale den Embryo entlang seiner dorso-ventralen Achse (verändert nach Niehrs, 2004). D: dorsal; A: anterior; P: posterior; V: ventral.

B Die drei neurogenen Bereiche Neuralplatte, Neuralleiste und Prä-Plakoden-Ektoderm (PPE) werden entlang der medio-lateralen Achse entsprechend dem Ausschuss von BMP angelegt.

C Schematische dorsale Ansicht eines Neurula-Embryos (verändert nach Hong und Saint-Jeannet, 2007). An der anterioren Neuralplatten-Grenze liegt das Prä-Plakoden-Ektoderm direkt benachbart zum ZNS.

D Schematischer Transversal-Schnitt durch den dorsalen Bereich eines Neurula-Embryos (verändert nach Hong und Saint-Jeannet, 2007). Unterhalb des medio-lateral gemusterten Ektoderms befinden sich Mesoderm und Endoderm. L: lateral; M: medial.

Die besondere Bedeutung der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade für die frühe Musterung des Ektoderms zeigt sich an ihrer Beteiligung an mehreren Prozessen. Dabei etablieren frühe

Wnt-Signale die dorso-ventrale Körperachse. Spätere Wnt-Signale steuern sowohl im Neuroektoderm die Bildung posterioren Neuralgewebes als auch in dem lateral zur Neuralplatte benachbarten neurogenen Ektoderm die Induktion der Neuralleisten.

Während es Hinweise gibt, dass der aktive Wnt/ β -Catenin-Signalweg durch Bmp4-Repression in ektodermalem Gewebe ein neurales Schicksal induzieren kann (Baker et al., 1999), lassen neuere Arbeiten vermuten, dass die Inhibition der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade nicht nur eine Voraussetzung für die Ausbildung von Kopfstrukturen ist, sondern auch für die Induktion der Neuralplatte (Heeg-Truesdell und LaBonne, 2006).

2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die spezifischen Eigenschaften der individuellen LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* zu untersuchen. Dies soll mit einem besonderen Augenmerk auf die TCF-Subtyp-spezifische differentielle Genregulation während der frühen Neuralentwicklung erfolgen. Hierfür sollen putative TCF-Subtyp-spezifisch regulierte Gene identifiziert und ihre differentielle Regulation in Funktionsgewinn- und Funktionsverlust-Studien analysiert werden.

Zielgene, für die eine TCF-Subtyp-spezifische Regulation verifiziert werden konnte, sollen dahingehend untersucht werden, ob sie wesentliche Aspekte der TCF-Subtyp-spezifischen Funktion übernehmen können. Dazu soll in Funktionsverlust-Studien überprüft werden, ob die Depletion des Subtyp-spezifischen Zielgens wesentliche phänotypische Auswirkungen des TCF-Verlusts kopiert. In Rekonstitutionsexperimenten soll untersucht werden, inwieweit überexprimiertes TCF-Zielgen die TCF-Depletion kompensiert. Des Weiteren soll geklärt werden, welche weiteren wesentlichen Funktionen TCF-Subtyp-spezifische Zielgene übernehmen und in welchen molekularen Mechanismen diese Funktionen begründet sind.

3 Materialien

Antikörper

- Anti-XCirp2 (aus Kaninchen) (K. Matsumoto, RIKEN, Japan)
- Anti-myc 9E10 (aus Maus) (Zellkulturüberstand)
- anti-phospho-Histon 3 (aus Kaninchen) (Upstate, Lake Placid, USA)
- Cy2-gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper (Dianova GmbH, Hamburg)
- Cy3-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Dianova GmbH, Hamburg)
- Peroxidase gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Dianova GmbH, Hamburg)
- Peroxidase gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper (Dianova GmbH, Hamburg)

Bakterien

- JM109 (Promega, Mannheim)
Genotyp: *endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17* ($r_k^- m_k^+$) *relA1 supE44 D(lac-proAB)* [*F' traD36 proAB lacI^qZDM15*]

Enzyme

- Alkalische Phosphatase (CIAP) (Promega GmbH, Mannheim)
- DNase I RNase frei (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Go-Taq DNA-Polymerase (5 U/μl) (Promega GmbH, Mannheim)
- Lysozym (Serva, Heidelberg)
- M-MLV Reverse Transkriptase (Promega GmbH, Mannheim)
- Proteinase K (600 mAnson U/ml) (Merck KGaA, Darmstadt)
- Restriktionsendonukleasen (Promega GmbH, Mannheim)
- RNase A (Fermentas, St. Leon-Rot)
- RNase T1 (Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen)
- Sp6, T7 RNA-Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- T4 DNA-Ligase (3U/μl) (Promega GmbH, Mannheim)

Chemikalien

Alle nicht explizit aufgeführten Reagenzien wurden über die folgenden Firmen bezogen: AppliChem GmbH (Darmstadt), Fluka Chemie GmbH (Taufkirchen), Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe) oder Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen).

- Agarose (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- Select Agar (GIBCO BRL Life Technology, Schottland)
- Ammoniumpersulfat (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Blockierungsreagenz (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- BM Purple AP Substrat (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- BSA (Bovine Serum Albumin) (PAA Laboratories GmbH, Cölbe)
- Complete, EDTA-frei Protease Inhibitor Cocktail Tabletten (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Desoxyribonucleotide (Promega GmbH, Mannheim)
- DIG RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Lambda-DNA/HindIII-Marker (Fermentas, St. Leon-Rot)
- Lambda-DNA/PstI-Marker (Fermentas, St. Leon-Rot)
- Dithiothreitol (DTT) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Fötales Kälberserum, FCS (Fetal Calf Serum) (GIBCO BRL Life Technology, Schottland)
- Hefeextrakt (USB, Cleveland, USA)
- Magermilchpulver (Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell)
- Natriumdodecylsulfat (SDS) (Serva, Heidelberg)
- NBT/BCIP Stock Solution (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Penicilin/Streptomycin (Cambrex GmbH, Taufkirchen)
- Pferdeserum (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Phenol/Chloroform-Lösung (Tris-gesättigt, pH 8.2) (Promega GmbH, Mannheim)
- Random Primer (Promega GmbH, Mannheim)
- RNAtidy G (AppliChem GmbH, Darmstadt)

Primer zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente

Alle Primer wurden über die folgenden Firmen bezogen: MWG Biotech AG (Ebersberg), GIBCO BRL Life Technology (Schottland) oder biomers.net GmbH, Ulm).

- Gfpt1_fwd 5' CGG TCC TTA TTA TGG GCC G 3'
- Gfpt1_back 5' CCA CAG TCA CGG ACT TGG C 3'
- H4_fwd 5' CGG GAT AAC ATT CAG GGT ATC ACT 3'
- H4_rev 5' ATC CAT GGC GGT AAC TGT CTT CTT 3'
- Hmgb3_fwd 5' GGC GCT CTG GTG TTC TC 3'
- Hmgb3_back 5' CTC ATG CCA GCT GAA CC 3'
- Hmgn1_fwd 5' GGC TCC TGC TTC TGA TGG AG 3'
- Hmgn1_back 5' CCA GTA TCA ATC TCT GCC TG 3'
- Hmgn2_fwd 5' GGG GAC ACA AAG TGA AGC 3'
- Hmgn2_back 5' CAC AGT CGA AGT ACC GCC 3'
- Hmg-x_fwd 5' CGT CCC CAG ATA AAG AGC GAG 3'
- Hmg-x_back 5' GCT GCA CTC GAG TTC ACA TTC 3'
- myoD_fwd 5' TGC TCC GAT GGC ATG ATG G 3'
- myoD_back 5' GCT GGG AGA AGG GAT GGT G 3'
- NCAM_fwd 5' GGA ATC AAG CGG TAC AGA 3'
- NCAM_back 5' CAC AGT TCC ACC AAA TGC 3'
- NM_001086452_fwd 5' GGG ACG TCT CTG CTA AAT TG 3'
- NM_001086452_back 5' GGC AAA CAA TGT GCA AGC 3'
- NM_001092746_fwd 5' CGG GGT ACC ACT GGA TGG TC 3'
- NM_001092746_back 5' CAA AAC AGG AGT GCA TCG 3'
- NM_001096142_fwd 5' GAG GGC AGA ATG TGC ACA CC 3'
- NM_001096142_back 5' GGC CAC CTT TGG AGT TTG GC 3'
- ODC_fwd 5' GGA GCT GCA AGT TGG AGA 3'
- ODC_back 5' CTC AGT TGC CAG TGT GGT C 3'
- Psmc3_fwd 5' GAG CTC CTG GAT GTC GAT CC 3'
- Psmc3_back 5' GGA CTT CTA AGA TGC CCT CC 3'
- Rps2e_fwd 5' GGC TAT TGG TGA CTA CAA CG 3'
- Rps2e_back 5' CCT GGT ATG GAG ATT TGG CG 3'

- Sfrs2_fwd 5' GCG CTT CTT GCC GCA AGA C 3'
- Sfrs2_back 5' GCA AGG CCC GGG CGA CTG G 3'
- simBTG1_fwd 5' GCA CTT TGT GGG GGG AAT TC 3'
- simBTG1_back 5' CCG AAT GCA ACG ATA GGC CG 3'
- Sox2_fwd 5' GAG GAT GGA CAC TTA TGC CCA C 3'
- Sox2_back 5' GGA CAT GCT GTA GGT AGG CGA 3'
- Xag_fwd 5' GAG TTG CTT CTC TGG CA 3'
- Xag_back 5' CTG ACT GTC CGA TCA GAC 3'
- Xag2_fwd 5' CTT GCT CAG GCT TTC CTT GC 3'
- Xag2_back 5' CCA GGG CAT GCA AAG TAC AG 3'
- XCirp_fwd 5' GCT GAT CAG GCG GGG CCA CC 3'
- XCirp_back 5' GCA CCC AGG CTC TGT CCT GC 3'
- XCirp2_fwd 5' CCA TTC AGG CTG ATC AGG 3'
- XCirp2_back 5' CTG GAG AGA GAC GAA CAC 3'
- Xk70_fwd 5' GCC ACC AAC ACA GCT GCT C 3'
- Xk70_back 5' CCT CAA CTC TAG AAG AGA C 3'
- XTcf-3_fwd 5' CAT GGC AGC ATG CTC GAC TC 3'
- XTcf-3_back 5' CTG GTC ACT AGA GAA AGG GG 3'
- XTcf-4_fwd 5' CTC ACG CCG CTC ATT ACC TAC AGC AAC 3'
- XTcf-4_back 5' CAT GTA CAG CAT GAA CGC GTT TAG GGG 3'
- Ywhaq_fwd 5' CTG CCT GGC GGG TCA TCT CCA G 3'
- Ywhaq_back 5' GGG TAT CGA GTT CTG CAA TGG C 3'

Primer zur Klonierung

- NM_001092746_Start_EcoRI_fwd 5' ACC GAA TTC ATG GGG GAC AAA ATG GAC ATG 3'
- NM_001092746_Stop_XhoI_back 5' GTT CTC GAG TTA GCT GGT GTC CAT CCG TGC 3'
- Hmgb3_Start_EcoRI_fwd 5' ATC GAA TTC AAT GGC TAA AGG TGA CCC TAA G 3'
- Hmgb3_Stop_XhoI_back 5' CAT CTC GAG TTA TTC ATC ATC ATC TTC GTC 3'
- Hmg-x_Start_EcoRI_fwd 5' AAC GAA TTC AAT GGG CAA GGG AGA TCC TAA C 3'
- Hmg-x_Stop_XhoI_back 5' GTT CTC GAG TTA TTC ATC ATC GTC GTC ATC 3'
- XCirp_Start_EcoRI_fwd 5' TAC GAA TTC AAT GTC TGA CGA AGG AAA ACT C 3'
- XCirp_Stop_XhoI_back 5' CTT CTC GAG TTA CTC GTG TGT AGC ATA GCT G 3'

Konstrukte zur RNA-Injektion

- Conductin in pSP64T (von J. Behrens, Erlangen)
- tBR in pSP64 T3 (von W. Knöchel, Ulm)
- XTcf-3 in pCS2+myc (von D. Gradl, Karlsruhe)
- XTcf-4A in pCS2+myc (von D. Gradl, Karlsruhe)
- XTcf-4C in pCS2+myc (von D. Gradl, Karlsruhe)
- Xwnt8 in pSP64 T3 (von R. T. Moon, Seattle, USA)

Morpholinos

(von Gene Tools, LLC, USA)

- XTcf-3 Morpholino 5' CGC TGT TGA GCT GAG GCA TGA TGA G 3'
- XTcf-4 Morpholino 5' CGC CAT TCA ACT GCG GCA TCT CTG C 3'
- XCirp Morpholino 5' AGA GTT TTC CTT CGT CAG ACA TGA 3'

Konstrukte zur Herstellung digoxigenierter anti-sense RNA als *in-situ*-Sonde

- | | linearisiert | transkribiert | |
|------------------|----------------|---------------|--|
| • Eya1 | <i>BamHI</i> | T7 | (von R. David, Ulm) |
| • Hmgb3 | <i>NcoI</i> | Sp6 | (vorliegende Arbeit) |
| • Hmgn1 | <i>SpeI</i> | T7 | (von R. Hock, Würzburg) |
| • Hmgn2 | <i>XhoI</i> | Sp6 | (von R. Hock, Würzburg) |
| • Hmg-x | <i>NotI</i> | T7 | (vorliegende Arbeit) |
| • Meis3 | <i>EcoRI</i> | T7 | (von J. Baker, Texas, USA) |
| • myoD | <i>HindIII</i> | T7 | (von R. Rupp, München) |
| • NM_001092746 | <i>NcoI</i> | Sp6 | (vorliegende Arbeit) |
| • Sox2 | <i>EcoRI</i> | T7 | (von E. de Robertis, Los Angeles, USA) |
| • XCirp in pGEMT | <i>EcoRI</i> | Sp6 | (vorliegende Arbeit) |
| • XTcf-3 | <i>ApaI</i> | Sp6 | (von M. Kunz, Karlsruhe) |
| • XTcf-4 | <i>SacI</i> | T7 | (von A. König, Ulm) |

Kits

- pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Promega GmbH, Mannheim)
- mMMESSAGE mMACHINE™ (Ambion Ltd, Huntingdon, Großbritannien)
- Random Primed DNA Labeling Kit (Boehringer, 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)
- ECL+plus Western Blotting Detection System (Amersham GmbH, Freiburg)

Lösungen

Alle Lösungen werden entweder autoklaviert oder aus sterilen Stammlösungen und Aqua bidest bzw. DEPC-(Diethyl-Pyrocyanat)-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 – 20°C lagern.
- Antikörperlösung (für Anti-Digoxygenin Antikörper)
0.05% (v/v) Anti-Digoxygenin-AP Fab Fragmente in Blockierungspuffer.
- Alkalische Phosphatasepuffer für NBT/BCIP (AP Puffer)
0.1 mM 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, pH 7.5.
- APBS/T
APBS, 0.1% (v/v) Tween 20.
- APBS/T/NaCl
APBS, 0.1% (v/v) Tween 20, 0.3M NaCl.
- APBS-B
1% (w/v) BSA in APBS.
- ABBS-F
20% (v/v) FCS in APBS.
- Blockierungspuffer für Immunfärbung auf Gefrierschnitten
20% Pferdeserum, 5% DMSO.

- Blockierungspuffer für In-situ-Hybridisierung
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 0.1x MBSH, mit 10 M NaOH pH 8.2.
- DAPI-(Diamin-Phenylindol-Dihydrochlorid)-Kernfärbelösung:
Stammlösung: 1 mg/ml in APBS
Gebrauchslösung: Stammlösung 1:2 500 in APBS, lagerfähig bei 4 °C im Dunkeln.
- 50x Denhardt's
1% (w/v) BSA, 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidon (PVP), 1% (w/v) Ficoll 400, DEPC-H₂O.
- Dent's Fixierlösung
20% DMSO, 80% Methanol.
- DEPC-H₂O
1 ml Diethylpyrocarbonat über Nacht in einem Liter Aqua bidest. rühren und anschließend durch Autoklavieren inaktivieren.
- Elektrophorese-Laufpuffer für SDS-PAGE
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 x 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 µl 2-Mercaptoethanol die Lösung klar werden lassen. Die Elvanolgebrauchslösung ist bei – 20°C über 10 Monate lagerfähig.
- Gelatine-Albumin-Gebrauchslösung
2,2 g Gelatine in 450 ml PBS erhitzen bis sich die Gelatine gelöst hat, dann abkühlen lassen. 135 g Rinder-Albumin zugeben und rühren bis es vollständig gelöst ist. 90 g Saccharose dazugeben. Die fertige Gelatine-Albumin-Gebrauchslösung in 2 ml Portionen bei – 20°C lagern.
- Glycerinlösung
10% (v/v) Glycerin in Aqua bidest.
- Heparinlösung
100 mg/ml in DEPC-H₂O, bei – 20°C lagern.
- Hybridisierungspuffer
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, 5 mM EDTA, 0.1% (w/v) CHAPS (3-[(3-Chloramidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat).

- 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 (Ø 9.4 cm) gießen; die erkalteten Platten werden kopfüber 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 NaHCO₃, 100 mM KCl, 4 mM CaCl₂, 3.3 mM Ca(NO₃)₂, 100 mM HEPES(2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny]-Ethansulfonsäure), 8 mM MgSO₄, pH 7.4.
- 1xMEM
100 mM MOPS pH 7.4, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, DEPC-H₂O.
- MEMFA
MEM, 0.1% (v/v) Tween 20, 3.7% (v/v) Formaldehyd, DEPC-H₂O.
- NBT/BCIP-Färbelösung
1% (v/v) NBT/BCIP Stammlösung (Roche) in AP Puffer.
- 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.
- Ponceau-Färbelösung
1% (v/v) Essigsäure, 0.5% (v/v) Ponceau S.
- Proteinase K-Lösung
1% (w/v) Proteinkinase K in TBST.
- RIPA-Puffer
50mM Tris/HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 2 mM 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 – 20°C 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, ad 1l 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.
- TAE-Puffer
40 mM Tris/Acetat pH 8.3, 1 mM EDTA.
- TBE-Puffer
89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8.0
- TBE-Harnstoff-Ladepuffer (2x)
89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, 7 M Harnstoff, 12% Ficoll, 0.01% Bromphenolblau, 0.02% Xylene-Cyanol FF
- 10xTBS
25 mM Tris-HCl pH 7.4, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂.
- TBST
1xTBS, 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
- TFB1
30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 15% Glycerin, pH mit Essigsäure auf 5.8 einstellen, bei Raumtemperatur lagern.
- TFB2
100 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl und 15% Glycerin
pH mit 1 M KOH auf 6.5 einstellen, bei Raumtemperatur lagern.
- Transferpuffer für Western Blot
25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10% (v/v) Methanol.
- Triethanolamin-Lösung
0.1 M Triethanolamin (1,86 g Triethanolamin/100ml DEPC-H₂O), pH 7.5

- Torula RNA-Lösung
50 mg/ml in DEPC-Wasser bei 80°C lösen und bei – 20°C lagern.

Geräte

- Brutschrank, APT LineSerieBD/ED/FD (Binder, Tuttlingen)
- Blue-Link Cross-Linker BLX-254 (BlueLine)
- Cryostat 2800-Frigocut N (Leica Instruments GmbH, Nussloch)
- Flachbettgelelektrophoresekammern (Amersham, Freiburg)
- Fluoreszenzbinokular
 - Leica S8AP0 (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 3.1.1 (Openlab, Heidelberg)
- Fluoreszenzmikroskop
 - DMIRE2 und CTR MIC (Leica Mikrosysteme, Bensheim)
 - Digitalkamera C4742-95-12 ERG (Hamamatsu, Herrsching)
 - und Software, Openlab 3.1.1 (Openlab, Heidelberg)
- Geldokumentationsanlagen
 - Diana II (Raytest, Straubenhardt)
 - Gel Max (Intas, Göttingen)
- Hybridisierungs-Inkubator 7601 (GFL, Burgwedel)
- Imager
 - Instant Imager (Canberra Packard, Österreich)
- Kühlbrutschrank BK-600 (Kendro, Langenselbold)
- Membran-Vakuum-Pumpe (Vacuubrand, Wertheim)
- Micropipette Puller Model P-97 (Sautter Instruments, Novato, USA)
- 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™, und Blotapparatur, Mini Trans Blot (Bio-Rad, München)

Materialien

- PCR Cycler, Personal Cycler und UNO II (Biometra, Göttingen)
- PCR Cycler, iCycler (Bio-Rad, München)
- PCR/UV Work station, Cleanspot (Coy, Michigan, USA)
- pH-Meter (WTW, Weilheim)
- Photometer, Bio-Photometer (Eppendorf, Hamburg)
- Phosphoimager BAS 1500 (Fuji, Japan)
- Rotationsverdampfer Rotavapor-R (Büchl Labortechnik GmbH, Essen)
- Schüttelinkubator, Orbital Shaker (Thermo Forma, Marietta, USA)
- Ultra-Turrax T8, Homogenisator (IKA Labortechnik GmbH, Staufen)
- Vibratom, Leica VT 1000S (Leica Mikrosysteme, Bensheim)
- Zentrifugen
 - Biofuge fresco (Kendro, Langenselbold)
 - Centrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg)
 - Multifuge® 3 S-R (Kendro, Langenselbold)

4 Methoden

4.1 Entwicklungsbiologische und Immunbiologische Methoden

4.1.1 Tierhaltung

Jeweils zehn adulte *Xenopus laevis* werden nach Geschlechtern getrennt in 50 Liter fassenden Aquarien bei einer Wassertemperatur zwischen 18°C und 20°C gehalten. Das in der Anlage zirkulierende Wasser wird mit Hilfe eines Bakterienfilters und durch UV-Bestrahlung entkeimt. Die Tiere erhalten 14 Stunden Licht pro Tag. Als Nahrung dient Fertigfutter in Form von Presslingen, dazu kommt einmal wöchentlich klein geschnittenes Rinderherz.

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

Zur Induktion der Eireifung bei den weiblichen *Xenopus laevis* wird humanes Choriongonadotropin subkutan in den dorsalen Lymphsack injiziert. Für eine Eiablage nach 14-16 Stunden injiziert man 600 Einheiten. Für eine Ablage nach 20-22 Stunden injiziert man zunächst 50 Einheiten, 6-8 Stunden vor der gewünschten Ablage werden nochmals 600 Einheiten gegeben. Zwischen den einzelnen Eiablagen sollte mindestens eine Stunde Pause liegen, und von jedem Weibchen sollten nicht mehr als vier Gelege an einem Tag gewonnen werden. Zwischen einem Tag, an dem ein Weibchen zur Eiablage herangezogen wurde, und dem nächsten Termin sollten mindestens drei Monate vergehen.

Um das Weibchen zur Eiablage anzuregen, wird es mit einer Hand so gehalten, dass die Hinterbeine fixiert sind. Dann wird die Lendenregion durch leichten Druck mit den Fingern der freien Hand massiert. Aus der Kloake austretende Eier werden in einer Petrischale aufgefangen. Eine Befruchtung erfolgt ausschließlich bei gesunden Gelegen mit reifen Eiern und normaler Gallerthülle.

4.1.3 Testisextraktion

Die Betäubung eines Männchens erfolgt durch Umsetzen in eine kalte 0.25% (v/v) Aminobenzoesäure-Ethylester-Lösung. Nach ca. 30 Minuten kann das Tier schmerzfrei durch ein schnelles Durchschneiden der Halswirbelsäule getötet werden. Die Bauchdecke wird durch einen medianen Schnitt geöffnet. Die Hoden liegen als ovale Körper im dorsalen

Fettgewebe ventral der Nieren. Sie werden entnommen, gereinigt und in 1xMBSH bei 4°C nicht länger als 4-5 Tage bis zur Mazerierung gelagert.

4.1.4 *In-vitro*-Fertilisation

Durch *in-vitro*-Fertilisation wird eine gleichmäßige und synchrone Entwicklung möglichst vieler Embryonen sichergestellt. Dazu wird ein Drittel des Hodens in 1 ml 1xMBSH mazeriert. 100 µl dieser Suspension werden mit 900 µl sterilem Aqua bidest. verdünnt – wodurch die Spermien mobil werden – und auf das frische Gelege gegeben. Nach ca. 20 Minuten äußert sich eine erfolgreiche Befruchtung durch eine Drehung der Eier, so dass die pigmentierte animale Seite der Oberfläche zugewandt ist. Um ein Austrocknen zu vermeiden, wird der Laich nun mit 0.1xMBSH überschichtet.

4.1.5 Entfernen der Gallerthülle

Zur Vereinzelung der Zygoten wird der Laich ca. eine Stunde nach der Befruchtung und vor der ersten Zellteilung mit einer 2% Cysteinlösung pH 8 für ca. 5 Minuten behandelt, wodurch die umgebende Gallerthülle gelöst wird. Haften keine Zygoten mehr aneinander, werden sie zur Entfernung des verbliebenen Cysteinchlorids mehrmals mit 0.1xMBSH gewaschen.

4.1.6 Mikroinjektion

Mit Hilfe der Mikroinjektion können Funktionsgewinn- und Funktionsverlust-Studien an Embryonen durchgeführt werden. Dabei dient eine zu einer Hohladel mechanisch ausgezogene Glaskapillare nach ihrer Eichung mit Hilfe eines Gitters aus der Elektronenmikroskopie zur Applikation definierter Mengen an *in-vitro*-transkribierter mRNA oder Morpholino-Oligonukleotiden. Mit Hilfe von N₂-Gasdruck wird je nach Eichung der Injektionsnadel ein Injektionsvolumen zwischen 4 und 16 nl appliziert.

Zur Betrachtung der Überexpressions- und Depletions-Phänotypen in der Ganzkeimfärbung wird in den animalen Pol einer Blastomere eines Embryos im Zwei-Zellstadium injiziert. Erfolgt die Analyse dagegen mittels RT-PCR oder auf Proteinebene wird die mRNA beziehungsweise das Morpholino in beide Blastomeren appliziert. Während durch die Teilungsebene im Zwei-Zellstadium die zukünftigen Körperhälften entlang des Medians getrennt sind, können in Embryonen ab dem Vier-Zellstadium dorsale und ventrale Bereiche unterschieden werden. Zur Untersuchung von spezifischen Phänotypen wie konvergenter Extensionsbewegung oder Achsen-Ausbildung wird im Vier-Zellstadium dorsal oder ventral in die Marginalzone injiziert. Im 16-Zellstadium können die Auswirkungen von Funktionsgewinn- und Funktionsverlust durch die gezielte Applikation in eine der dorsal-animalen Blastomeren auf deren Abkömmlinge eingeschränkt werden. Dabei tragen die

Abkömmlinge der dorsal-animalen Blastomere vorwiegend zu den Geweben des ZNS, der Zementdrüse, dem anterioren Mesoderm und Endoderm bei.

4.1.7 Embryonenpflege

Da die Entwicklungsgeschwindigkeit der Embryonen temperaturabhängig ist, kann das Tempo durch die Wahl einer Inkubationstemperatur zwischen 14°C und 25°C gesteuert werden. Dabei entwickeln sich Embryonen bei niedrigen Temperaturen langsamer bzw. bei höheren Temperaturen schneller. Abgestorbene Embryonen und unbefruchtete Eier sollten entfernt und das Kulturmedium täglich gewechselt werden. Die Einteilung der Entwicklungsstadien erfolgt nach Nieuwkoop und Faber (1967).

Haben die Embryonen das für den jeweiligen Versuch gewünschte Stadium erreicht, werden sie entweder eine Stunde in MEMFA für eine Ganzkeimfärbung oder Gefrierschnitte fixiert oder mittels flüssigem Stickstoff für eine RNA- bzw. Proteinextraktion schockgefroren. Zunächst in MEMFA fixierte Embryonen werden anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Methanol bzw. Ethanol bei –20°C aufbewahrt. Schockgefrorene Embryonen werden bei –80°C gelagert.

4.1.8 Präparation ektodermaler Explantate (animale Kappen)

Ektodermale Explantate werden im Stadium neun aus Embryonen explantiert. Dazu muss zunächst die Vitellinmembran mit Hilfe von zwei spitzen Pinzetten abgezogen werden. Anschließend durchsticht man auf der animalen Seite des Embryos vorsichtig das Blastocoeldach und schneidet mit den Pinzetten ein quadratisches Stück aus.

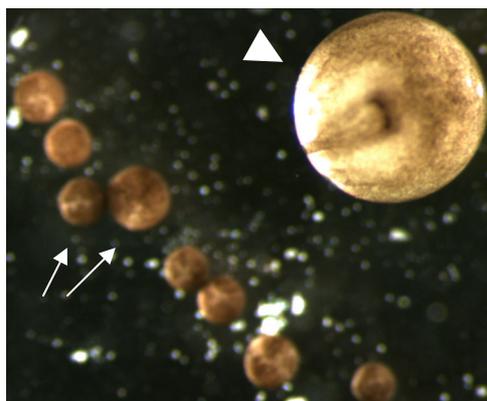


Abb. 7 Animale Kappen (Pfeile) und Kontrollembryo im Stadium 16 (Pfeilkopf).

Solche ektodermale Explantate werden in Antibiotika-haltigem 1xMBSH weiter inkubiert, bis Kontroll-Embryonen aus dem gleichen Gelege das gewünschte Stadium erreicht haben (Abb. 7). Intakte Kappen runden sich bereits nach kurzer Inkubationszeit zu kleinen

Gewebekugeln ab. Für weitere Versuche werden diese animalen Kappen wie auch ganze Embryonen entweder in MEMFA fixiert oder mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren.

4.1.9 Präparation von Explantaten der dorsalen Marginalzone

(Keller-Explantate)

Explantate der dorsalen Marginalzone werden aus Embryonen im Stadium 10,5 entnommen, denen zuvor die Vitellinmembran abgezogen wurde. Dazu wird der Bereich animal der dorsalen Blastoporus-Lippe in Form eines stumpfen Kreissegments mit einem dünnen Haar ausgeschnitten. Anschließend werden das anhaftende Endoderm und die Urmund-Lippe sorgfältig entfernt. Das explantierte Gewebe wird nun in eine mit BSA beschichtete kleine Petrischale (Ø 35 mm) überführt und so orientiert, dass die ursprüngliche Innenseite auf der BSA-Beschichtung zu liegen kommt. Unter einem Deckglas werden die Explantate in Antibiotika-haltigem 1xMBSH kultiviert, bis Kontroll-Embryonen aus dem gleichen Gelege die frühe Neurula (Stadium 13-14) erreicht haben.

4.1.10 Embryoneneinbettung in Gelatine und Anfertigung von Gefrierschnitten

Embryonen werden für eine Stunde in MEMFA unter Schütteln bei Raumtemperatur fixiert und anschließend in vorgekühlter Dent's Fixierlösung bei -20°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag werden sie 30 Minuten bei Raumtemperatur mit einer 100 mM NaCl/100 mM Tris-HCl-Lösung (pH 7.4) gewaschen und dann über Nacht bei Raumtemperatur in einem 15% Kaltwasserfisch-Gelatine/15% Saccharose-Gemisch äquilibriert. Nach dieser Inkubation werden die Embryonen für eine weitere Nacht in ein 25% Kaltwasserfisch-Gelatine/15% Saccharose-Gemisch überführt. In diesem Medium ist eine Lagerung bei 4°C für eine Woche möglich.

Um einen Block für das Schneiden zu gießen, überführt man die Embryonen in eine Silikonform. Nachdem sie auf den Boden der Form gesunken sind, werden die Embryonen ausgerichtet, und die Form für eine Stunde auf Trockeneis eingefroren. Nach dem Aushärten des Blocks wird dieser in eine scharfkantige, quadratische Form getrimmt und mit Hilfe eines Gewebeklebers bei -20°C auf den Objekthalter des Cryotoms geklebt. Der Block wird in das Cryotom eingesetzt und zur Klinge des Messers ausgerichtet. Es werden Schnitte mit einer Dicke von $16\ \mu\text{m}$ angefertigt und mit Hilfe eines gekühlten Zahnstochers direkt von der Klinge auf einen Objektträger übertragen. Die Lagerung der Schnitte erfolgt bei -20°C .

4.1.11 Immunfärbung auf Cryoschnitten

Die bei -20°C gelagerten Schnitte werden mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Zum Blockieren werden sie mit 20% Kälberserum in APBS/T mit 5% DMSO für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgt für eine Doppelfärbung die Inkubation mit den beiden ersten Primärantikörpern in 10% Kälberserum in APBS/T bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag werden die Schnitte zunächst zweimal für je fünf Minuten mit APBS/T gewaschen und dann, um den Hintergrund zu reduzieren, für weitere fünf Minuten mit APBS/T mit 0.3 M NaCl behandelt. Nach einem weiteren Waschen (zweimal für je fünf Minuten mit APBS/T) werden die Schnitte mit den beiden zweiten, Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird erneut zweimal für je fünf Minuten mit APBS/T gewaschen und die Schnitte für weitere fünf Minuten mit APBS/T mit 0.3 M NaCl behandelt, um den Hintergrund zu reduzieren. Zur Färbung der Zellkerne werden die Schnitte zwei Minuten lang mit einer DAPI-Lösung inkubiert. Nach einem letzten Waschen (zweimal für je fünf Minuten mit APBS/T) werden die Schnitte bei Raumtemperatur getrocknet und in Elvanol eingebettet.

4.1.12 Ganzkeimfärbung – Whole mount *in situ*-Hybridisierung

Die *In-situ*-Hybridisierung ist eine Methode zur Lokalisierung von mRNA in Zellen von Geweben oder ganzen Organismen (Ganzkeimfärbung) durch Hybridisierung der gesuchten Sequenz mit dem komplementären Strang einer Nukleotid-Sonde. Als Sonde dient eine zu der spezifischen RNA-Sequenz komplementäre Nukleotid-Sequenz mit einer Länge von 20 bis 1 000 Basen. Durch *in-vitro*-Transkription linearisierter Plasmid-DNA mit RNA-Polymerasen werden solche RNA-Sonden hergestellt. Zur Markierung der RNA-Sonden dient Digoxigenin, ein aus *Digitalis* isoliertes Steroid, das nur in den Blüten und Blättern dieser Pflanzen vorkommt. Digoxigenin ist mit dem C5-Atom der Uridinbase verbunden und kann so in die RNA-Sequenz eingebaut werden. Der Digoxigenin-spezifische Antikörper ist mit einer alkalischen Phosphatase verbunden, die das Substrat NBT/BCIP (4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid/5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat) zu einem blauen Präzipitat umsetzt. Der Nachweis einer bestimmten transkribierten RNA und damit eines spezifischen Genexpressionsmusters durch Hybridisierung mit einer komplementären, Antigen-markierten RNA-Sonde erlaubt Aussagen sowohl über das räumliche als auch das zeitliche Muster der Expression.

Die in MEMFA-fixierten Embryonen werden über eine absteigende Alkohol-Reihe rehydratisiert. Dazu werden sie in ein 2.5ml-Schraubdeckelgefäß überführt und je fünf Minuten in 75% (v/v), 50% (v/v) sowie 25% (v/v) Ethanol in PBST unter Wippen inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit PBST werden die Embryonen mit Proteinase K behandelt. Dabei werden junge Stadien (bis etwa Stadium 11.5) nur 10 min permeabilisiert, während bei

älteren Stadien die Membranproteine bis zu 25 min hydrolysiert werden. Die enzymatische Reaktion wird durch zweimal fünf Minuten Waschen mit frisch angesetztem 0.1M Triethanolamin pH 7.5 abgestoppt. Durch zweimalige Zugabe von 5 µl Essigsäureanhydrid für je fünf Minuten werden die in den Embryonen vorhandenen basischen Proteine acetyliert, um deren unspezifische Bindung an die RNA-Sonde zu unterbinden. Anschließend werden die Embryonen zweimal fünf Minuten mit PBST gewaschen und mit frisch angesetztem 4% (v/v) Formaldehyd in PBST für 20 Minuten nachfixiert. Durch fünfmaliges Waschen mit PBST für je fünf Minuten wird die Fixierlösung wieder entfernt. Zur Hybridisierung werden die Embryonen zunächst in 500 µl Hybridisierungspuffer überführt und für 10 Minuten in einem Wasserbad bei 60°C inkubiert. Nach einmaligen Erneuern des Hybridisierungspuffers werden die Embryonen in diesem für sechs Stunden bei 60°C weiterinkubiert. Die Digoxigenin-markierte RNA-Sonde wird in Hybridisierungspuffer aufgenommen (0.5 µg/500 µl) und für fünf Minuten bei 85°C inkubiert, um mögliche Sekundärstrukturen aufzutrennen. Die Embryonen werden mit 500 µl der so vorbehandelten Sonde bei 60°C über Nacht inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wird die Sonde abgenommen und kann zur Wiederverwendung bei –20°C gelagert werden. Zum Waschen wird zunächst 1 ml frischer Hybridisierungspuffer zugegeben und die Embryonen für 10 Minuten erneut bei 60°C inkubiert. Bei dieser Temperatur werden sie für dreimal 20 Minuten mit 2x SSC gewaschen. Um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren, werden ungebundene RNA-Sonden durch einen RNase-Verdau abgebaut. Dazu werden die Embryonen zweimal für je 30 Minuten bei 37°C mit einem Gemisch aus RNase A (20µg/ml) und RNase T1 (10 U/ml) behandelt. Anschließend werden die RNasen durch zehn-minütiges Waschen mit 2x SSC bei Raumtemperatur wieder entfernt. Noch zweimal wird für 20 Minuten mit 0.2x SSC bei 60°C gewaschen. Vor dem Blockieren werden sie bei Raumtemperatur für zweimal fünf Minuten in 1xMAB äquilibriert. Anschließend werden die Embryonen in zwei Schritten blockiert. Dazu werden sie zunächst für 30 Minuten in eine 1xMAB/2% (w/v) BMB-Lösung überführt und anschließend für eine Stunde in einer 1xMAB/2% (w/v) BMB-Lösung mit einem zusätzlichen Anteil von 20% Pferdeserum bei Raumtemperatur gehalten. Die Blockierungslösung wird anschließend abgenommen und durch die Antikörperlösung ersetzt. In dieser Lösung werden die Embryonen für vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Antikörper-Inkubation werden die Embryonen in 50 ml 1xMAB bei 4°C unter leichtem Schütteln gewaschen. Am nächsten Tag werden sie in den Alkalische-Phosphatase-Puffer überführt und zweimal je 20 Minuten äquilibriert, wobei der zweite Schritt des Umpufferns bei 4°C stattfindet. Zur Färbung werden die Embryonen in 1 ml NBT/BCIP-Färbelösung bei 4°C im Dunkeln inkubiert, bis die gewünschte Farbtiefe erreicht ist. Um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden wird die Färbelösung auf Eintrüben kontrolliert und gegebenenfalls durch frische Lösung ersetzt. Um die Reaktion

abzustoßen, wäscht man die Embryonen kurz in Wasser. Durch eine Behandlung mit 100% Methanol können unspezifische Farbstoffablagerungen ausgewaschen werden. Nach einer absteigenden Alkoholreihe werden die gefärbten Embryonen ein bis zwei Stunden in MEMFA bei Raumtemperatur nachfixiert. Für ein bis zwei Monate können die Embryonen bei 4°C in MEM gelagert werden. Für eine dauerhafte Aufbewahrung sollten sie schrittweise in 100% Methanol überführt und bei – 20°C gelagert werden.

Ganzkeimgefärbte und fixierte Gastrula-Embryonen werden für eine detaillierte Innenansicht mit Hilfe einer Rasierklinge durch einen Sagittal-Schnitt halbiert.

4.1.13 Embryoneneinbettung in Agarose und Anfertigen von Vibratomschnitten

Die durch MEMFA-Behandlung fixierten und in 1xMEM gelagerten Embryonen werden in PBS umgepuffert und in kleinen Petrischalen (Ø 35 mm) mit 2-3% (w/v) Agarose eingegossen. Nach dem Aushärten wird der Embryo mit der umgebenden Agarose als Block ausgeschnitten und für die gewünschte Schnittebene ausgerichtet. Vom fixierten Block werden Schnitte mit einer Dicke von 40 µm angefertigt, auf einen Objektträger überführt und mit Elvanol unter einem Deckglas eingebettet. Anschließend werden die Schnitte am Mikroskop fotografiert.

Alternativ kann auch in Gelatine-Albumin eingebettet werden. Für die Einbettung wird die Gelatine-Albumin-Gebrauchslösung pro ml mit 70 µl einer 25%igen Glutaraldehyd-Lösung verrührt und die Embryonen in einer Form eingegossen.

4.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.1 Proteinextraktion aus Embryonen

Je drei Embryonen werden in 100 µl RIPA-Puffer durch achtmaliges Auf- und Abziehen durch eine Kanüle (Ø 0.40 mm) lysiert. Um die Dotterproteine abzutrennen, werden 100 µl Freon zugegeben und mit den homogenisierten Embryonen durchmischt. Den Ansatz zentrifugiert man für zehn Minuten bei 17 900 x g und 4°C ab. Es bilden sich zwei Phasen aus, wobei die obere das gewünschte Protein enthält, und die untere die abzutrennenden Dotterproteine. Der Überstand wird mit 5xSDS-Ladepuffer versetzt und für fünf Minuten auf 95°C erhitzt. Der Ansatz kann jetzt auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen werden.

4.2.2 Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Beim SDS-PAGE erfolgt die Trennung der Proteine im elektrischen Feld in einem denaturierenden Puffer. Die Proteine werden nur nach ihrer Größe aufgetrennt, denn das ionische Detergenz SDS (sodium dodecyl sulfate) bildet mit den meisten löslichen Proteinen und Membranproteinen lösliche Komplexe in konstanten Massenverhältnissen mit konstanter negativer Nettoladung pro Masseneinheit. Die relative Wanderungsstrecke eines SDS-Protein-Komplexes ist linear vom Logarithmus des Molekulargewichts abhängig, daher wandern kleine Proteine weiter in das Gel als große. Als Größenmarker dienen Proteine mit einem definierten Molekulargewicht. Als Trennmatrix wird Polyacrylamid verwendet. Bei der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese passiert die Protein-Probe zunächst ein Sammelgel mit großer Polyacrylamid-Porenweite. Der Sammelpuffer enthält Chlorid-Ionen, deren elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit größer ist als die der Proteinprobe. Der Elektrophorese-Puffer enthält dagegen Glycin-Ionen die langsamer wandern. Die Proteine reihen sich entsprechend ihrer Geschwindigkeit im elektrischen Feld zwischen den Glycin-Ionen mit einer niedrigen und den Chlorid-Ionen mit einer hohen Mobilität ein. Durch diese Vortrennung und Aufkonzentrierung kann eine scharfe Protein-Bande erzeugt werden. Das Trenngel besitzt eine geringere Porenweite, eine höhere Salzkonzentration sowie einen höheren pH-Wert im Vergleich zum Sammelgel. Beim Einwandern der Protein-Proben in das Gel werden die großen Proteine zunächst zurückgehalten bis die Glycin-Ionen vorbeigewandert sind. Im Puffersystem des Trenngels werden die Proteine dann auf Grund ihrer molekularen Größe getrennt.

In der vorliegenden Arbeit wurde für 10 ml eines 8%igen Trenngels 2.7 ml 30% Acrylamid, 2.5 ml 1.5M Tris (pH 8.8) und 0.1 ml SDS (10%) sowie 4.6 ml Aqua bidest. verwendet, für 4 ml eines 5%igen Sammelgels wurde 0.67 ml 30% Acrylamid, 0.5 ml 0.5M Tris (pH 6.8) und 0.04 ml 10% SDS sowie 2.7 ml Aqua bidest. eingesetzt. Die Polymerisierung wird durch Zugabe von 100 µl APS und 6 µl TEMED zum Trenngel bzw. 40 µl APS und 4 µl TEMED zum Sammelgel gestartet.

Zunächst wird das Trenngel zwischen zwei Glasplatten bis ca. 1 cm unterhalb der oberen Kante im Gelgießstand gegossen und dann mit Aqua bidest. überschichtet. Ist das Trenngel ausgehärtet, kann das darüber stehende Wasser wieder abgenommen werden. Über das Trenngel wird nun das Sammelgel gegossen und ein Kamm für die Ladetaschen in das noch flüssige Gel gesteckt. Die Gelelektrophorese-Kammer wird mit 1xElektrophoresepuffer mit 0.1% SDS gefüllt. Das ausgehärtete, zwischen den Glasplatten eingespannte Gel wird in die Gel-Elektrophorese-Kammer eingesetzt. Nach dem Aushärten des Sammelgels wird der Kamm gezogen und die entstandenen Taschen durch Ausspülen mit Elektrophorese-Puffer gereinigt. Anschließend können die Proteinproben in die Taschen geladen und das Gel

zunächst mit 60 V gestartet werden. Sind die Proben ins Trenngel gelaufen, erhöht man die Spannung auf 120 V und lässt die Elektrophorese fortfahren bis die Probenpufferbande bis zum unteren Ende des Gels gelaufen ist. Nach dem Abstoppen der Elektrophorese entnimmt man das zwischen den Glasplatten eingespannte Gel der Kammer und hebt die kleinere Glasplatte vom Gel ab. Das Sammelgel wird entfernt und das Trenngel für eine Coomassie-Färbung oder die Proteinanalyse durch Western Blot weiterverwendet.

Mit Hilfe der Coomassie-Lösung werden die aufgetrennten Proteine angefärbt. Je nach gewünschter Farbintensität wird das Trenngel für 15 Minuten oder mehr in der Coomassie-Färbelösung gebadet. Anschließend wird es mit Aqua bidest. gespült und in Coomassie-Entfärbelösung gewaschen bis der Hintergrund optimal reduziert ist. Zur Aufbewahrung und Dokumentation wird das gefärbte Trenngel zwischen zwei Lagen durchsichtiger Einweck-Folie in einen Rahmen gespannt und getrocknet.

4.2.3 Proteinanalyse mittels Western Blot

Nach der Auftrennung der Proteine im SDS-PAGE werden diese Größen-fractionierten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Blotvorgang erfolgt im elektrischen Feld. Anschließend werden die Proteine mittels eines Antikörper-Komplexes nachgewiesen. Der zweite Antikörper ist mit einem Enzym gekoppelt, das eine Chemilumineszenz-Reaktion katalysiert, bei der es zur Lichtemission kommt. Für den Blot bereitet man ein Sandwich bestehend aus einer Lage Vlies, zwei Watman-Filterpapieren, dem Gel, der Nitrocellulose-Membran, zwei weiteren Watman-Filterpapieren und einer abschließenden Lage Vlies vor. Dabei ist das Gel der Kathode zugerichtet und die Membran der Anode (Abb. 8).

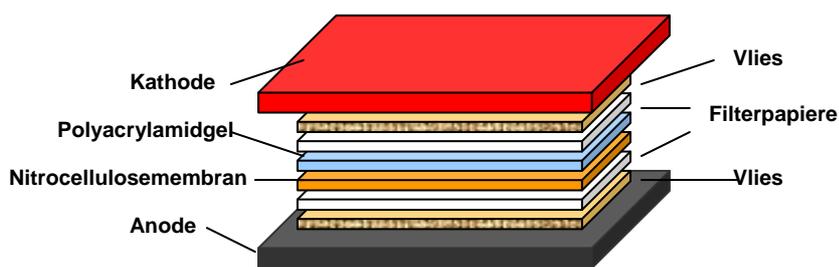


Abb. 8 Anordnung der Blot-Bestandteile im „Sandwich“.

Das Sandwich muss blasenfrei gehalten und mit 1xElektrophorese-Puffer und 10% Methanol feucht gehalten werden. Der eigentliche Transfer erfolgt für ca. eine Stunde bei 111 Volt und 0.3-0.4 Ampère in der eisgekühlten Blotapparatur. Anschließend wird die Nitrocellulose-Membran zunächst mit dem Farbstoff Ponceau S für drei bis fünf Minuten gefärbt. Diese Färbelösung wird mit Aqua bidest. wieder abgespült und die sichtbaren Banden des Molekulargewichtsmarkers mit einem Kugelschreiber auf der Membran eingezeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurde der Proteinstandard SDS-6H der Firma Sigma verwendet, der

Proteine mit den folgenden definierten Molekulargewichten enthält: 29 kDa, 45 kDa, 66 kDa, 97.4 kDa, 116 kDa und 205 kDa. Anschließend wird die Membran für fünf Minuten mit PBST gewaschen und 30 Minuten mit 10%iger Milch in PBST blockiert. Danach wird die Membran dreimal für zehn Minuten mit PBST gewaschen, in eine Plastiktüte eingeschweißt und bei 4°C über Nacht mit dem primären Antikörper (anti-myc 9E10 unverdünnt bzw. anti-XCrip 1:1 000) inkubiert. Am nächsten Tag wird der primäre Antikörper für die Wiederverwendung zurückgewonnen und die Membran dann dreimal für zehn Minuten mit PBST gewaschen. Anschließend folgt die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Maus bzw. Ziege-anti-Kaninchen Antikörper, 1:20 000 in PBS verdünnt) für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach dieser Inkubationszeit wird die Membran erneut für dreimal zehn Minuten mit PBST gewaschen. Zum Nachweis der spezifischen Proteine mit Hilfe des sekundären Antikörpers wird die von der Peroxidase katalysierte Chemilumineszenz untersucht. Als Substrat für die Reaktion werden zwei Lösungen aus dem ECL+plus Western Blotting Detection System-Kit im Verhältnis 1:40 gemischt und auf die Nitrocellulose-Membran gegeben. Mit einer CCD-Kamera wird die auf der Oxidation des zyklischen Diacylhydrazids Luminol beruhende Chemilumineszenz dokumentiert.

Ein parallel gefärbtes Coomassie-Gel dient als Ladekontrolle.

4.3 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

4.3.1 Restriktionsanalyse von DNA

Doppelsträngige DNA wird von bakteriellen Restriktionsendonukleasen glatt oder mit überhängenden Enden an spezifischen, meist palindromischen Sequenzen geschnitten.

Bei einem Gesamtvolumen von 20 µl besteht ein Restriktionsansatz aus ca. 1 µg DNA, zwei bis drei Einheiten Restriktionsendonuklease und einem Zehntel-Volumen zehnfach konzentrierten Puffers. Der Ansatz wird bei der enzymatischen Optimumstemperatur über Nacht inkubiert.

4.3.2 Fällung und Reinigung von DNA und RNA

Um Nukleinsäuren zu fällen, gibt man zu der Lösung das doppelte Volumen absoluten Ethanol sowie ein Zehntel-Volumen 3M Natriumacetat-Lösung (pH 5.2). Nach kurzem Durchmischen wird der Ansatz für mindestens eine Stunde bei –80°C gefällt. Durch 30 Minuten Zentrifugation bei 17 900 x g werden die präzipitierten Nukleinsäuren sedimentiert, der Überstand wird anschließend verworfen. Der Niederschlag wird mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und für weitere 30 Minuten zentrifugiert. Auch dieser Überstand wird verworfen und der verbliebene Niederschlag bei Raumtemperatur getrocknet. Die Nukleinsäuren

werden in einem möglichst kleinen Volumen sterilen Aqua bidest. bzw. DEPC-Wasser wieder resuspendiert. Statt mit absolutem Ethanol kann die Fällung auch mit Isopropanol erfolgen. Dabei gibt man zu der Lösung das 0.7fache Volumen an Isopropanol und wäscht mit 70% (v/v) Ethanol wie oben.

Wahlweise können Nukleinsäuren auch über Säulen mit einer Affinitätsmatrix aufgereinigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden dazu „Probe Quant G50 Micro Columns“ (Amersham) verwendet und die Aufreinigung gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Diese Art der Aufreinigung hat in der Regel eine niedrigere Nukleinsäure-Konzentration zur Folge, erzielt aber durch die Abtrennung störender Nukleotide einen hohen Reinheitsgrad.

4.3.3 Analytische Flachbett-Gelelektrophorese

Geladene Nukleinsäuren, beispielsweise DNA-Fragmente, können in einem Agarosegel entsprechend ihrer Größe durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt werden. Nukleinsäuren tragen an jeder Monomereinheit eine Ladungseinheit, das heißt die Ladung ist zu der jeweiligen Moleküllänge proportional. Für die relative Mobilität ist die Moleküllänge bestimmend und ein Molekül wandert umso schneller durch die Agarosematrix, je kleiner es ist. Da der Logarithmus der relativen Mobilität der Nukleinsäure linear von der Gelkonzentration abhängig ist, wird für Fragmente bis zu einer Größe von 500bp ein 2%iges Agarosegel verwendet, während größere Fragmente in einem 1%igen Gel aufgetrennt werden. Durch Aufkochen wird 1% bzw. 2% (w/v) Agarose in TAE-Puffer gelöst und nach kurzem Abkühlen mit Ethidiumbromid im Verhältnis 10 000:1 versetzt. Die auf ca. 50°C abgekühlte Suspension wird in eine vorbereitete Gelform gegossen, wo sie im Verlauf der weiteren Abkühlung aushärtet. Ein in der Form positionierter Kamm dient dazu, Taschen für die Probenaufnahme auszusparen.

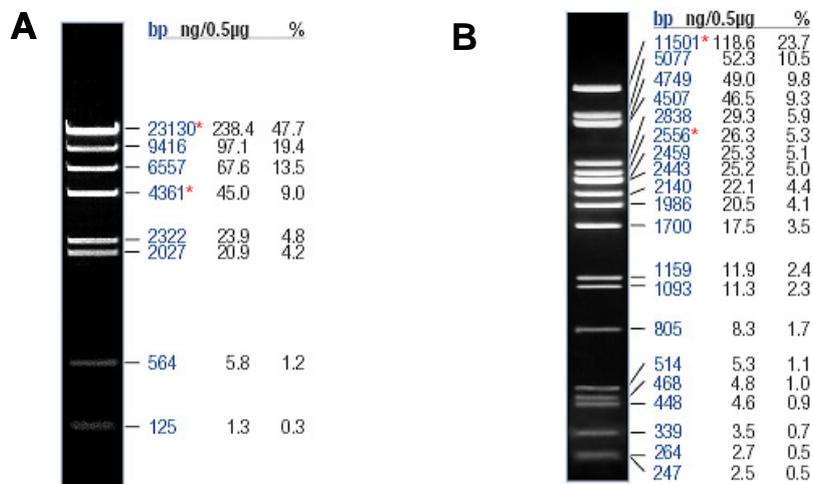


Abb. 9 A Lambda-DNA/HindIII-Marker **B** Lambda-DNA/PstI-Marker
In Spalten angegeben sind jeweils Größe in bp, Gewichtsanteile und prozentuale Anteile der aufgetrennten Fragmente.

In diese Geltaschen werden die mit sechsfach-konzentriertem Ladepuffer versetzten Nukleinsäureproben gegeben und durch Anlegen einer Gleichspannung von 80 bis 120 V aufgetrennt. Als Polyanionen wandern DNA-Fragmente auf die Anode zu. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basenpaare der DNA-Fragmente, die dann nach Anregung mit UV-Licht einer Wellenlänge von $\lambda = 312 \text{ nm}$ oder $\lambda = 254 \text{ nm}$ fluoreszieren. Diese Lichtemission und damit die gelelektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren kann anschließend mit einer Kamera dokumentiert werden.

Durch den Vergleich der Laufstrecke mit einem gleichzeitig aufgetrennten Größenstandard kann die Größe der DNA-Fragmente bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde entweder der Lambda-DNA/HindIII-Marker (Abb. 9 A) oder der Lambda-DNA/PstI-Marker (Abb. 9 B) der Firma Fermentas verwendet.

4.3.4 Präparative Flachbett-Gelelektrophorese

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung werden die gesuchten Banden mit einem sauberen Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) kann die DNA entsprechend den Herstellerangaben extrahiert werden. Zu einem ausgeschnittenen Gelstück wird das Dreifache an QG-Puffer (wobei $100 \text{ mg} \cong 100 \mu\text{l}$) gegeben und der Ansatz für zehn Minuten bei 50°C geschmolzen. Daraufhin wird die Agarose-Suspension auf eine Säule gegeben. Dies ermöglicht die Adsorption der DNA-Fragmente an die in der Säule enthaltene Silica-Membran. Die Säule wird anschließend eine Minute bei $17\,900 \times g$ zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Alle folgenden Zentrifugationsschritte werden wie zuvor beschrieben durchgeführt. Die verbliebenen Agarose-Reste werden mit $500 \mu\text{l}$ QG-Puffer von der Silica-Membran gewaschen und es wird erneut zentrifugiert. Die Säule wird mit $750 \mu\text{l}$ ethanol-haltigem PE-Puffer gewaschen und nach einer Wartezeit von zwei bis fünf Minuten nochmals zentrifugiert. Anschließend setzt man die Säule in ein frisches Reaktionsgefäß und gibt $40 \mu\text{l}$ steriles Aqua bidest. direkt auf die Silica-Membran. Nach ein bis zwei Minuten wird die DNA durch Zentrifugation eluiert.

4.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden können durch Schließen der Phosphatbrücken in der DNA enzymatisch ligiert werden.

Ein Reaktionsansatz hat ein Gesamtvolumen von $10 \mu\text{l}$. Es werden 25-50 ng linearisierter Vektor und das zu insertierende Fragment im drei- bis siebenfachen molaren Überschuss zusammengegeben. Neben $5 \mu\text{l}$ 2xRapid-Ligationspuffer enthält der Ansatz noch $1 \mu\text{l}$ (10 U) T4-DNA-Ligase. Die Ligation erfolgt bei 4°C über Nacht.

4.3.6 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Zellen des JM109-*E. coli*-Stamms werden auf einer Antibiotika-freien LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. 5 ml Antibiotika-freies LB-Medium wird mit einer einzelnen Kolonie von der LB-Platte angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. 0.5 ml Übernachtskultur werden in 50 ml mit 20 mM MgSO₄ versetztem LB-Medium 1:100 verdünnt. Die Zellen werden in einem 500 ml-Erlenmeyer-Kolben inkubiert bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 0.4-0.6 erreicht hat. Die Bakterienkultur wird auf Eis gekühlt und anschließend für fünf Minuten bei 4 500 x g und 4°C zentrifugiert. Die Zellen werden in 20 ml eiskaltem TFB1-Puffer resuspendiert und eine Stunde lang auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen erneut für fünf Minuten bei 4 500 x g und 4°C zentrifugiert und dann in 2 ml eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert. Die Zellen werden 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden je 100 µl Bakteriensuspension pro Reaktionsgefäß aliquotiert und bei – 80°C eingefroren.

4.3.7 Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Bakterien

Zu 50 µl JM-109-Bakterien werden 2 µl Ligationsansatz gegeben und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 45-50 Sekunden Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C kommen die Bakterien für zwei Minuten auf Eis. Danach werden sie in 950 µl SOC-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C und 150 rpm geschüttelt. 400 µl dieses Ansatzes werden auf einer LB/Ampicillin-Platte ausplattiert. Für eine Blau-Weiß-Selektion werden zusätzlich mit 40 µl IPTG und X-Gal versetzte Platten verwendet. Die Platten werden bei 37°C über Nacht inkubiert.

4.3.8 Blau-Weiß-Selektion

Das Klonierungsplasmid pGEM-T enthält den kodierenden Bereich für die β-Galaktosidase als Reportergen. Die Transkription dieses Gens wird durch den regulierbaren lac-Promotor/Operator kontrolliert. Im vorderen Bereich des β-Galaktosidase-Gens befindet sich eine multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site, MCS). Die MCS enthält eine Vielzahl von Erkennungssequenzen für unterschiedliche Restriktionsendonukleasen, die das Plasmid jeweils nur einmal schneiden. Wird ein DNA-Fragment in die MCS ligiert, wird das β-Galactosidase-Gen inaktiviert und die enzymatische Aktivität geht verloren. Diese Inaktivierung lässt sich mit Indikatoren durch einen Farbttest nachweisen. Die transformierten Bakterien werden dazu auf Platten kultiviert, deren Agar mit dem farblosen Indikator X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid) und dem Lactose-Analogen IPTG (Isopropylthio-galactosid) imprägniert wurde. IPTG induziert in *E. coli* die Synthese der β-

Galaktosidase, welche das Substrat X-Gal in Galaktose und ein Indoxyl-Derivat spalten kann. Dieses Indoxylderivat oxidiert an der Luft zum blauen Farbstoff 5,5'-Dibromo-4,4'-dichloroindigo und die Bakterienkolonien färben sich blau. Wurde allerdings durch die Insertion eines DNA-Fragments in die MCS das für die β -Galaktosidase kodierende Gen inaktiviert, bleiben die Kolonien weiß. Diese Zellen können als Träger eines rekombinanten Plasmids identifiziert und gezielt weiter verwendet werden.

4.3.9 Isolierung bakterieller Plasmid-DNA im Klein- und Mittelmaßstab

Plasmid-DNA kann durch die Adsorption an eine Affinitätsmatrix mit einem hohen Reinheitsgrad gewonnen werden. Mit Hilfe des Plasmid Mini bzw. Midi Kits (Qiagen) kann die Plasmid-DNA entsprechend den Herstellerangaben isoliert werden.

Bei einem Ansatz im Kleinmaßstab werden mit rekombinanten Plasmiden transformierte *E. coli*-Bakterien in 3.5 ml LB_{AMP}-Medium bei 37°C über Nacht kultiviert. Diese Zellen werden durch fünf-minütige Zentrifugation bei 17 900 x g sedimentiert. Der Zelleniederschlag wird in 250 μ l RNase-haltigem P1-Puffer resuspendiert. Danach werden 250 μ l NaOH-SDS-haltiger P2-Puffer zugegeben, wodurch Phospholipide und Membranproteine gelöst und DNA sowie Proteine denaturiert werden. Zur Neutralisierung gibt man 350 μ l hochsalzhaltigen P3-Puffer zu. Durch den hohen Salzgehalt der Lösung wird Kaliumdodecylsulfat präzipitiert und die Komplexbildung mit denaturierten Proteinen, chromosomaler DNA und Zelltrümmern gefördert. Die kleinere Plasmid-DNA bleibt dabei in Lösung. Die Präzipitate werden durch eine zehn-minütige Zentrifugation bei 17 900 x g abgetrennt. Der Überstand mit der gelösten Plasmid-DNA wird auf eine Säule gegeben, wobei die Plasmid-DNA an die Silika-Membran absorbiert. Der Durchfluss wird nach kurzer Zentrifugation verworfen und die Membran mit 500 μ l PB-Puffer gewaschen, was die Restriktionsendonukleasen der *endA*⁺ Stämme entfernt. Nach erneuter Zentrifugation wird noch mal mit 750 μ l ethanolhaltigem PE-Puffer gewaschen, um die chaotropen Salze des P3-Puffers, die eine Elution unterbinden, zu entfernen. Mit 30 μ l sterilem Aqua bidest. wird die Plasmid-DNA eluiert.

Für einen Ansatz im Mittelmaßstab werden rekombinante *E. colis* in 100 ml LB_{AMP}-Medium bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend werden die Zellen bei 4 500 x g sedimentiert und der Zelleniederschlag in 4 ml RNase-haltigem P1-Puffer resuspendiert. Danach wird 4 ml P2-Puffer zugegeben. Nach fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur gibt man zur Neutralisierung 4 ml eisgekühlten hochsalzhaltigen P3-Puffer zu und inkubiert den Ansatz für 15 Minuten auf Eis. Anschließend wird der Ansatz durch einen Faltenfilter filtriert. Die Affinitätssäulen werden mit 4 ml Äquilibriumspuffer QBT, der neben MOPS und Isopropanol Triton enthält, äquilibriert. Der Durchfluss mit der gelösten Plasmid-DNA wird auf die Säule gegeben. Hat sich der Ansatz abgesetzt, werden die Säulen zweimal mit MOPS- und Isopropanol-haltigem Wasch-Puffer QC gewaschen. Die Säule wird dann auf ein

frisches 50 ml-Röhrchen übertragen, die Plasmid-DNA mit 5 ml Isopropanol-haltigem Elutionspuffer QF eluiert und gefällt. Die Plasmid-DNA wird dann in 150 µl Aqua bidest. aufgenommen.

4.3.10 TELT-Plasmid-Präparation

Bakterien einer Übernachtskultur werden durch fünf-minütige Zentrifugation bei 4 500 x g sedimentiert, der Überstand mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und das Bakterien-Pellet in 150 µl TELT-Puffer mit 15 µl Lysozym (10 mg/ml) resuspendiert. Zur Lyse wird für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und der Ansatz anschließend bei 95°C aufgeköcht. Danach wird sofort für fünf Minuten auf Eis gekühlt. Verbliebene Zelltrümmer werden durch zwanzig-minütige Zentrifugation bei 17 900 x g sedimentiert und anschließend der Überstand mit der gelösten Plasmid-DNA abgenommen. Um die Plasmid-DNA zu Fällern wird der gewonnene Überstand mit 150 µl Isopropanol versetzt und für fünf Minuten inkubiert. Danach wird für zehn Minuten bei 17 900 x g zentrifugiert, das Pellet mit 300 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen und die Zentrifugation wiederholt. Die sedimentierte Plasmid-DNA wird bei 42°C für zehn Minuten getrocknet und durch zwanzig-minütiges Schütteln in 40 µl TE/RNase resuspendiert.

4.3.11 *In-vitro*-Transkription

RNA wird mit Hilfe des mMMESSAGE mMACHINE Transkription Kit (Ambion) entsprechend den Herstellerangaben *in-vitro* in DNA transkribiert. Vor jedem Gebrauch werden der 10xReaktionspuffer und die Ribonukleotide (2xNTP/CAP) durchmischt, bis sie vollständig gelöst sind. Der RNA-Polymerase-Mix und die Ribonukleotide werden auf Eis gekühlt, der 10xReaktionspuffer bei Raumtemperatur aufgetaut. Alle Reagenzien werden vor Gebrauch in ihren Gefäßen kurz abzentrifugiert. Ein einfacher Transkriptionsansatz hat ein Gesamtvolumen von 20 µl. Als Matrize setzt man 1 µg linearisierte Plasmid-DNA ein. Hinzu kommen 10 µl der Ribonukleotide, 2 µl des 10xReaktionspuffers und 2 µl RNA-Polymerase-Mix. Der Ansatz wird zwei Stunden bei 37°C im Wärmeblock inkubiert. Anschließend gibt man 1 µl DNase I zu und mischt gut. Danach wird der Ansatz für weitere 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die synthetisierte RNA kann nun über G50-Säulen (Amersham) aufgereinigt werden.

4.3.12 RNA-Isolierung aus Embryonen bzw. Explantaten

Zur Homogenisierung der Embryonen bzw. animalen Explantate wird der Ultra-Turrax T8 (IKA Labortechnik, Staufen) verwendet. Vor jedem Gebrauch werden die Messer in einer aus RNAtidy G und sieben aufeinander folgenden Gefäßen mit DEPC-Wasser bestehenden

Waschreihe gereinigt. Zehn animale Explantate werden mit 500 µl RNAtidy G versetzt, drei oder zwölf Embryonen mit 1 ml RNAtidy G und mit dem Ultra-Turrax T8 homogenisiert. Erst wenn keine sichtbaren Gewebestücke mehr vorhanden sind, wird der Ansatz mit 100 µl Chloroform im Fall von animalen Explantaten oder 200 µl im Fall von Embryonen versetzt. Durch Schwenken werden die Lösungsmittel durchmischt. Nach zwei bis drei Minuten Inkubation bei Raumtemperatur, werden die beiden Phasen durch 15-minütige Zentrifugation bei 17 900 x g voneinander getrennt. Der klare Überstand wird weiterverwendet, er enthält die gewünschte RNA. An der Interphase zwischen der oberen RNA-haltigen RNAtidy G-Phase und der unteren Chloroform-Phase sammelt sich die genomische DNA. In der unteren Chloroform-Phase verbleiben Zelltrümmer und Proteine. Die Extraktion wird durch erneute Zugabe von Chloroform und anschließende Zentrifugation wiederholt. Erst dann wird die RNA gefällt.

Um die RNA zu fällen, gibt man zu der Lösung das doppelte Volumen absoluten Ethanol. Nach kurzem Durchmischen wird der Ansatz für mindestens eine Stunde bei – 80°C gefällt. Durch 30 Minuten Zentrifugation bei 17 900 x g wird die präzipitierte RNA sedimentiert, der Überstand wird anschließend verworfen. Der RNA-Niederschlag wird mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und für weitere 30 Minuten zentrifugiert. Auch dieser Überstand wird verworfen und der verbliebene RNA-Niederschlag bei Raumtemperatur getrocknet. Die RNA wird in einem möglichst kleinen Volumen sterilen DEPC-Wassers wieder resuspendiert. Statt mit absolutem Ethanol kann die Fällung auch mit Isopropanol erfolgen. Dabei gibt man zu der Lösung das 0.7fache Volumen an Isopropanol und wäscht mit 70% (v/v) Ethanol wie oben.

4.3.13 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Der Vergleich der Intensität der Nukleinsäure-Banden mit den Banden des DNA-Größenmarkers kann zum Abschätzen der Nukleinsäure-Menge herangezogen werden (Abb. 9).

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wird die Absorptionsmessung verwendet. Anhand des Absorptionsspektrums kann auch die Reinheit der isolierten Makromoleküle abgeschätzt werden. Das Ausmaß der Absorption wird als Extinktion (E) bezeichnet. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ist die Extinktion proportional der Schichtdicke und der Konzentration der absorbierenden Substanz. Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$. Einer Extinktion von 1 entsprechen 50 µg/ml doppelsträngige DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Zur Abschätzung der Proteinkonzentration nutzt man die Absorption der aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280 \text{ nm}$. Der Quotient E_{260}/E_{280} einer von Proteinen freien Nukleinsäureprobe sollte zwischen 1.8 und 2.0 liegen.

4.3.14 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese aus RNA wird 1 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von 10 µl eingesetzt. Zusammen mit 1 µl Random Primer (0.5 µg/µl) erhitzt man den Reaktionsansatz für zehn Minuten auf 70°C. Anschließend kühlt man den Ansatz sofort auf Eis. Dann wird der RNA-Ansatz mit 8.5 µl „Mastermix“ versetzt. Dieser besteht pro Reaktionsansatz aus 4 µl 5xPuffer, 2 µl 10 mM DTT und 1 µl 10 mM dNTPs. Zum positiven Ansatz wird neben dem „Master-Mix“ 0.5 µl (entsprechend 100 Einheiten) der M-MLV Reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, zugegeben. Ein Parallelansatz ohne Reverse Transkriptase dient als Negativkontrolle zum Ausschluss von DNA-Kontaminationen. Alle Ansätze werden für die cDNA-Synthese 50 min bei 42°C und zuletzt zum Abstoppen der Reaktion 15 Minuten bei 70°C inkubiert. Die cDNA wird bei – 20°C gelagert.

4.3.15 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, 1.25 µl dNTPs (2.5 mM), 1.5 µl MgCl₂ (25 mM), 17.5 µl steriles H₂O sowie 0.25 µl *Taq*-Polymerase (1.25 U) und 1 µl eines 1:1-Gemischs der beiden Primer (25 µM) sowie 1 µl der DNA-Matrize. Alle Reagenzien werden in ein 0.2 ml-Reaktionsgefäß auf Eis zusammengegeben.

Das Standard-Programm im Thermozykler beginnt mit einem 1-minütigen Denaturierungsschritt bei 95°C. Darauf folgen (je nach Primer-Paar) zwischen 26 und 36 Zyklen bestehend aus 30 Sekunden bei 94°C, weiteren 30 Sekunden bei 53°C bis 55°C (je nach Primer-Paar) zur spezifischen Bindung der Primer an die einzelsträngige DNA-Matrize und abschließenden 30 Sekunden bei 72°C, in denen die DNA-Neusynthese durch die *Taq*-Polymerase mittels Verknüpfung von Nukleotidbausteinen erfolgt. Zuletzt folgen 10 Minuten Inkubation bei 72°C und eine abschließende Kühlung bei 4°C beziehungsweise eine Lagerung der Ansätze bei –20°C.

4.4 Identifizierung putativer Zielgene

4.4.1 Dot Blot

Um die Zielgenkandidaten-Klone der TCF-cDNA-Banken durch Hybridisierung identifizieren zu können und eine unspezifische Reaktion mit Vektorsequenzen zu vermeiden, werden die cDNA-Fragmente selektiv exponentiell amplifiziert. Dabei dienen die isolierten Plasmide der

zu untersuchenden Zielgen-Kandidatenklone als Matrizen. Für jeden Klon werden je 2 µl einer 25µl PCR-Reaktion auf eine Nitrozellulose-Membran aufgetropft. Nach 10-minütigem Trocknen wird die anheftende DNA durch zweimaliges Bestrahlen mit 150 Joule UV-Licht mit der Nitrozellulose-Membran vernetzt, so dass die Membran in die Hybridisierungsreaktion eingesetzt werden kann.

4.4.2 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mittels PCR

Zur Herstellung radioaktiver Sonden werden die cDNA-Fragmente der TCF-Zielgen-Pools mittels PCR radioaktiv markiert. Als Primer zur Markierung des *Tcf3*- und des *Tcf4*-Zielgen-Sondenpools werden Adapterprimer aus dem „CLONTECH PCR-Select cDNA Substraction Kit“ verwendet, mit dem die beiden TCF-Subtyp-spezifischen cDNA-Banken erzeugt wurden (Kunz, Dissertation 2005). Durch Verdoppelung des Standard-„Mastermix“ erreicht der PCR-Ansatz ein Gesamtvolumen von 50 µl. Zusätzlich zum oben angegebenen dNTP-Gemisch wird 50 µCi [³²P]-α-dCTP mit einer spezifischen Aktivität von 3 000 Ci/mmol eingesetzt. Die Standard-PCR wird wie folgt angepasst: 15 Zyklen bei 65,5°C für die spezifische Primer-Bindung und 90 Sekunden für die DNA-Neusynthese.

4.4.3 Radioaktive Markierung mit dem „Random Primed DNA Labeling Kit“

Für die Identifizierung weiterer Klone, die unter den putativen Zielgen-Kandidaten für *eef1a-o1* (*EF-1 alpha o*; elongation factor 1 alpha, oocyte form) und *alpha-Tubulin* (*tubulin, alpha 1*) kodieren, werden Plasmide bereits sequenzierter Klone als Matrize zur Herstellung von radioaktiv-markierten Sonden herangezogen. Zur radioaktiven Markierung wird das „Random Primed DNA Labeling Kit“ (Boehringer Mannheim) verwendet. Je 50 ng DNA-Matrize in einem Volumen von 5 µl wird zunächst für 10 Minuten bei 96°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Die denaturierte DNA-Matrize wird den Herstellerangaben entsprechend mit 3 µl eines 1:1:1-Gemisch aus dATP, dGTP und dTTP und 50 µCi [³²P]-α-dCTP mit einer spezifischen Aktivität von 3 000 Ci/mmol sowie 2 µl eines bereitgestellten Reaktionsmix aus zufälligen Hexanukleotid-Primern versetzt. Der Ansatz wird mit Wasser auf ein Volumen von 19 µl aufgefüllt und der Reaktionsansatz nach Zugabe von 1µl des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Eine abschließende 10-minütige Inkubation bei 65°C terminiert die Reaktion. Die radioaktiv markierten Sonden können bei -20°C gelagert werden.

4.4.5 Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde

Das Prinzip der Hybridisierung beruht auf der Anlagerung der radioaktiv markierten Sonde an komplementäre DNA-Abschnitte. Dabei bindet die radioaktiv markierte DNA-Sonde die mit der Nitrozellulose-Membran vernetzten Kandidatenklone.

Zunächst wird der Dot-Blot in einer Hybridisierungsröhre in Gegenwart des Prähybridisierungspuffers für vier Stunden bei 65°C rollend inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Nitrozellulose-Membran zu blockieren. Für die eigentliche Hybridisierungsreaktion wird anschließend die denaturierte radioaktiv markierte Sonde dazugegeben und der Dot-Blot bei 65°C weiterinkubiert. Am nächsten Tag wird die gebrauchte Sonde zurückgewonnen, um sie bei Bedarf innerhalb von längstens vier Wochen wiederzuverwenden. Mit auf 65°C vorgewärmten, 0,1%SDS-haltigen SSC-Waschlösungen wird der Dot-Blot je eine Stunde bei 65°C wiederholt gewaschen. Die Nitrozellulose-Membran wird zunächst mit einer 6x- anschließend mit einer 2x- und zuletzt zweimal mit einer 0.2xSSC-Waschlösung behandelt. Der gewaschene Dot-Blot wird vorsichtig aus der Hybridisierungsröhre entnommen und mit Frischhaltefolie bedeckt. Die verpackte Nitrozellulose-Membran wird zur Belichtung gegenüber einer Filmplatte in einer Lichtundurchlässigen Filmkassette eingeschlossen und je nach Intensität der radioaktiven Sonde nach einer zehn-minütigen bis mehrstündigen Verweildauer wieder entnommen. Anschließend wird der belichtete Film im Phosphoimager eingescannt und die Intensität radioaktiver Signale digital visualisiert.

4.5 Ermittlung des mRNA/Gesamt-RNA-Verhältnisses

4.5.1 Synthese radioaktiv markierter cDNA

Zum Vergleich des Verhältnisses von Gesamt-RNA zu mRNA wird 1 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von 10 µl in einem Ansatz mit 1 µl Random Primer (0.5 µg/µl) und in einem parallelen Ansatz mit 2 µl Oligo-dT-Primer (100 µM) für die cDNA-Synthese eingesetzt. Dabei sollte der Random Primer im ersten Ansatz mit gleicher Affinität an alle RNA-Spezies binden, während der Oligo-dT-Primer im zweiten Ansatz sich bevorzugt an die Poly(A)-Überhänge der mRNAs anlagern sollte. Beide Ansätze werden für zehn Minuten auf 70°C und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Pro Reaktionsansatz wird der oben beschriebene „Mastermix“ angesetzt und zuletzt 0.5 µl (entsprechend 100 Einheiten) der M-MLV Reversen Transkriptase zugegeben. Zur Markierung versetzt man den „Mastermix“ für insgesamt je zehn Ansätze mit 50 µCi [³²P]-α-dCTP mit einer spezifischen Aktivität von 3 000 Ci/mmol. Alle Ansätze werden für die cDNA-Synthese 50 min bei 42°C und zuletzt zum Abstoppen der Reaktion 15 Minuten bei 70°C inkubiert. Anschließend werden die Ansätze abgekühlt und

kurz anzentrifugiert. Die radioaktiv markierte cDNA wird sofort für die Auftrennung in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel weiterverwendet.

4.5.2 Auftrennung der radioaktiv markierten cDNA-Fragmente mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Ähnlich wie beim SDS-PAGE erfolgt die Trennung der cDNA-Fragmente im elektrischen Feld in einem denaturierenden Puffer. In der vorliegenden Arbeit wurde für ein 3,5%iges Trenngel 1,87 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 1,6 ml 10xTBE-Puffer und 6,72 g Harnstoff eingesetzt und mit Aqua bidest. auf 16 ml aufgefüllt. Dieses Gemisch wird unter Erwärmen im Wasserbad gelöst und anschließend durch Anlegen eines Unterdrucks entgast. Die Polymerisierung wird durch Zugabe von 80 µl APS und 8 µl TEMED gestartet und das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen. Anschließend wird ein Kamm für die Ladetaschen in das noch flüssige Gel gesteckt. Die Gelelektrophorese-Kammer wird mit 1x TBE-Puffer gefüllt und für den Gel-Lauf auf 53°C erwärmt. Das ausgehärtete, zwischen den Glasplatten eingespannte Gel wird in die Gel-Elektrophorese-Kammer eingesetzt und die Nukleinsäure-Proben in die durch den Kamm ausgesparten Taschen geladen. An das beladene Gel wird eine Spannung von 200 V angelegt. Die Elektrophorese wird fortgesetzt bis die Probenpufferbande bis zum unteren Ende des Gels gelaufen ist. Nach dem Abstoppen der Elektrophorese entnimmt man das zwischen den Glasplatten eingespannte Gel der Kammer und hebt eine der Glasplatten vom Gel ab. Nach Umhüllen mit Frischhaltefolie wird das auf einer Glasplatte anhaftende Gel mit den aufgetrennten cDNA-Fragmenten im Instant-Imager analysiert. Dabei wird die von den markierten cDNA-Fragmenten ausgehende radioaktive Strahlung detektiert und digital visualisiert.

5 Ergebnisse

Zur Identifizierung TCF-Subtyp-spezifischer Zielgene standen als Ausgangsbasis zwei cDNA-Banken zur Verfügung. Diese Banken beruhen auf dem Transkriptom differentiell exprimierter Gene in neuralisierten animalen Kappen. Durch antisense-Morpholino-Oligonukleotid vermittelte Depletion von *Tcf3* wurde das Transkriptom neuralisierter Kappen mit *Tcf4*-Zielgenkandidaten angereichert. Umgekehrt waren nach Unterdrückung der *Tcf4*-Translation durch das spezifisch gegen *Tcf4* gerichtete Morpholino-Oligonukleotid *Tcf3*-Zielgenkandidaten akkumuliert (Kunz, Dissertation 2005). Eine anschließende Subtraktion sollte sowohl Haushaltsgene als auch den größten Teil der von *Tcf3* und *Tcf4* gemeinsam regulierten Zielgenkandidaten ausschließen.

5.1 Durchmustern der *Tcf3*-Zielgen- und der *Tcf4*-Zielgen-cDNA-Bank

5.1.1 Klassifizierung

Um falsch positive Kandidaten aus den cDNA-Banken auszusortieren, wurde die DNA von 518 Klonen aus der *Tcf3*-Zielgen-cDNA-Bank sowie die DNA der 244 Klone aus der *Tcf4*-Zielgen-cDNA-Bank zunächst im Dot Blot untersucht.

Die Hybridisierung mit dem radioaktiven Sondenpool für potentielle *Tcf3*-Zielgene einerseits und für potentielle *Tcf4*-Zielgene andererseits weist deutliche Intensitätsunterschiede zwischen den einzelnen Klonen auf (Abb. 10 A). So gab es Klone wie I6, die in beiden Hybridisierungsreaktionen ein starkes Signal zeigten, andere wie A3 schienen dagegen mit keinem der beiden Sondenpools zu hybridisieren. Von besonderem Interesse sind jedoch solche Klone, deren Hybridisierungsreaktion zwischen beiden Sondenpools diskriminiert. Klone wie B2 sind interessant, die ein starkes Signal nach Hybridisierung mit dem *Tcf3*-Sondenpool zeigten und mit dem *Tcf4*-Sondenpool deutlich schwächer hybridisierten. Gleiches gilt für Klone wie A6, die ein stärkeres Signal nach der Hybridisierungsreaktion mit dem *Tcf4*-Sondenpool als nach der mit dem *Tcf3*-Sondenpool aufwiesen (Abb. 10 A). Zur besseren Einordnung wurde für jeden Klon die Intensität des radioaktiven Signals gemessen und die Werte für die Hybridisierung mit den beiden cDNA-Pools als X- und Y-Werte in einem Koordinatensystem abgetragen. Ebenso wurden die Abszisse und Ordinate für die Hybridisierung der cDNA-Pools mit dem eigenen SONDENGEMISCH (X-Wert) als auch für die Reaktion mit dem reziproken Sondenpool (Y-Wert) ermittelt. Durch den so gewonnenen Koordinatenpunkt wird eine Ursprungsgerade gelegt.

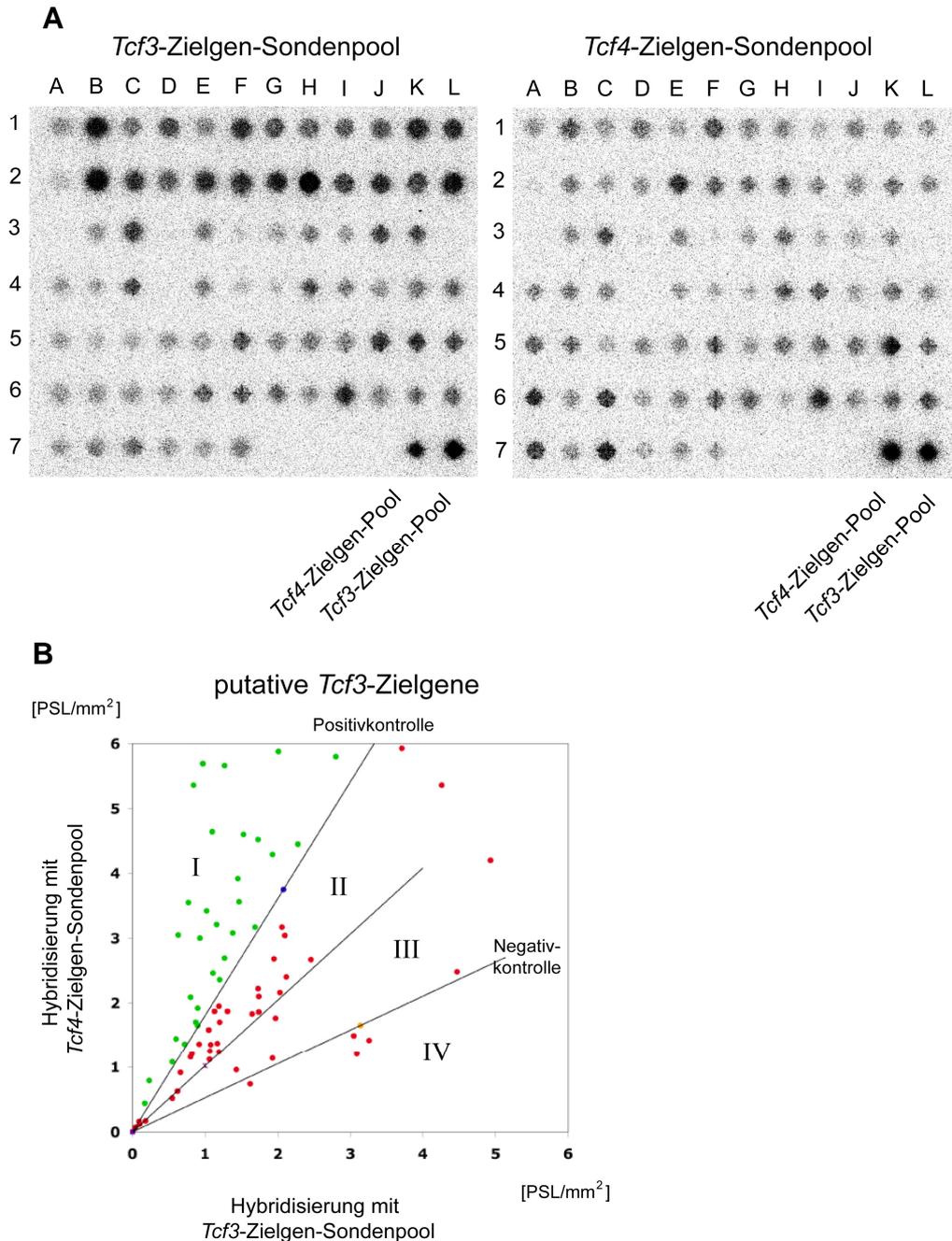


Abb. 10 Differentielle Hybridisierung der Kandidatenklone. In **A** wurde links mit dem radioaktiv-markierten *Tcf3*-Zielgen-Sondenpool hybridisiert, rechts mit dem *Tcf4*-Zielgen-Sondenpool. Zur Kontrolle wurde auch das Gemisch der cDNA-Banken (Zielgen-Pool) aufgetragen. Erwartungsgemäß hybridisiert die *Tcf3*-Zielgen-cDNA-Bank stärker mit dem *Tcf3*-Zielgen-Sondenpool als mit dem *Tcf4*-Zielgen-Sondenpool. Dieser hybridisiert stattdessen deutlicher mit der *Tcf4*-Zielgen-cDNA-Bank.

Nach Hybridisierung der auf Nitrocellulose aufgetropften Klon-DNAs mit den radioaktiv markierten Sonden wurden Filmplatten belichtet und die Schwärzung im Phosphoimager analysiert. **B** zeigt einen Ausschnitt aus der Verteilung der Klone nach Abtragen im kartesischen Koordinatensystem. Für putative *Tcf3*-Zielgene dient die Hybridisierung der beiden TCF-Zielgen-Sondenpools mit der *Tcf3*-Zielgen-cDNA-Bank als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wird entsprechend das Verhalten der *Tcf4*-Zielgen-cDNA-Bank abgetragen. Die Kategorien werden durch römische Ziffern symbolisiert. Als Einheit ist die gemessene relative Signalintensität (PSL, Processed Signal Level) pro mm^2 abgetragen.

Die Gerade für die *Tcf3*-Zielgen-cDNA-Bank einerseits und die für die *Tcf4*-Zielgen-cDNA-Bank andererseits wurden zusammen mit den Klonen eines analysierten Satzes in einem kartesischen Koordinatensystem abgetragen. Zwischen beide Ursprungsgeraden wurde eine Winkelhalbierende gelegt. Diese drei Geraden dienten zusammen mit den Koordinatenachsen zur Einordnung der Klone in vier Kategorien (Abb. 10 B). Wurden Klone aus der *Tcf3*-Zielgen-cDNA-Bank analysiert, so umfasst die erste Kategorie alle Klone, deren Koordinaten zwischen der Geraden für die *Tcf3*-Zielgen-cDNA-Bank (Positivkontrolle) und der Koordinatenachse liegen (Abb. 10 B). Die Kategorien zwei und drei sind zwischen der *Tcf3*- und der *Tcf4*-Kontroll-Geraden angeordnet. Die Winkelhalbierende trennt dabei die Klone der zweiten Kategorie, die näher an der *Tcf3*-Kontroll-Geraden zu liegen kommen, von denen der dritten Kategorie, deren Position sich näher an der *Tcf4*-Kontroll-Geraden (Negativkontrolle) befindet. Klone der vierten Kategorie liegen zwischen der Geraden für die *Tcf4*-Zielgen-cDNA-Bank und der Koordinatenachse.

Durch dieses Verfahren wurden 183 Klone aus der *Tcf4*-Zielgen-cDNA-Bank für die weitere Analyse ausgewählt, die sowohl der Kategorie I als auch der Kategorie II angehörten. Aus der *Tcf3*-Zielgen-cDNA-Bank konnten 181 Klone, die ausschließlich der Kategorie I zugeordnet sind, ermittelt werden.

5.2 Identifizierung der potentiellen Zielgene

5.2.1 Identifizierung im Southern Blot

Nach der Sequenzierung der ersten Kategorie-I-Klone stellte sich heraus, dass als putative Zielgene *alpha-Tubulin* (*tubulin, alpha 1*) und *eef1a-o1* (*EF-1 alpha o; elongation factor 1 alpha, oocyte form*) besonders häufig vertreten waren. So kodierten unter den ersten 15 *Tcf3*-Zielgen-Kandidaten vier für *alpha-Tubulin*. Bei den ersten 16 *Tcf4*-Zielgen-Kandidaten handelte es sich in elf Fällen um *eef1a-o1*. Daher wurden diese Kandidatengene unter den verbliebenen Klonen der Kategorie I beziehungsweise der Kategorien I und II im Southern Blot mit radioaktiv markierten Sonden positiv identifiziert und nicht sequenziert (Abb. 11).

Es zeigte sich, dass 112 Klone der 183 *Tcf4*-Zielgen-Kandidaten für *eef1a-o1* kodieren. Während unter den 181 *Tcf3*-Zielgen-Kandidaten 23 als *alpha-Tubulin* identifiziert werden konnten. Die verbliebenen Kandidatengene wurden sequenziert.

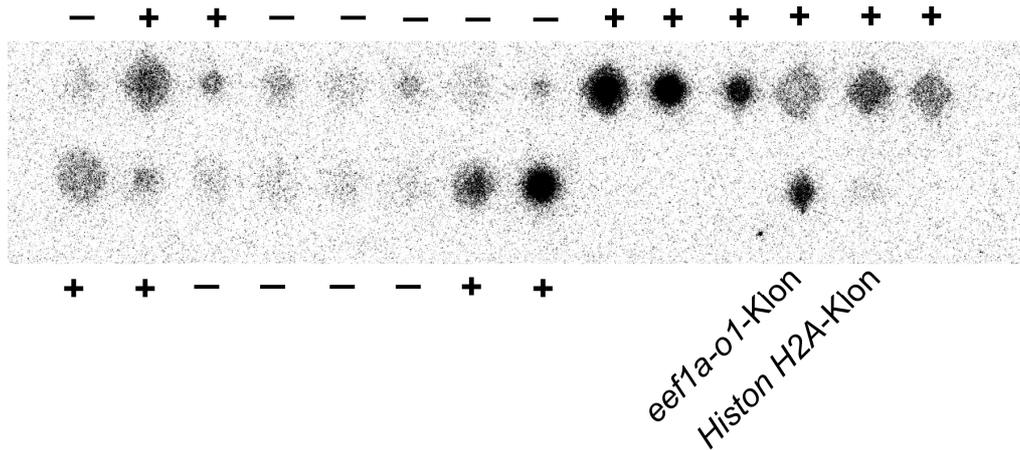


Abb. 11 Identifizierung häufiger Klone. Es wurde mit einem radioaktiv-markierten *eef1a-o1*-Klon hybridisiert. Ein bereits sequenzierter *eef1a-o1*-Klon dient als Positivkontrolle, ein für *Histon H2A* kodierender Klon als Negativkontrolle. Mit + gekennzeichnete Klone wurden als *eef1a-o1*-Klone identifiziert, mit – markierte Klone wurden sequenziert.

5.2.2 Identifizierung durch Sequenzanalyse

Für etwa 90% der ausgewählten Kandidaten-Klone konnte eine Sequenz ermittelt werden. 17 der 181 *Tcf3*-Zielgen-Kandidaten und 19 von 183 *Tcf4*-Kandidaten-Klonen blieben in der Sequenzierungsreaktion unleserlich. Die cDNA-Fragmente sind im Mittel 207 bp lang. Das kürzeste Fragment umfasst 43 bp und die längste 633 bp.

Die ermittelten cDNA-Sequenzen der potentiellen Zielgene wurden mit Hilfe des „Basic Alignment Search Tool“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; Altschul et al., 1997) mit den vorhandenen *Xenopus*-Nukleinsäure-Datenbanken abgeglichen. Konnte eine Sequenz in *Xenopus*-Datenbanken nur einem hypothetischen Protein zugeordnet werden, wurden weitere Datenbanken nach homologen Proteinen durchsucht. Auf diese Weise ließen sich auch einige dieser Klone einordnen.

5.3 Einordnung der putativen Zielgene

Die Liste der putativen *Tcf3*-Ziele (Tab. 1) wird von *alpha-Tubulin* angeführt, das in 23 Klonen identifiziert wurde. Es ist der häufigste Vertreter der für Zytoskelett-Proteine kodierenden *Tcf3*-Zielgen-Kandidaten. *Alpha-Tubulin* wurde auch in einem Screen nach Genen identifiziert, die durch *neurogenin* induziert sind. Dabei wurden als Ausgangsbasis durch *noggin*-neutralisierte animale Kappen verwendet (Deblandre et al., 1999).

Tab. 1 Auflistung der Tcf3-Zielgen-Kandidaten entsprechend ihrer Häufigkeit.

Zytosk.: Zytoskelett; AGR: Anterior Gradient; RNA-B.: RNA-Bindung; DNA-B.: DNA-Bindung; Chap.: Chaperon; Transl.: Translation; Metab.: Metabolismus; Signaltr.: Signaltransduktion; n. e.: nicht eindeutig.

Häufigkeit	Gen	Bemerkungen	Zugangsnummer	Referenz	Funktion
23	<i>alpha-Tubulin</i>	<i>tubulin, alpha 1</i>	BC106380	Smith, 1988	Zytosk.
19		<i>cytokeratin type II</i>	NM_001087056	Franz und Franke, 1986	Zytosk.
12	<i>xag2</i>	<i>Xenopus anterior gradient 2, np77</i>	NM_001088200	Sive et al., 1989	AGR
11	<i>cirp</i>	<i>cold inducible RNA-binding protein, cirbp</i>	NM_001086600	Peng et al., 2006	RNA-B.
9		mitochondriale DNA	M10217	Wong et al., 1983	n. e.
7	<i>hmg2</i>	<i>high mobility group HMG-17, hmg-17</i>	NM_001088261	Körner et al., 2003	DNA-B.
6		hypothetical protein homolog zu <i>XK81B2</i>	NM_001088963	Miyatani et al., 1986	Zytosk.
5		<i>similar to nuclease sensitive element binding protein 1</i>	NM_001085898	Tafari und Wolffe, 1990	RNA-B.
5	<i>xeel</i>	<i>embryonic epidermal lectin</i>	NM_001089101	Nagata et al., 2003	n. e.
4	<i>xag</i>	hypothetical protein homolog zu <i>np77</i>	NM_001086198	Sive et al., 1989	AGR
4	<i>krt18</i>	<i>keratin 18</i>	NM_001087341	LaFlamme et al., 1988	Zytosk.
3		<i>cytoplasmic beta actin</i>	AF079161		Zytosk.
3	<i>hsc70</i>	<i>heat shock cognate protein 70</i>	NM_001086599	Lang et al., 2000	Chap.
3	<i>rps27</i>	<i>ribosomal protein S27</i>	NM_001087225	Klein et al., 2002	Transl.
3		<i>similar to anterior gradient 2 homolog</i>	NM_001086251	Klein et al., 2002	AGR
2		<i>similar alpha Tubulin</i>	NM_001086054	Klein et al., 2002	Zytosk.
2	<i>gfpt1</i>	<i>glutamine fructose-6-phosphate transaminase 1</i>	NM_001087014	Klein et al., 2002	Metab.
2	<i>hmg1</i>	<i>high-mobility group nucleosome binding domain 1</i>	NM_001087294	Körner et al., 2003	DNA-B.
2	<i>rps2e</i>	<i>ribosomal protein S2e</i>	NM_001087413	Gawantka et al., 1998	Transl.
2	<i>sfrs2</i>	<i>splicing factor, arginine/serine-rich 2</i>	NM_001087274	Klein et al., 2002	RNA-B.
2		<i>beta-Tubulin</i>	NM_001087097	Bieker und Yazdani-Buicky, 1992	Zytosk.
2	<i>cgs</i>	<i>cement gland specific protein</i>	BC128956	Novoselov et al., 2003	AGR
2	<i>eef1a-s</i>	<i>eukaryotic elongation factor 1 alpha, somatic form</i>	NM_001087442	Krieg et al., 1989	Transl.
2		hypothetical protein homolog zu <i>X. tropicalis ribosomal protein S4</i>	NM_001097003	Takezaki et al., 2004	Transl.
1	<i>cirp2</i>	<i>cold-inducible RNA binding protein 2, xcirp2</i>	NM_001086325	Matsumoto et al., 2000	RNA-B.
1	<i>hmg3</i>	<i>high mobility group box 3b, hmg3b</i>	NM_001095694	Terada et al., 2006	DNA-B.
1	<i>xk70</i>	<i>xk70</i>	NM_001087819	Winkles et al., 1985	Zytosk.
1		hypothetical protein homolog zu <i>Danio 40S ribosomal protein S30</i>	NM_001096142	Klein et al., 2002	n. e.
1	<i>ywhaq</i>	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide</i>	NM_001086903	Klein et al., 2002	Signaltr.

Seine Expression im epidermalen Ektoderm schließt es aber für die Untersuchung hinsichtlich einer differentiellen TCF-Regulation in zukünftigem Neuralgewebe aus.

Mit 19 Klonen steht das Keratin NM_001087056 als weiteres Zytoskelett-Protein an zweiter Stelle. An Keratinen waren daneben NM_001088963 sechsmal, *krt18* viermal und *xk70* einmal vertreten. AF079161, das für zytoplasmatisches beta-Actin kodiert, sowie NM001086054 (similar alpha-Tubulin) und NM_001087097, das für beta-Tubulin steht, vervollständigen die Gruppe der identifizierten Zytoskelett-Gene unter den häufigsten putativen *Tcf3*-Zielen.

Eine weitere bedeutende Gruppe unter den möglichen *Tcf3*-Zielgenen stellen Klone, die für Proteine aus der AGR (Anterior Gradient)-Familie kodieren. Dabei ist *xag2* mit zwölf kodierenden Klonen der häufigste Vertreter, gefolgt von *xag* (vier Klone), dreimal NM_001086251 und zweimal *cgs*. Diese Transkripte markieren im *Xenopus*-Embryo die Zementdrüse, das ein das anteriore Körperende kennzeichnendes, Sekret-sezernierendes Organ zur Anheftung ist.

Unter den *Tcf3*-Zielgenkandidaten fällt außerdem *cirp* (*cold inducible RNA-binding protein*) besonders auf. Es steht nach den Zytoskelett-Kandidaten und den anterioren Markern mit elf Klonen an dritter Stelle und kodiert für ein RNA-bindendes Protein mit einer RRM (RNA recognition motif)-Domäne. Interessanterweise ist auch das zweite Familienmitglied, *cirp2*, einmal vorhanden. Neben den beiden CIRPs gibt es weitere RNA-bindende *Tcf3*-Zielgen-Kandidaten wie das fünfmal vertretene NM_001085898, das eine CSP (Cold-shock-Protein)-Domäne aufweist. Daneben gibt es zwei für *sfrs2* kodierende Klone. Auch *sfrs2* kann mit seiner RRM-Domäne RNA binden.

Beachtenswert ist auch eine Gruppe von kanonischen HMG (High mobility group)-Proteinen. Dabei ist *hmg2* mit sieben Klonen das häufigste, gefolgt von *hmg1* (zwei Klone) und einmal *hmg3*. Bei den HMG-Proteinen handelt es sich einerseits um zwei Vertreter aus der Familie der NBD (**N**ucleosome **B**inding **D**omain)-Proteine (*hgm2* und *hgm1*) (Bustin, 2001). Andererseits gehört *hmg3* zu den HMG-Box-Proteinen, zu denen interessanterweise auch *Tcf3* und *Tcf4* zählen.

Das fünffach ermittelte *Xeel* kennzeichnet im *Xenopus*-Embryo epidermales Gewebe (Nagata et al., 2003). Interessanterweise werden *xeel* und *alpha-Tubulin* im nicht-neuralen Ektoderm exprimiert. Sowohl die Neuralplatte als auch die Zementdrüse bleiben von *alpha-Tubulin* und *xeel* frei. Stattdessen bilden sie in der Epidermis ein sich gegenseitig ausschließendes Muster. Denn *alpha-Tubulin* wird in Cilien-tragenden Zellen exprimiert (Deblandre et al., 1999) und *xeel* in epidermalen Zellen ohne Cilien (Nagata et al., 2003).

Mit *hsc70* (*heat shock cognate protein 70*), das für ein Hsp70 (Heat shock protein 70)-Protein kodiert, wurde dreimal ein Chaperon als mögliches *Tcf3*-Zielgen identifiziert. Neben *hsc70* bleibt für die Chaperone mit NM_001086217 nur ein weiterer Klon übrig.

Des Weiteren finden sich unter den Kandidaten Klone, die für ribosomale Proteine kodieren. Dazu gehören neben *rps27* (drei Klone) mit je zwei kodierenden Klonen NM_001097003 und *rps2e*. Von diesen soll nur *rps2e* näher analysiert werden, da es Homologien aufweist zu dem entwicklungs-biologisch relevanten *Drosophila*-Protein „String of Pearls“ (Cramton und Laski, 1994). Das einmal identifizierte NM_001096142 ist zwar zum ribosomalen S30-Protein in Zebrafisch homolog, zeichnet sich aber daneben durch eine Ubiquitin-ähnliche-(FUBI)-Domäne aus.

Neben den ribosomalen Kandidaten findet sich zweimal das aus der EF(*elongation factor*)1-alpha-Familie stammende *eef1a-s*, dem eine Funktion beim Ablauf der Translation zugeordnet werden kann.

Ein weiterer zweifach vertretener *Tcf3*-Zielgenkandidat ist *gfpt1* (synonym *gfat*), das einen interessanten Hexosemonophosphat-Weg einleitet. Durch die Glutamin/Fruktose-6-Phosphat Amidotransferase (GFAT) wird Glukosamin-6-Phosphat bereitgestellt, das nach einem Uridintriphosphat-Transfer als UDP-*N*-Acetylglucosamin-6-Phosphat für die Glykosilierung und damit für die posttranslationale Modifikation von Proteinen verwendet werden kann (Wells et al., 2003).

Unter den nur einfach nachgewiesenen *Tcf3*-Zielgenkandidaten ist zuletzt noch *ywhaq* aufgeführt, das für ein 14-3-3-Protein kodiert und bei der Signaltransduktion eine Rolle spielen könnte.

Die vollständige Liste aller sequenzierten *Tcf3*-Zielgen-Kandidaten-Klone sowie die aller *Tcf4*-Zielgen-Kandidaten-Klone befindet sich im Anhang.

Unter den häufigsten *Tcf4*-Zielgen-Kandidaten werden zusätzlich zu den Klonen, die mehrfach identifiziert wurden, sechs nur einzeln vertretene Klone näher betrachtet (Tab. 2). Die *Tcf4*-Zielgen-Kandidaten werden von den 112 Klonen beherrscht, die für *eef1a-o1* kodieren. Als Haushaltsgen ist *eef1a-o1* für eine differentielle Funktionsstudie eher ungeeignet, daher wird es als putatives *Tcf4*-Ziel nicht weiter untersucht.

Daneben spielen wahrscheinlich NM_001096138 (drei Klone) und NM_001093433 (zwei Klone) als ribosomale Proteine bei der Translation eine Rolle. Da in beiden TCF-Zielgen-Gruppen eine vergleichbare Anzahl an ribosomalen Proteinen ermittelt wurde, scheint deren Analyse auch vernachlässigbar. Folglich werden unter den putativen *Tcf4*-Zielen die Translations-Kandidaten nicht näher untersucht.

An zweiter Stelle steht mit dem fünffach ermittelten *xk70* ein Keratin, das beide Kandidatenlisten gemeinsam haben. Innerhalb der *Tcf3*-Kandidaten gibt es unter den 31-Keratin-Klonen nur einen der für *xk70* kodiert. Unter den möglichen *Tcf4*-Zielen ist es aber nicht nur das einzige Keratin, sondern auch der einzige Vertreter für Zytoskelett-Komponenten.

Psmc3 (proteasome (prosome, macropain) 26 S subunit, ATPase 3), das dem Proteasom zugeordnet wird, ist mit drei Klonen ein ausschließlicher *Tcf4*-Zielgen-Kandidat. Es könnte nicht nur beim Protein-Umsatz, sondern auch bei posttranslationalen Modifikationen und bei der Regulation der Zellproliferation eine Rolle spielen (Pollice et al., 2004).

Die bereits als *Tcf3*-Zielgen-Kandidaten identifizierten HMG-Proteine *hmg2*, *hmg1* und *hmg3* findet man mit zwei Klonen beziehungsweise je einem kodierenden Klon als putative *Tcf4*-Ziele wieder. Für eine korrekte Einordnung als TCF-Subtyp-spezifische Zielgene müssen sie eingehender analysiert werden. Ein den *Tcf4*-Zielgen-Kandidaten eigenes Gen ist dagegen das einmal identifizierte *hmg-x*, das wie *hmg3* zu den HMG-Box-Proteinen gehört.

Tab. 2 Auflistung der *Tcf4*-Zielgen-Kandidaten entsprechend ihrer Häufigkeit

Transl.: Translation; Zytosk.: Zytoskelett; Proteas.: Proteasom; DNA-B.: DNA-Bindung; ER: Endoplasmatisches Reticulum; Ionenk.: Ionenkanal; DNA-Sy.: DNA-Synthese; Signaltr.: Signaltransduktion; Zellzyk.: Zellzyklus; RNA-B.: RNA-Bindung; n. e.: nicht eindeutig.

Häufigkeit	Gen	Bemerkungen	Zugangsnummer	Referenz	Funktion
112	<i>eef1a-o1</i>	<i>elongation factor 1 alpha, oocyte form</i>	NM_001086133	Dje et al., 1990	Transl.
5	<i>xk70</i>	<i>xk70</i>	NM_001087819	Winkles et al., 1985	Zytosk.
3	<i>psmc3</i>	<i>proteasome (prosome, macropain) 26 S subunit, ATPase 3</i>	NM_001086780	Nacken, 1997	Proteas.
3		hypothetical protein homolog zu <i>X. tropicalis ribosomal poein L35</i>	NM_001096138	Klein et al., 2002	Transl.
2	<i>hmg2</i>	<i>high mobility group HMG-17, hmg-17</i>	NM_001088261	Körner et al., 2003	DNA-B.
2		<i>chloride channel; clc-5</i> (48% von 104 bp übereinstimmend)	Y09940		Ionenk.
2		mitochondriale DNA	M10217	Wong et al., 1983	n. e.
2		hypothetical portein homolog zu <i>X. tropicalis ribosomal protein S23</i>	NM_001093433	Klein et al., 2002	Transl.
2	<i>rrm1</i>	<i>similar to ribonucleotide reductase M1</i>	NM_001090843	Klein et al., 2002	DNA-Sy.
2		hypothetical protein homolog zu muriner <i>serine/threonine kinase 24</i>	NM_001092259	Klein et al., 2002	Signaltr.
1	<i>hmg1</i>	<i>high-mobility group nucleosome binding domain 1</i>	NM_001087294	Körner et al., 2003	DNA-B.
1	<i>hmg3</i>	<i>high mobility group box 3</i>	NM_001087116	Terada et al., 2006	DNA-B.
1	<i>hmg-x</i>	<i>similar to high mobility group box 2; hmg-x</i>	NM_001085918	Kinoshita et al., 1994	DNA-B.
1	<i>simBtg1</i>	<i>similar to B-cell translocation gene 1</i>	NM_001085911	Gawantka et al., 1998	Zellzyk.
1		MGC84169 protein homolog zu <i>R. norvegicus PREDICTED: similar to THO complex subunit 4 (Tho 4) (RNA and export factor binding protein 1) (REF1-I) (Ally of AML-1 and LEF-1) (Aly/REF) isoform 2</i>	NM_001092746	Bruhn et al., 1997	RNA-B.
1		hypothetical protein homolog zu <i>similar to signal sequence receptor, alpha</i>	NM_001086452	Ou et al., 1992	ER

Mit zwei für *rrm1* kodierenden Klonen ist unter den putativen *Tcf4*-Zielen ein Protein mit einer RNR (Ribonucleotide Reductase)-Domäne vertreten, das für die DNA-Synthese wichtig ist.

Auch NM_001092259 (zwei Klone) gehört zu den alleinigen *Tcf4*-Zielgen-Kandidaten. Das hypothetische Protein weist Homologien zu einer murinen Serin/Threonin-Kinase auf und könnte daher für die Signaltransduktion Bedeutung haben.

Unter den nur einzeln vertretenen Klonen wurde *simBtg1* (similar to B-Cell Translocation Gene 1) für eine weitere Analyse ausgewählt, denn es ist möglicherweise an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt (Hata et al., 2007).

Die RNA-bindenden Proteine sind unter den *Tcf4*-Zielgen-Kandidaten nur durch einzelne Klone belegt, von denen NM_001092746 beispielhaft weiter untersucht wird. Durch seine Homologie zum humanen *ALY*, einem Kontext-abhängigen Lef-1-Koaktivator, könnte man es mit den LEF/TCFs in Verbindung bringen (Bruhn et al., 1997).

Als letzter nur einfach identifizierter *Tcf4*-Zielgen-Kandidat wurde NM_001086452 für eine weitere Betrachtung ausgesucht. NM_001086452 kodiert für ein hypothetisches Protein, das zum Signal-Sequenz-Rezeptor alpha homolog ist. Es handelt sich dabei um ein TRAP (Translocon-assoziiertes)-Protein in der Membran des endoplasmatischen Reticulums (Wada et al., 1991). NM_001086452 wird weiter betrachtet, weil es gemeinsam mit Calnexin die Glykosilierung von Proteinen steuern könnte (Ou et al., 1992).

5.4 Verifizierung der Kandidatengene

In einem mehrstufigen Verfahren wurde versucht, ausgewählte Kandidatengene als TCF-Subtyp-spezifische Ziele zu verifizieren und sie bezüglich ihrer Regulation durch Tcf3 und Tcf4 einzuordnen.

Dieses mehrstufige Verfahren umfasst eine Analyse der Expressionsstärke der Kandidatengene mittels RT-PCR nach Überexpression beziehungsweise Ausschalten von Tcf3 und Tcf4 zum einen im Gesamtembryo, zum anderen in neuralisierten animalen Kappen. Des Weiteren werden die Expressionsmuster der Kandidatengene mit Hilfe der Ganzkeimfärbung auf eine zeitliche und räumliche Überlappung mit *Tcf3* und *Tcf4* untersucht. Der nächste Schritt ist die Visualisierung der mRNA-Verteilung der Kandidatengene nach TCF-Funktionsgewinn und TCF-Funktionsverlust.

5.4.1 Verifizierung der Kandidatengene in Neurula-Embryonen

Überexpression von *Tcf3* und *Tcf4*

Um Aussagen über die Regulation der identifizierten putativen Zielgene *in-vivo* treffen zu können, soll die Expression der Kandidaten als Reaktion auf den Funktionsgewinn individueller TCFs in Neurula-Embryonen analysiert werden.

Gene, die durch *Tcf3* aktiviert oder durch eine der *Tcf4*-Varianten reprimiert werden, entsprechen den Erwartungen an ein authentisches *Tcf3*-Zielgen.

Von den elf ausgewählten *Tcf3*-Zielgen-Kandidaten wurden neun nach Überexpression von Tcf3 hochreguliert (Abb. 12). Dazu gehören die RNA-bindenden Proteine *cirp* und *sfrs2* sowie die Zementdrüsen-Marker *xag2* und *xag*, die HMGNs, NM_001096142 und *rps2e*. Sie entsprechen also grundsätzlich den Erwartungen an ein *Tcf3*-Zielgen. Die Expression von *cirp2* und *gfpt1* konnte dagegen nicht durch Tcf3-Überexpression aktiviert werden. Sie gelten daher in diesem Ansatz als nicht verifiziert.

Keiner der untersuchten *Tcf3*-Zielgen-Kandidaten wurde ausschließlich durch Tcf3 angesteuert. Selbst *xag2* und *cirp*, die im Screen in mehr als zehn Klonen als putative *Tcf3*-Ziele identifiziert wurden, wurden sowohl durch Tcf3 als auch durch Tcf4 aktiviert. Die *Tcf3*-Zielgen-Kandidaten *rps2e*, *gfpt1* und *ywhaq* konnten in Neurula-Embryonen sogar durch die Überexpression beider *Tcf4*-Varianten deutlicher aktiviert werden als durch *Tcf3*-Überexpression. Interessanterweise wurden *xag*, *hmg2* und *hmg1* am stärksten durch Tcf4C hochreguliert.

Ergebnisse

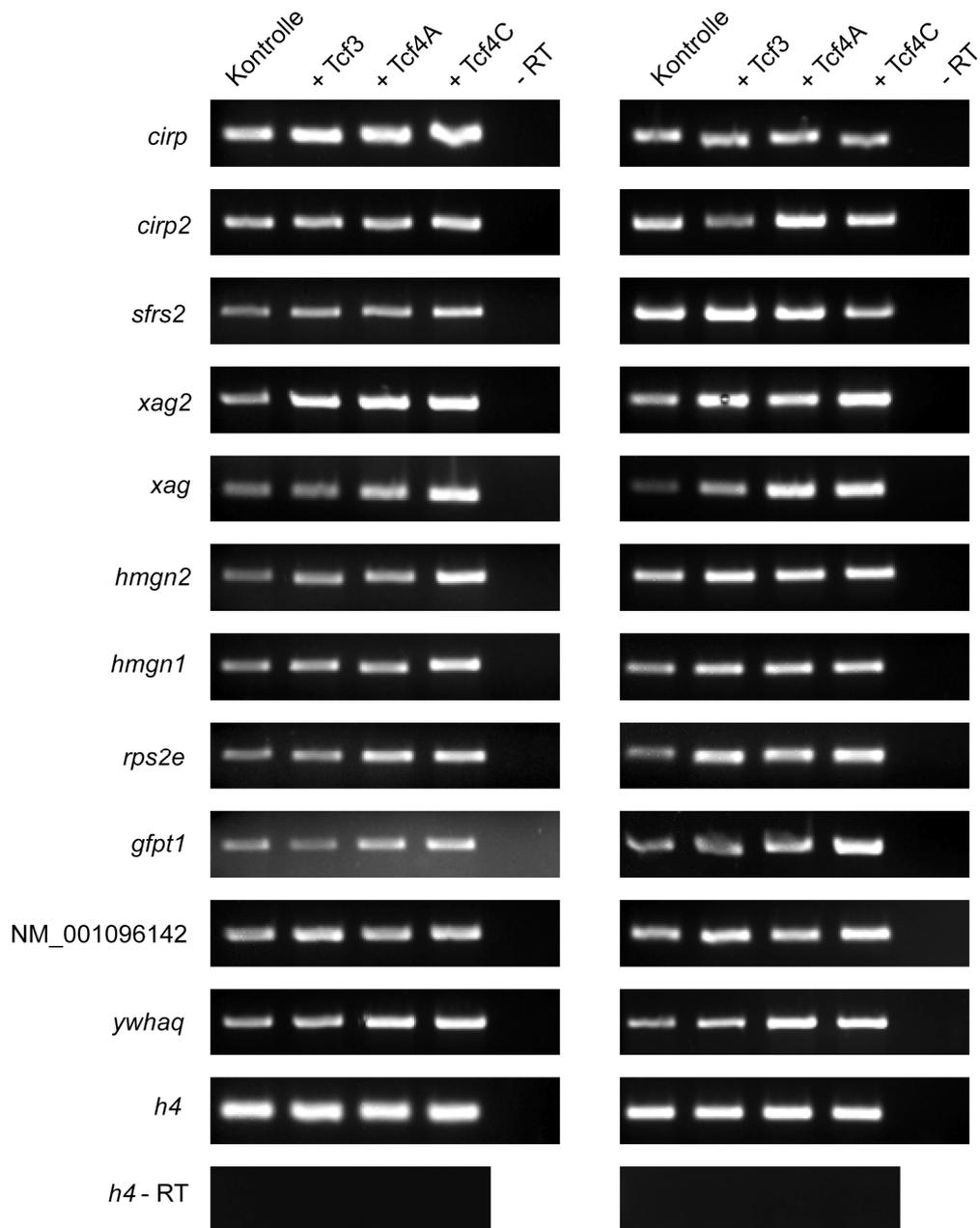


Abb. 12 Regulation der *Tcf3*-Zielgenkandidaten in Embryonen im Neurula-Stadium nach Überexpression von *Tcf3* bzw. *Tcf4A* oder *Tcf4C*. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente.

Je 500 pg TCF-mRNA wurde im Zwei-Zellstadium in die animale Hemisphäre beider Blastomere injiziert. Als Kontrolle dienen Embryonen, die nicht injiziert wurden.

Gesamt-RNA aus je drei Embryonen im Neurula-Stadium (Stadium 18) wurde revers transkribiert und die angegebenen Gene amplifiziert.

Das Haushaltsgen Histon 4 (*h4*) dient der Ladekontrolle.

- RT zeigt die Amplifikation einer Kontrollprobe ohne reverse Transkriptase.

Von den sieben ausgewählten *Tcf4*-Zielgen-Kandidaten wurde die Expression von *xk70*, die des ALY-Homologen NM_001092746, die der HMG-Proteine *hmg-x* und *hmgb3* sowie die des Translocon-assoziierten Proteins NM_001086452 nach Überexpression von *Tcf4* auf der Ebene der Transkripte aktiviert (Abb. 13). Das bestätigt die fünf Kandidaten in diesem System als *Tcf4*-Zielgene. Während NM_001092746, *hmg-x* und *hmgb3* durch *Tcf4A* deutlicher als durch *Tcf4C* aktiviert werden, reagieren *xk70* und NM_001086452 auf beide *Tcf4*-Varianten vergleichbar stark. Darüber hinaus könnte besonders *hmgb3* durch *Tcf3* reprimiert sein. Für *psmc3* und *simBtg1* dagegen ist eine Verifizierung als *Tcf4*-Zielgen schwierig, da sich in unterschiedlichen Experimenten kein einheitliches Bild heraus kristallisierte. So war *psmc3* in einer Versuchsreihe nach TCF-Überexpression reprimiert, in einer zweiten Versuchsreihe aber aktiviert.

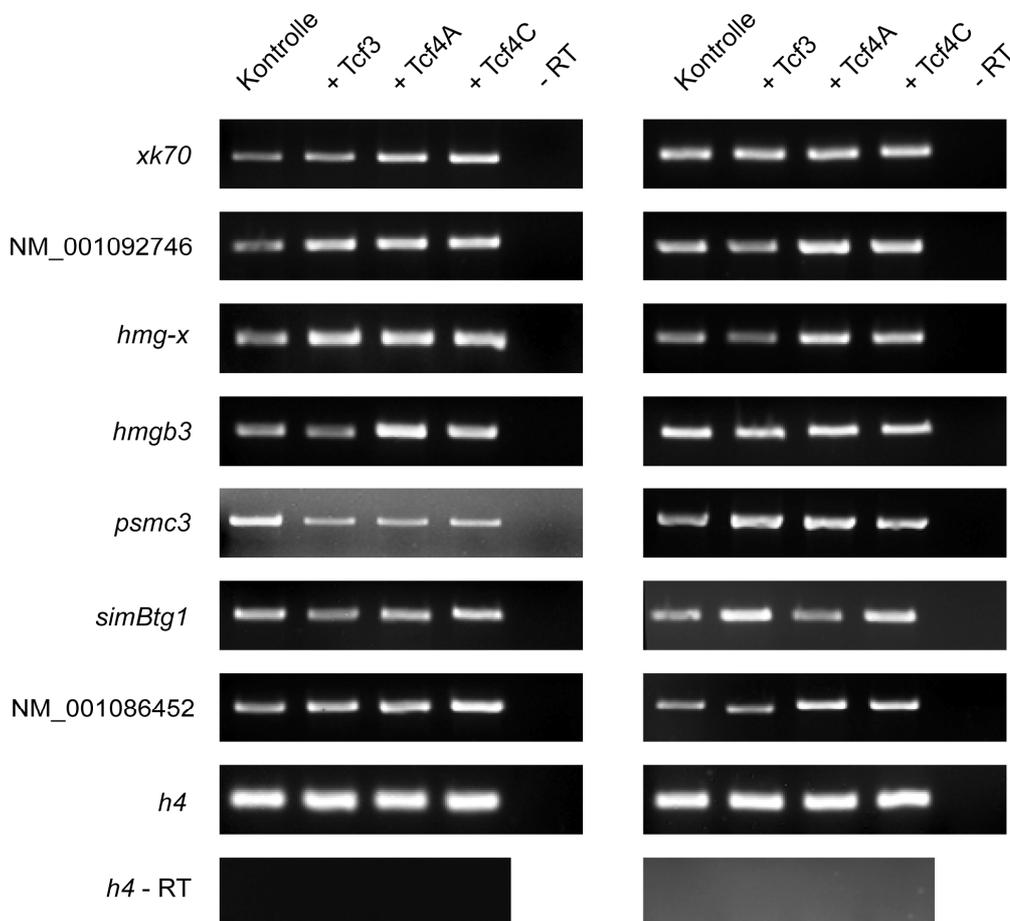


Abb. 13 Regulation der *Tcf4*-Zielgenkandidaten in Embryonen im Neurula-Stadium nach Überexpression von *Tcf3* bzw. *Tcf4A* oder *Tcf4C*. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente.

Je 500 pg TCF-mRNA wurde im Zwei-Zellstadium in die animale Hemisphäre beider Blastomere injiziert. Als Kontrolle dienen Embryonen, die nicht injiziert wurden.

Gesamt-RNA aus je drei Embryonen im Neurula-Stadium (Stadium 18) wurde revers transkribiert und die angegebenen Gene amplifiziert.

Das Haushaltsgen Histon 4 (*h4*) dient der Ladekontrolle.

- RT zeigt die Amplifikation einer Kontrollprobe ohne reverse Transkriptase.

5.4.2 Verifizierung in neuralisierten animalen Kappen

5.4.2.1 Überexpression von *Tcf3* und *Tcf4*

Die Genregulation im Gesamtembryo findet vor dem Hintergrund eines komplexen Zusammenspiels morphogenetischer Abläufe und induktiver Ereignisse statt. Neuralisierte animale Kappen bieten demgegenüber den Vorteil, an separiertem Neuralgewebe arbeiten zu können. Bei den neuralisierten animalen Kappen wird durch Überexpression eines trunkierten BMP-Rezeptors (tBR) der BMP-Signalweg blockiert. Während die Perzeption von BMP-Signalen die Population der animalen Kappenzellen zu einem epidermalen Schicksal treibt, erlauben abnehmende BMP-Signale die Differenzierung zu einem zunehmend neuralen Schicksal (Abb. 14).

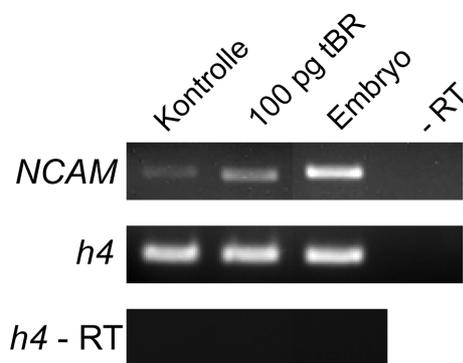


Abb. 14 Das System neuralisierter animaler Kappen.

100 pg tBR (trunkierter **BMP-Rezeptor**)-mRNA wurden im Zwei-Zellstadium am animalen Pol beider Blastomere injiziert. Animale Kappen aus Blastula-Embryonen wurden kultiviert bis die Geschwisterembryonen (Embryo) die Neurula erreicht hatten. Die Gesamt-RNA aus 10 animalen Kappen bzw. einem Embryo wurde revers transkribiert und die angegebenen Gene amplifiziert.

Die Expression des neuralen Markergens *NCAM* (neural cell adhesion molecule) ist nach der Blockierung des BMP-Wegs durch die Gabe eines dominant-negativen BMP-Rezeptors (tBR) im Vergleich zur uninjizierten animalen Kappe (Kontrolle) induziert. Das Haushaltsgen Histon 4 (*h4*) dient der Ladekontrolle. - RT zeigt die Amplifikation einer Kontrollprobe ohne reverse Transkriptase.

Unter den analysierten *Tcf3*-Zielgenkandidaten zeigten nur wenige eine differentielle TCF-Regulation in neuralisierten animalen Kappen (Abb. 15). *Cirp* und NM_001096142 scheinen insofern den Erwartungen an ein *Tcf3*-Ziel zu entsprechen, als sie sich durch *Tcf3* aktiviert werden konnten. Dagegen ist die Expressionsstärke von *cirp2*, *hmgn2* und *hmgn1* eher unverändert. Während die übrigen untersuchten *Tcf3*-Zielgenkandidaten *sfrs2*, *xag2*, *rps2e*, *gfpt1* und *ywhaq* durch *Tcf3*-Überexpression sogar reprimiert werden. Allerdings wird die Expression von *sfrs2*, *xag2* und *gfpt1* auch nach einer Überexpression von *Tcf4* unterdrückt. Folglich konnten in diesem Ansatz nur *cirp* und NM_001096142 verifiziert werden.

Ergebnisse

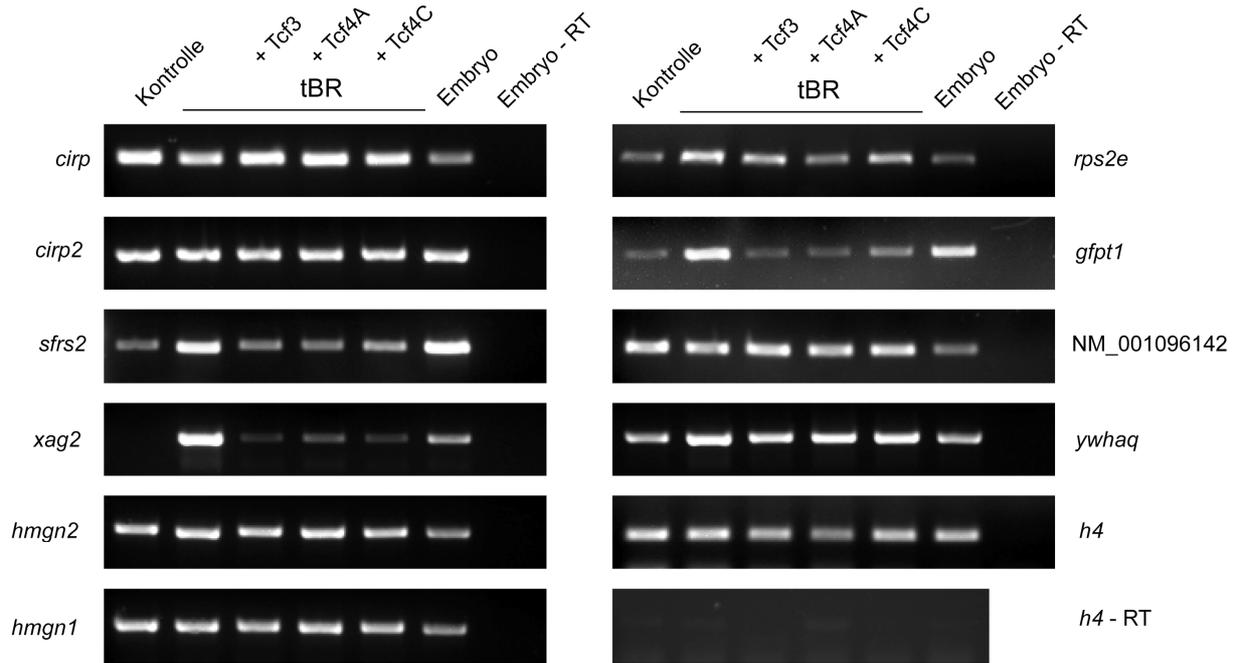


Abb. 15 Regulation der *Tcf3*-Zielgenkandidaten in neuralisierten animalen Kappen nach Überexpression von *Tcf3* bzw. *Tcf4A* oder *Tcf4C*.

100 pg tBR (trunkierter BMP-Rezeptor)-mRNA alleine und zusammen mit je 500 pg TCF-mRNA wurden im Zwei-Zellstadium am animalen Pol beider Blastomere injiziert. Animale Kappen aus Blastula-Embryonen wurden kultiviert bis die Geschwisterembryonen (Embryo) die Neurula erreicht hatten. Die Gesamt-RNA aus 10 animalen Kappen bzw. einem Embryo wurde revers transkribiert und die angegebenen Gene amplifiziert. Als Kontrolle dienen animale Kappen, die aus unbehandelten Embryonen explantiert wurden.

Das Haushaltsgen Histon 4 (*h4*) dient der Ladekontrolle.

- RT zeigt die Amplifikation einer Kontrollprobe ohne reverse Transkriptase.

Unter den möglichen *Tcf4*-Zielen zeigen *xk70*, NM_001092746 und *hmg-x* eine Regulation, die den Anforderungen an ein *Tcf4*-Zielgen entspricht.

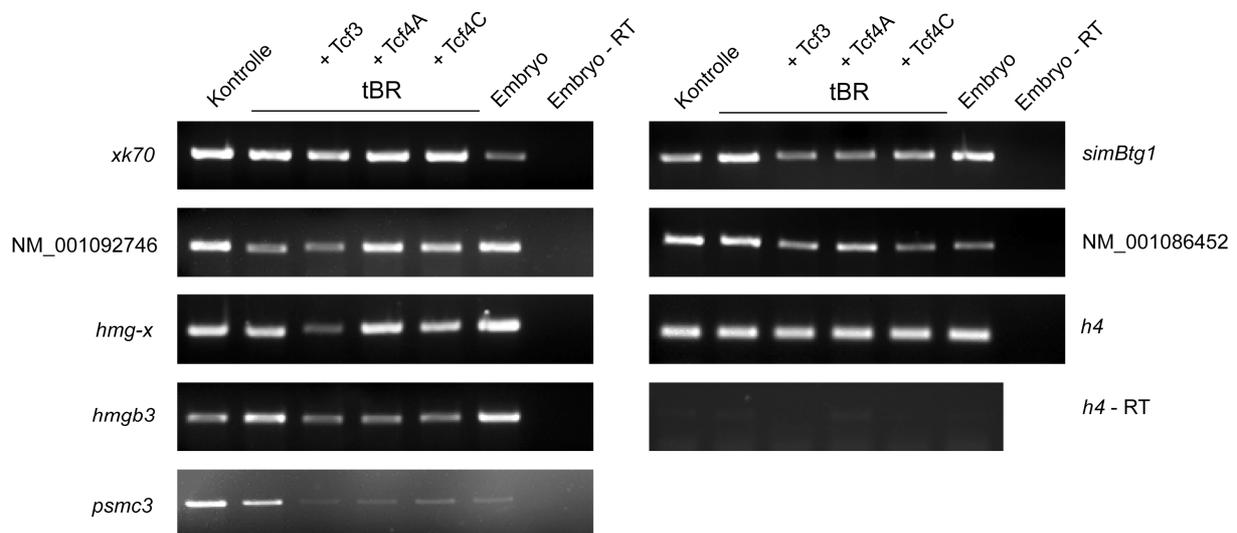


Abb. 16 Regulation der *Tcf4*-Zielgenkandidaten in neuralisierten animalen Kappen nach Überexpression von *Tcf3* bzw. *Tcf4A* oder *Tcf4C*. Vorgehensweise wie in Abb. 15.

Sie scheinen durch *Tcf3* reprimiert und durch die beiden *Tcf4*-Varianten aktiviert zu sein (Abb. 16). *Hmgb3*, *psmc3* und *simBtg1* verhalten sich dagegen vergleichbar wie die *Tcf3*-Ziele *sfrs2*, *xag2* und *gfpt1*. Sie werden durch die Überexpression aller TCFs herunter reguliert.

NM_00108452 wird zwar auch durch alle TCFs reprimiert, dabei ist allerdings *Tcf4A* der schwächste Repressor.

5.4.2.1 Unterdrückung der *Tcf3*- beziehungsweise *Tcf4*-Translation

Überexpressionsstudien erlauben ausschließlich die Aussage, dass potentielle Kandidatengene durch den entsprechenden Transkriptionsfaktor reguliert werden können. Erst die Analyse eines Gewebes dem der entsprechende Transkriptionsfaktor fehlt, macht ein Urteil darüber möglich, ob eine potentielle Regulation auch tatsächlich stattfindet.

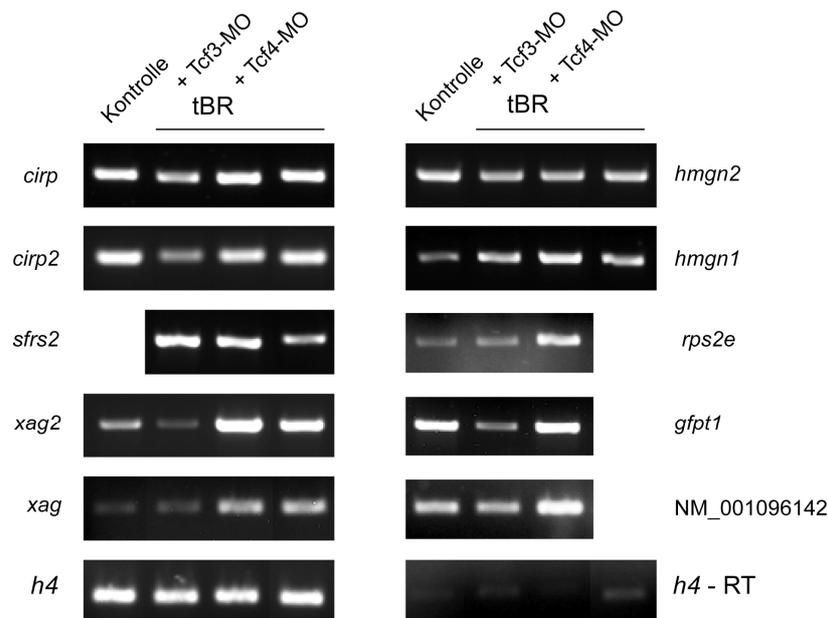


Abb. 17 Überprüfung häufiger *Tcf3*-Zielgenkandidaten in neuralisierten animalen Kappen nach Herunterregulieren von *Tcf3* bzw. *Tcf4*.

100 pg tBR (trunkierter BMP-Rezeptor)-mRNA alleine und zusammen mit je 8 pmol TCF-antisense-Morpholino-Oligonukelotid (MO) wurden im Zwei-Zellstadium am animalen Pol beider Blastomere injiziert. Animale Kappen aus Blastula-Embryonen wurden kultiviert bis die Geschwisterembryonen (Embryo) die Neurula erreicht hatten. Die Gesamt-RNA aus 10 animalen Kappen bzw. einem Embryo wurde revers transkribiert und die angegebenen Gene amplifiziert.

Als Kontrolle dienen animale Kappen, die aus unbehandelten Embryonen explantiert wurden.

Das Haushaltsgen Histon 4 (*h4*) dient der Ladekontrolle.

- RT zeigt die Amplifikation einer Kontrollprobe ohne reverse Transkriptase.

Für ein *Tcf3*-Zielgen wird erwartet, dass es von der Aktivierung durch *Tcf3* nicht aber durch *Tcf4* abhängt. Folglich sollte ein authentisches *Tcf3*-Zielgen nach einer Morpholino-vermittelten *Tcf3*-Reduktion schwächer exprimiert werden als nach Depletion von *Tcf4*. Dies trifft für alle betrachteten *Tcf3*-Kandidaten außer *sfrs2*, *hmg2* und *hmg1* zu (Abb. 17). Bei *cirp* und *xag2* kann man zusätzlich nach *Tcf4*-Unterdrückung eine verstärkte Expression im Vergleich zum neuralisierten Grundzustand (tBR alleine) feststellen. Daraus lässt sich schließen, dass *cirp* und *xag2* nicht nur von *Tcf3* aktiviert, sondern auch von *Tcf4* reprimiert werden. Dies stärkt ihre Bedeutung als differentiell regulierte TCF-Ziele im System neuralisierter animaler Kappen und erklärt die große Häufigkeit, mit der sie als *Tcf3*-Zielgen-Kandidaten ermittelt wurden. Da *hmg1* nach *Tcf4*-Depletion induziert, durch das *Tcf3*-Morpholino aber unbeeinflusst ist, scheint es eher durch *Tcf4* reprimiert zu werden als durch *Tcf3* aktiviert.

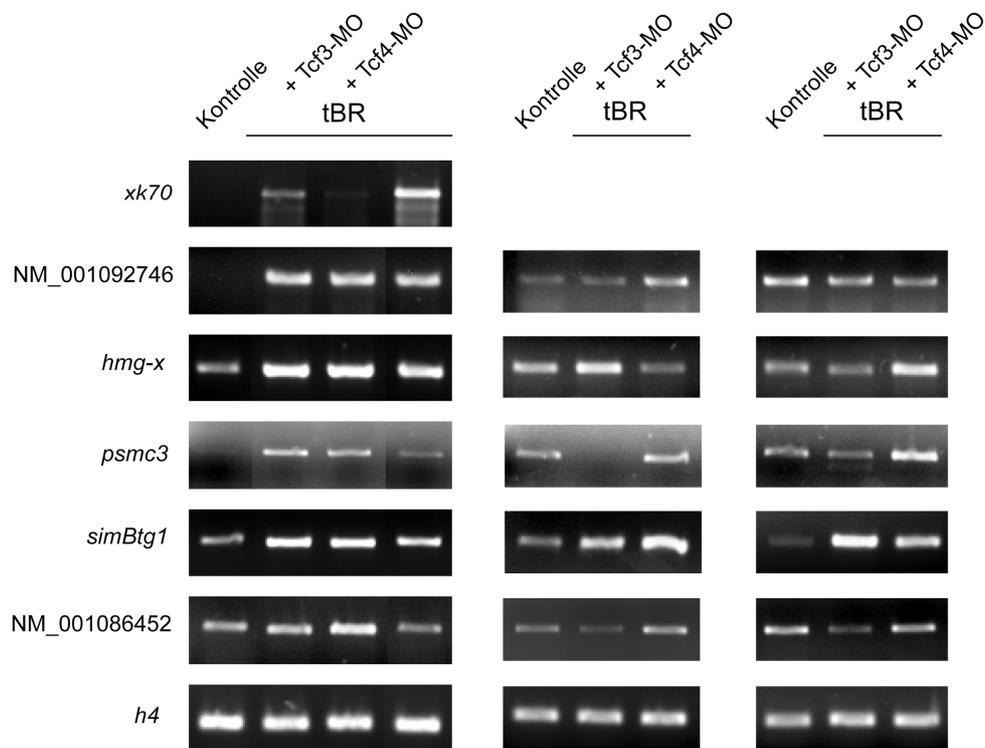


Abb. 18 Überprüfung häufiger *Tcf4*-Zielgenkandidaten in neuralisierten animalen Kappen nach Herunterregulieren von *Tcf4* bzw. *Tcf3*. Dargestellt sind die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente.

100 pg tBR (trunkierter **BMP-Rezeptor**)-mRNA alleine und zusammen mit je 8 pmol TCF-antisense-Morpholino-Oligonukelotid (MO) wurden im Zwei-Zellstadium am animalen Pol beider Blastomere injiziert. Animale Kappen aus Blastula-Embryonen wurden kultiviert bis die Geschwisterembryonen (Embryo) die Neurula erreicht hatten. Die Gesamt-RNA aus 10 animalen Kappen bzw. einem Embryo wurde revers transkribiert und die angegebenen Gene amplifiziert.

Als Kontrolle dienen animale Kappen, die aus unbehandelten Embryonen explantiert wurden.

Das Haushaltsgen Histon 4 (*h4*) dient der Ladekontrolle.

- RT zeigt die Amplifikation einer Kontrollprobe ohne reverse Transkriptase.

Unter den *Tcf4*-Kandidatengeneten waren die Resultate nach Depletion der beiden Transkriptionsfaktoren *Tcf3* und *Tcf4* insgesamt weniger eindeutig. Daher werden mehrere unabhängige und sich teilweise widersprechende Ergebnisse nebeneinander gestellt (Abb. 18). Nur *xk70* ist nach der Applikation von *Tcf4*-Morpholino reduziert, was dem Verhalten eines *Tcf4*-Ziels entspricht. *Psmc3* und NM_001086452 verhalten sich in zwei von drei Fällen entgegen der Erwartung, denn sie sind nach *Tcf4*-Depletion nicht reduziert, sondern induziert. Für alle anderen hier betrachteten *Tcf4*-Kandidaten bleibt eine Schlussfolgerung schwierig, da sie stark voneinander abweichende Ergebnisse zeigen. Sie schwanken zwischen einer TCF-unabhängigen Expression und der Abhängigkeit von *Tcf3* und *Tcf4*.

5.4.3 Untersuchung des räumlichen und zeitlichen Expressionsmusters der Kandidatengene

5.4.3.1 Klonierung von Matrizen für die Herstellung von *in-situ*-Sonden

Eine Voraussetzung um das zeitliche und räumliche Expressionsprofil der identifizierten Zielgen-Kandidaten in der Ganzkeimfärbung charakterisieren zu können, sind geeignete RNA-Sonden. Dabei stellten sich im Fall von *rps2e* und NM_001096142 die cDNA-Fragmente der Klonbanken als Matrizen zur Herstellung von RNA-Sonden für die *in-situ*-Hybridisierung als unbrauchbar heraus.

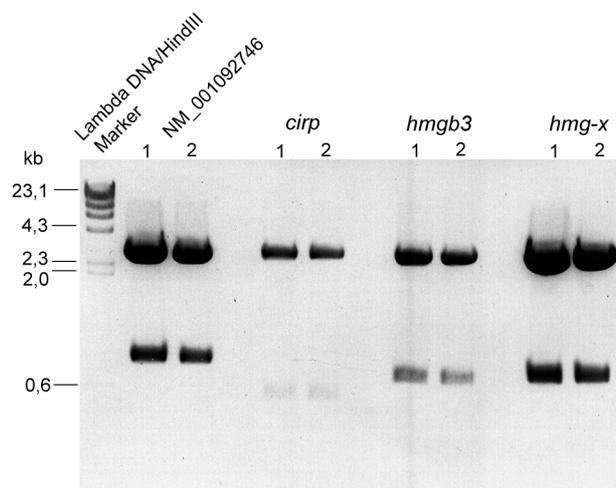


Abb. 19 Restriktionsanalyse der in den Klonierungsvektor pGEMT insertierten offenen Leserahmen von NM_00109746, *cirp*, *hmgb3* und *hmg-x* als Template zur Herstellung von *in-situ*-Sonden. Durch Restriktionsverdau wurde die erfolgreiche Insertion in je zwei isolierten Klonen überprüft. Die ausgeschnittenen Fragmente zeigen mit 780 bp im Fall von NM_001092746, mit 500 bp im Fall von *cirp*, mit 620 bp im Fall von *hmgb3* und mit 640 bp bei *hmg-x* die erwartete Größe. Der leere pGEMT-Vektor hat demgegenüber die erwartete Größe von 3 kbp.

Dies könnte in der Tatsache begründet sein, dass die meisten aus dem subtraktiven Screen gewonnenen cDNA-Fragmente für einen repetitiven Bereich im nicht-translatierten Bereich kodieren. Daher wurden die offenen Leserahmen einiger Zielgene mit genspezifischen Primern aus der cDNA eines Embryos im Neurula-Stadium amplifiziert und in einen für die *in-vitro* Transkription geeigneten Vektor kloniert (Abb. 19). Eine Überprüfung im Restriktionsverdau belegt die Insertion von Fragmenten der erwarteten Größe. Die Identität der Fragmente wurde durch Sequenzanalyse verifiziert.

Mit Hilfe dieser Matrizen konnten für *cirp*, *hmgb3* und *hmg-x* geeignete Sonden hergestellt werden. Überraschenderweise führte dagegen im Fall von NM_001096142 die Hybridisierung mit einer sense- wie mit einer antisense-RNA-Sonde zu einem vergleichbaren Ergebnis, was für eine unspezifische Färbung spricht, die als Ergebnis verworfen werden muss (Abb. 20).

5.4.3.2 Analyse des räumlichen und zeitlichen Expressionsmusters der Kandidatengene anhand der Transkripte

Durch Anfrage bei anderen Arbeitsgruppen konnte die Gruppe der HMG-Proteine vervollständigt und das Expressionsprofil einiger Kandidaten untersucht werden. Die in der Ganzkeimfärbung ermittelten Expressionsmuster lassen auf eine teilweise Überlappung mit *Tcf3* und *Tcf4* – ihren potentiellen Regulatoren – schließen (Abb. 20 und 21).

Während *Tcf3* im Neuroektoderm ein weites Expressionsfeld aufweist, ist das von *Tcf4* eng auf das zukünftige Mittelhirn begrenzt. Besonders auffällig ist die Ähnlichkeit in Bezug auf die deutliche mRNA-Konzentration in der Neuralplatte zwischen *Tcf3* und *cirp*, was seine hohe Bewertung als potentielles *Tcf3*-Zielgen gemessen an seiner großen Häufigkeit unterstreicht. Die Vertreter der NBD (**N**ucleosome **B**inding **D**omain)-Proteine *hmgn2* und *hmgn1* sind so kolokalisiert, dass eine Regulation durch beide TCFs möglich scheint. Das Expressionsmuster von *hmgb3* ist hier nicht gezeigt. Es ist aber zu dem der HMGNs vergleichbar (Terada et al., 2006). Das Expressionsmuster von *hmg-x* wirkt dagegen in der Neurula stärker als das der übrigen Kandidaten auf das künftige Mittelhirn beschränkt, was auf seine Einordnung als potentielles *Tcf4*-Zielgen zurückzuführen sein könnte.

Alle in der Ganzkeimfärbung untersuchten Kandidaten zeichnen sich aus durch eine Expression in der Neuralplatte während des Neurulastadiums einerseits (Abb. 20) und durch eine auf den Kopf konzentrierte Färbung im Schwanzknospenstadium andererseits (Abb. 21). Dabei sind allen Kandidaten entsprechend dem *Tcf3*-Expresionsmuster eine Lokalisation der Transkripte in Auge, Branchialbögen und otischem Vesikel sowie eine generelle Expression im zentralen Nervensystem gemeinsam.

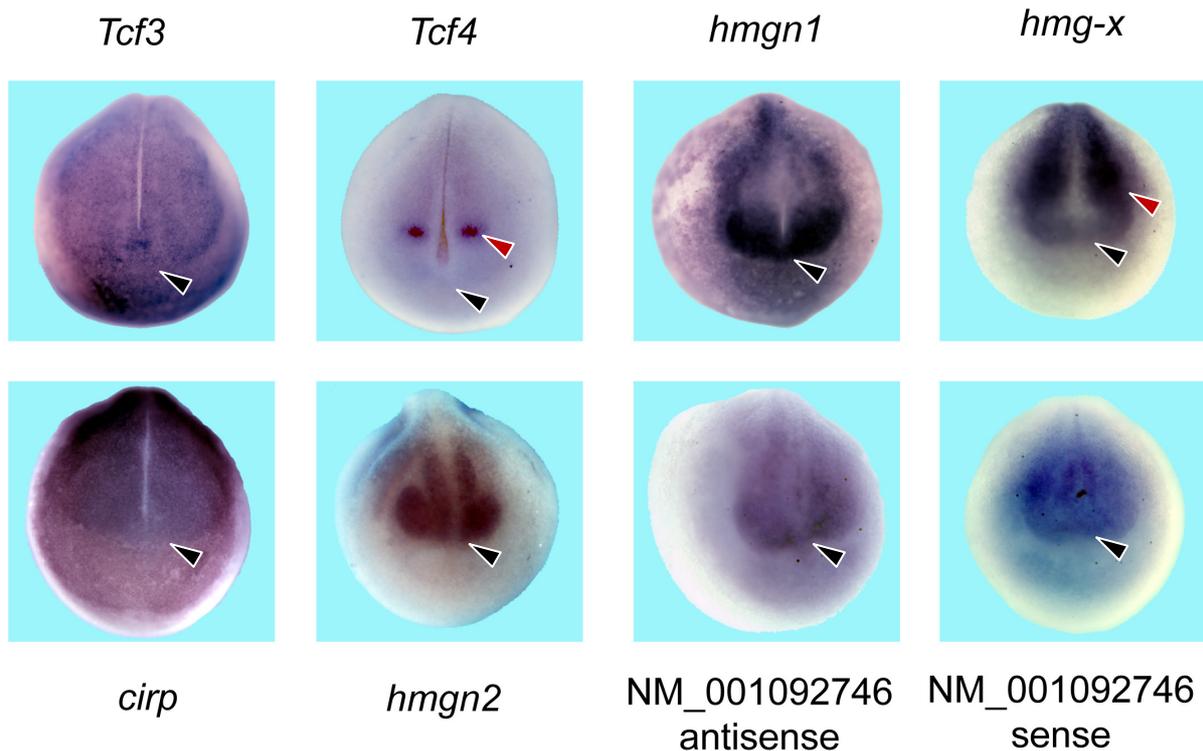


Abb. 20 Koexpression einiger Zielgenkandidaten mit den Transkriptionsfaktoren *Tcf3* und *Tcf4*. Embryonen in der Neurula (Stadium 18 bis 20).

Der schwarze Pfeilkopf markiert die anteriore Grenze der Neuralplatte, ventral davon befindet sich die Zementdrüse. Der rote Pfeilkopf kennzeichnet den Übergang zum Bereich des zukünftigen Mittelhirns.

Nach Hybridisierung mit den antisense-Sonden für die angegebenen Gene wurden die Transkripte (blau) detektiert und durch eine alkalische Phosphatase katalysierte Farbreaktion visualisiert.

Es konnte jedoch unter den untersuchten Kandidatengenens kein Expressionsmuster ermittelt werden, dass die auf das Mittelhirn beschränkte Expression von *Tcf4* widerspiegelt.

Eine Koexpression von *Tcf3* und den Zementdrüsen-spezifischen Markern *xag2* und *xag* liegt während der späten Neurula (Stadium 18 bis 20) nicht vor. Besonders in der frühen Neurula (Stadium 13) werden die XAGs indessen benachbart zur anterioren Neuralrinne exprimiert (Aberger et al., 1998). Somit sind die Transkripte der im nicht-neuralen Ektoderm exprimierten AGR-Familienmitglieder *xag2* und *xag* zwar nicht mit denen von *Tcf3* kolokalisiert, zeichnen sich aber dadurch aus, dass sie an *Tcf3*-exprimierendes Gewebe angrenzen.

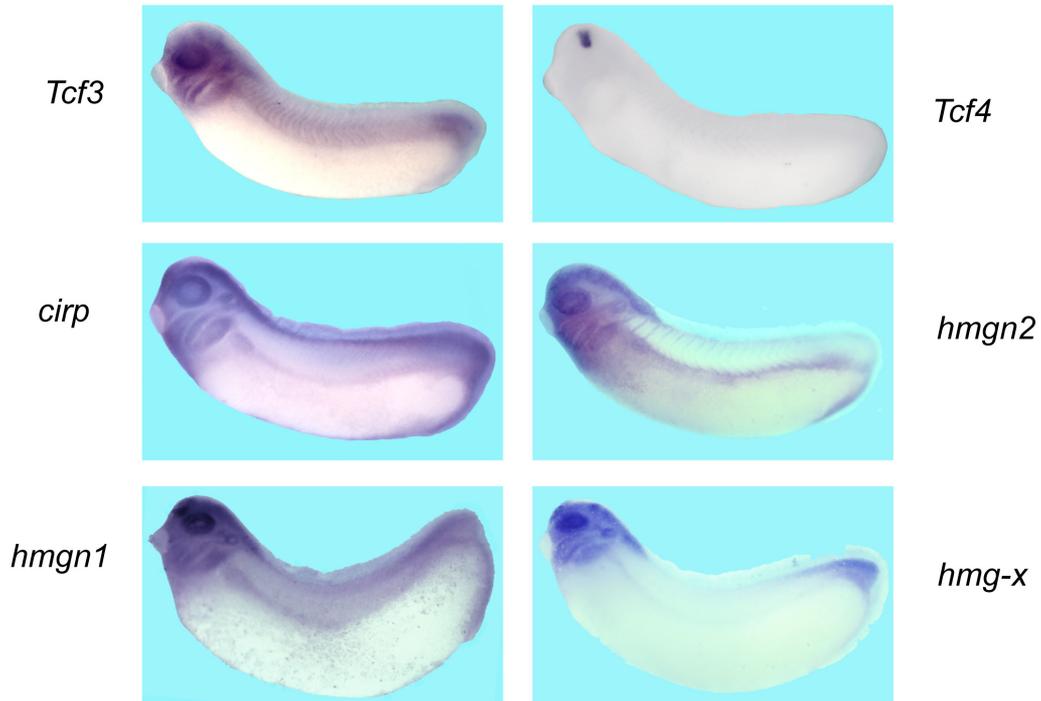


Abb. 21 Koexpression einiger Zielgenkandidaten mit den Transkriptionsfaktoren *Tcf3* und *Tcf4*. Embryonen im Schwanzknospenstadium (Stadium 29-30). Nach Hybridisierung mit den antisense-Sonden für die angegebenen Gene wurden die Transkripte (blau) detektiert und durch eine alkalische Phosphatase katalysierte Farbreaktion visualisiert.

Ein anderer Ansatz ist die Analyse des zeitlichen Expressionsprofils mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Abb. 22). Dies liefert für die Gene, für die keine geeigneten Sonden in der *in-situ*-Hybridisierung zur Verfügung standen, erste Hinweise über eine zeitliche Korrelation mit *Tcf3* und *Tcf4*.

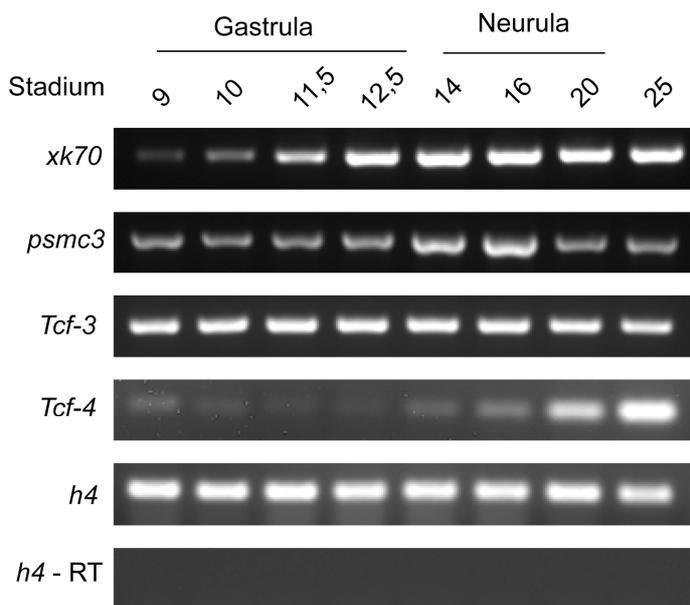


Abb. 22 Zeitliche Koexpression der häufigsten *Tcf4*-Zielgenkandidaten *xk70* und *psmc3*. Die Signalstärke gibt die Menge an Transkript in den angegebenen Stadien wieder. Die cDNA-Matrize wurde nach RNA-Isolierung aus je 3 Embryonen des angegebenen Stadiums durch reverse Transkription synthetisiert. Durch ein vergleichbares Signal für das Haushaltsgen *h4* (Histon 4) sind die Ansätze miteinander vergleichbar. - RT zeigt die Amplifikation einer Kontrollprobe ohne reverse Transkriptase.

Während *xk70* schon in der späten Gastrula verstärkt exprimiert wird, weist *psmc3* erst in Stadium 14 eine erhöhte Expression auf. Der Höhepunkt der *psmc3*-Expression überschneidet sich im Stadium 16 mit der einsetzenden *Tcf4*-Expression. Aber auch mit *Tcf3* sind sowohl *xk70* als auch *psmc3* in den betrachteten Entwicklungsstadien zeitgleich koexprimiert.

5.4.3.3 Untersuchung des räumlichen Expressionsmusters der Kandidatengene

A Nach Überexpression von *Tcf3* und *Tcf4*

Die Regulation der mit *Tcf-3* koexprimierten Kandidatengene wird durch einseitige TCF-Überexpression in der *In-situ*-Hybridisierung untersucht. Die beiden aus der ersten Zellteilung der Oozyte hervorgehenden Blastomeren entwickeln sich beim *Xenopus*-Embryo zu den zukünftigen Körperhälften. Durch Mikroinjektion in eine der beiden Blastomeren im Zweizellstadium ist es daher möglich, den Embryo einseitig zu manipulieren.

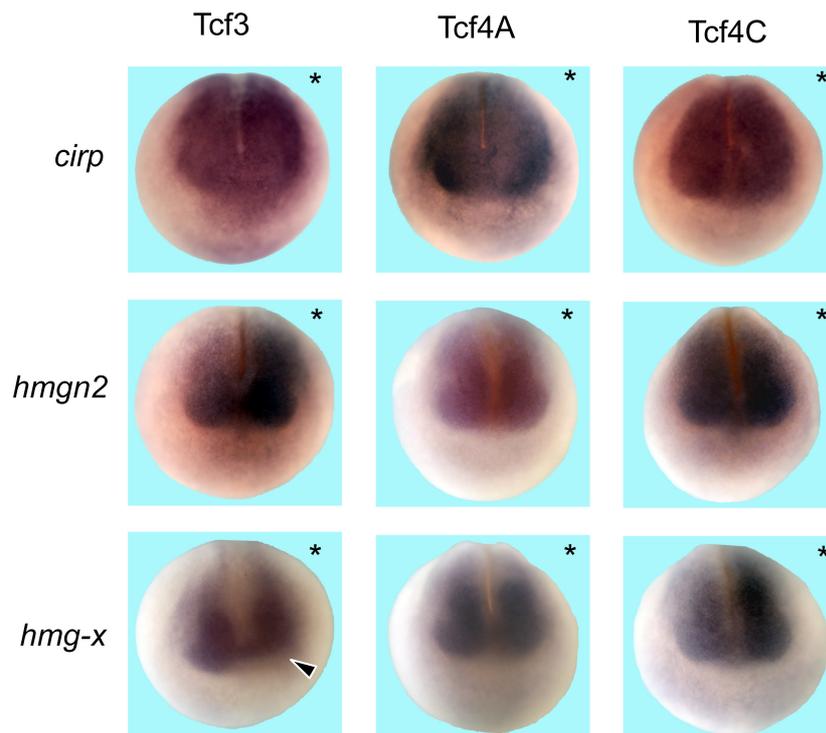


Abb. 23 Überprüfung dreier Zielgenkandidaten in Neurula-Embryonen nach einseitiger Überexpression von *Tcf3* bzw. *Tcf4A* oder *Tcf4C*. Das Sternchen markiert die injizierte Seite. Der schwarze Pfeilkopf markiert eine Reduktion der *hmg-x* Expression. Nach Hybridisierung mit den antisense-Sonden für die angegebenen Gene wurden die Transkripte (blau) detektiert und durch eine alkalische Phosphatase katalysierte Farbreaktion visualisiert.

Durch Beigabe eines fluoreszierenden Farbstoffs oder Koinjektion einer rekombinanten mRNA, die für das grün-fluoreszierende Protein kodiert, wird die injizierte Seite im Neurulastadium durch Ansicht unter UV-Licht identifiziert.

Die Auswirkungen der einseitigen TCF-Überexpression sind insgesamt gering (Abb. 23). Die Grenzen der *cirp*- und der *hmg2*-Expression zeigen nach der Überexpression der TCFs keine deutlichen Veränderungen. Sowohl auf der injizierten Seite als auch auf der uninjizierten Seite markieren die Transkripte die Grenze der Neuralplatte und sind in ihrer lateralen Ausdehnung unverändert. Die Expression von *hmg-x* scheint dagegen nach *Tcf3*-Überexpression in seiner anterioren Ausdehnung reduziert zu sein (Abb. 23, Pfeilkopf). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen aus den neuralisierten Kappen, in denen *Tcf3* ebenfalls reprimierend auf die *hmg-x*-Expression wirkte.

B Nach Unterdrückung der *Tcf3*- beziehungsweise *Tcf4*-Translation

Erneut ist die Depletion der Transkriptionsfaktoren das Mittel der Wahl, um die endogene Funktion von *Tcf3* und *Tcf4* untersuchen zu können. Die Auswirkungen der *Tcf3*-Depletion auf die *cirp*-Expression sind tiefgreifend. Auf der injizierten Seite ist das Signal besonders in der Neuralplatte kaum mehr nachweisbar (Abb. 24, roter Pfeilkopf). Das Herunterregulieren von *Tcf4* bleibt für *cirp* dagegen ohne weitreichende Folgen. Damit ist *cirp* als *Tcf4*-unabhängiges *Tcf3*-Zielgen verifiziert.

Für die anderen betrachteten Kandidaten bleibt der Nachweis einer TCF-Subtyp-spezifischen Regulation in der Neurula diffizil (Abb.24). Als Folge der *Tcf3*-Translationsblockade verschiebt sich die das Neuralgewebe kennzeichnende Expression der HMG-Proteine lateral und das Expressionsgebiet im Auge verschmilzt mit dem im Gehirn (Abb. 24, schwarzer Pfeilkopf). Dieses veränderte Expressionsmuster korreliert mit dem abweichenden Muster des panneuralen Markers *sox2* (*SRY(sex determining region Y)-box2*) (Abb. 24, schwarzer Pfeilkopf). Die Verminderung von *Tcf4* hat im Gegensatz dazu auf das Expressionsmuster der HMG-Proteine und auf das von *sox2* keine Auswirkungen.

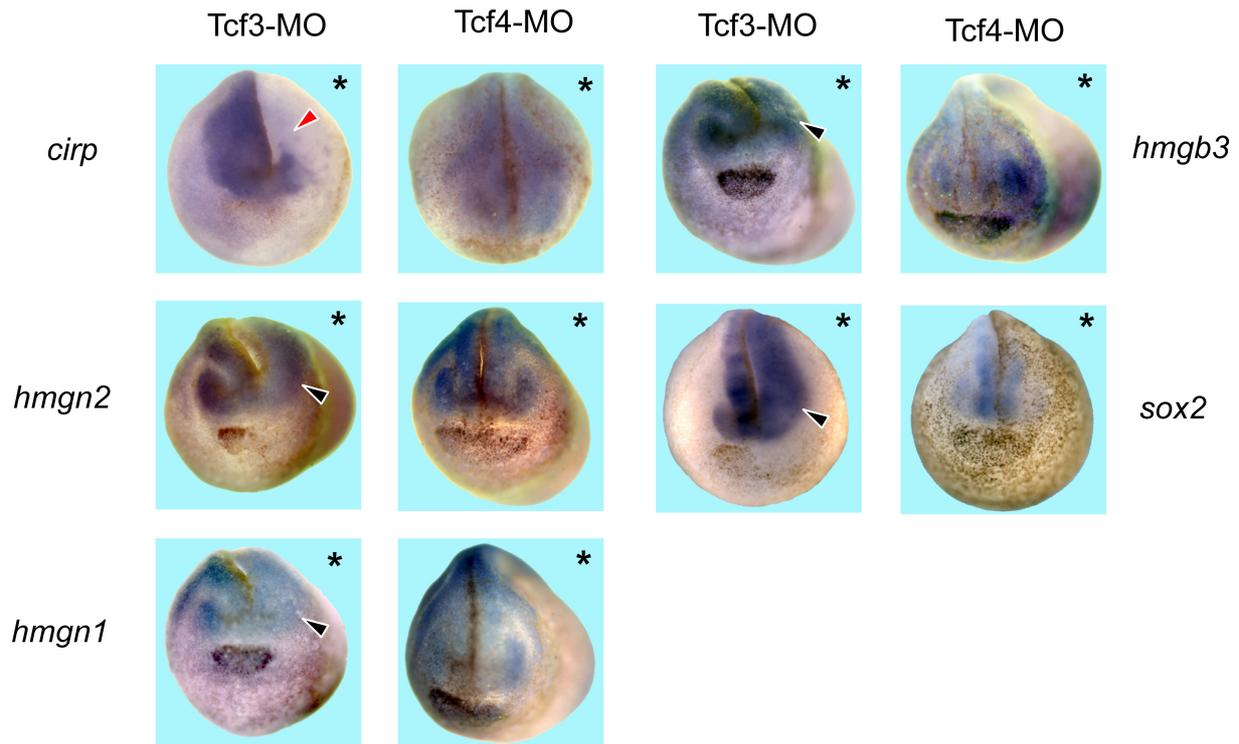


Abb. 24 Überprüfung einiger Zielgenkandidaten in Neurula-Embryonen nach einseitigem Herunterregulieren von *Tcf3* bzw. *Tcf4*. Das Sternchen markiert die injizierte Seite.

Der rote Pfeilkopf kennzeichnet den Verlust an *cirp*-Transkripten in der Neuralplatte.

Der schwarze Pfeilkopf markiert die laterale Expansion der das Neuroektoderm markierenden Transkripte.

Nach Hybridisierung mit den antisense-Sonden für die angegebenen Gene wurden die Transkripte (blau) detektiert und durch eine alkalische Phosphatase katalysierte Farbreaktion visualisiert.

MO: Morpholino-Oligonukleotid.

5.4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Verifizierung der Kandidaten

Um einen Überblick über die differentielle Regulation der untersuchten putativen Zielgene zu geben, werden die bisherigen Ergebnisse in Tabelle 3 und 4 zusammengefasst.

Von den elf untersuchten *Tcf3*-Zielgen-Kandidaten ließen sich vier verifizieren. Für zwei weitere Kandidaten ist es wahrscheinlich, dass es sich um *Tcf3*-Ziele handelt. Drei *Tcf3*-Zielgen Kandidaten konnten nicht verifiziert werden und zwei verhielten sich entgegen den Erwartungen.

Als ausnehmend interessantes putatives *Tcf3*-Zielgen hat sich *cirp* erwiesen. Nicht nur das stark mit *Tcf3* überlappende Expressionsmuster, sondern auch die deutlich *Tcf3*-abhängige Regulation heben *cirp* als Zielgen hervor. Für die *cirp2*-Isoform bleibt die Entscheidung unklar, da es in den Funktionsgewinn-Studien entweder durch *Tcf4* aktiviert wurde oder sich

indifferent verhalten hat. Auch *sfrs2* kann nicht endgültig verifiziert werden, wenn auch die *Tcf3*-abhängige Regulation in Embryonen für seine Bestätigung als *Tcf3*-Ziel spricht.

Tab. 3 Verifizierung der putativen *Tcf3*-Zielgene

Ein „+“ kennzeichnet ein *Tcf3*-Ziel-konformes Verhalten, ein „-“ steht für eine Regulation entgegen der Erwartung. Eine TCF-Subtyp-unabhängige Steuerung wird durch „=“ und ein ambivalentes Verhalten durch „?“ symbolisiert. Liegen keine Aussagen vor, so ist dies mit „n. b.“ (nicht bekannt) gekennzeichnet. Klammern stehen für eine schwache Regulation.

<i>Tcf3</i> -Zielgen-Kandidaten			verifiziert in Neurula-Embryonen	verifiziert in neuralisierten Kappen		verifiziert
	Häufigkeit	Kolokalisation	nach Überexpression	nach Überexpression	nach Knockdown	
<i>cirp</i>	11	++	+	+	++	++
<i>cirp2</i>	1	n. b.	-	=	+	?
<i>sfrs2</i>	2	n. b.	+	(-)	=	?
<i>xag2</i>	12	(+)	+	(-)	++	+
<i>xag</i>	4	(+)	+	n. b.	+	(+)
<i>hmgn2</i>	7(2)	+	+	=	=	(+)
<i>hmgn1</i>	2(1)	+	+	=	(+)	+
<i>rps2e</i>	2	?	(+)	-	+	?
<i>gfpt1</i>	2	n. b.	-	(-)	+	(-)
NM_001096142	1	?	+	+	+	+
<i>ywhaq</i>	1	n. b.	-	-	n. b.	-

Für *xag2* und *hmgn1* als authentische *Tcf3*-Zielgene spricht vor allem ihre Regulation durch endogenes *Tcf3* und *Tcf4* in neuralisierten animalen Kappen. Ihre Verwandten *xag* beziehungsweise *hmgn2* sind dagegen als *Tcf3*-Ziele weniger überzeugend.

Da für *rps2e* keine eindeutige TCF-Subtyp-spezifische Regulation ermittelt werden konnte, gilt es als unbestätigter *Tcf3*-Zielgen-Kandidat. Demgegenüber muss *gfpt1* als *Tcf3*-Ziel verworfen werden. Während sich für *ywhaq* eine Einordnung als *Tcf4*-Zielgen andeutet, konnte das hypothetische Protein NM_001096142 als differentiell reguliertes *Tcf3*-Zielgen verifiziert werden. Da aber eine spezifische mRNA-Detektion in der *in-situ*-Hybridisierung fehlschlug (nicht gezeigt), ist es für weitere Analysen ungeeignet.

Tab. 4 Verifizierung der putativen *Tcf4*-Zielgene.

Ein „+“ kennzeichnet ein *Tcf4*-Ziel-konformes Verhalten, ein „-“ steht für eine Regulation entgegen der Erwartung. Ein ambivalentes Verhalten wird durch „?“ symbolisiert. Liegen keine Aussagen vor, so ist dies mit „n. b.“ (nicht bekannt) gekennzeichnet. Klammern stehen für eine schwache Regulation.

<i>Tcf4</i> -Zielgen-Kandidaten			verifiziert in Neurula-Embryonen	verifiziert in neuralisierten Kappen		verifiziert
	Häufigkeit	Kolokalisation	nach Überexpression	nach Überexpression	nach Knockdown	
<i>xk70</i>	5(1)	(zeitlich)	+	++	+	+
NM_001092746	1	?	+	++	?	?
<i>hmg-x</i>	1	+	+	++	?	(+)
<i>hmgb3</i>	1(1)	+	++	(-)	?	?
<i>psmc3</i>	3	(zeitlich)	-	(-)	(-)	-
<i>simBtg1</i>	1	n. b.	-	(-)	?	-
NM_001086452	1	n. b.	+	(-)	(-)	?

Von den sieben analysierten *Tcf4*-Zielgen-Kandidaten konnten zwei verifiziert werden. Für drei Kandidaten bleibt die TCF-Subtyp-spezifische Regulation unklar, während zwei Kandidaten falsifiziert wurden.

Xk70 kann mit großer Sicherheit anhand der funktionellen Studien als *Tcf4*-Zielgen bestätigt werden. Auch NM_001092746, *hmg-x* und *hmgb3* sind vor allem nach TCF-Überexpression einem *Tcf4*-Ziel entsprechende reguliert. Jedoch konnte die Abhängigkeit ihrer Expression von endogen vorhandenem *Tcf4* in neuralisierten animalen Kappen nicht zweifelsfrei gezeigt werden. *Psmc3* und *simBtg1* müssen als *Tcf4*-Zielgene verworfen werden. Ihre Regulation weist sie eher als durch *Tcf4* reprimierte Gene aus.

Nicht eindeutig verifiziert werden konnte NM_001086452, da es vor allem zwischen einer *Tcf4*-abhängigen Aktivierung in Embryonen und einer allgemeinen Repression durch alle TCFs in neuralisierten animalen Kappen schwankt.

Unter allen auf ihre differentielle Regulation untersuchten Zielgen-Kandidaten, ist *cirp* das am sichersten verifizierte Zielgen. Daher wird es detaillierter auf seine Steuerung und Funktion untersucht.

5.5 *Cirp* als Tcf3-Zielgen

Aus den vorangegangenen Studien konnte *cirp* als differentiell regulierter Zielgen-Kandidat mit hoher Sicherheit ermittelt werden. Für das zweite Familienmitglied, *cirp2*, ist die Regulation weniger eindeutig. Die beiden *cirp*-Varianten kodieren für Proteine, die aus 166 Aminosäuren aufgebaut sind. Ihre Aminosäure-Sequenzen sind zu 92% identisch. In diesem Bereich liegt auch die Übereinstimmung der Nukleinsäuren im offenen Leserahmen (ORF, open reading frame). Die Unterscheidung der beiden Varianten in der PCR gelang durch den Einsatz genspezifischer Primer, die es erlauben, einen Bereich des 3'-nicht-translatierten Bereichs zu amplifizieren.

5.5.1 *Cirp* ist mit Tcf3 kolokalisiert

Um das besondere Verhältnis zwischen dem Zielgen *cirp* und seinem Regulator *Tcf3* im Einzelnen entschlüsseln zu können, erfolgt eine ausführliche Untersuchung des *cirp*-Expressionsmusters.

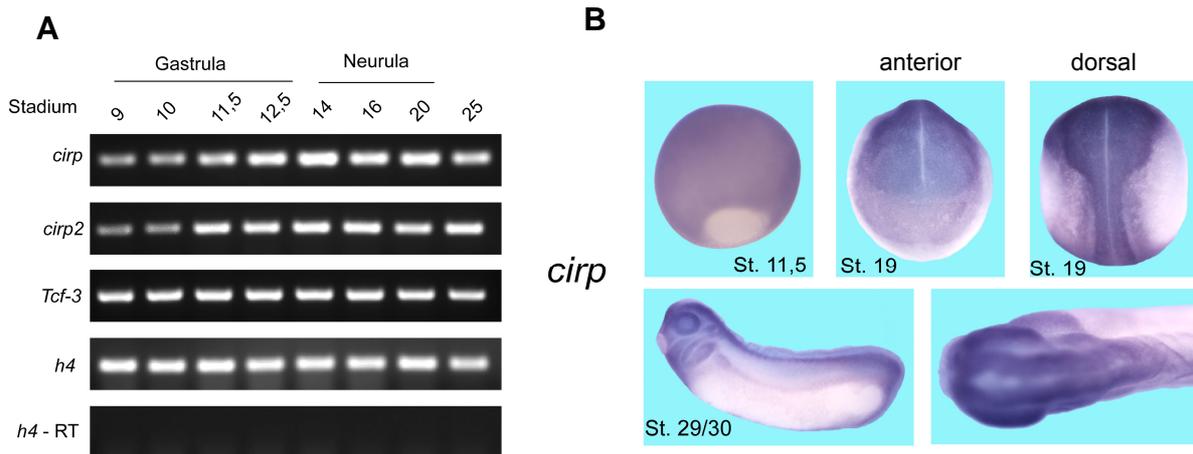


Abb. 25 Verlauf der *cirp*- und der *cirp2*-Expression.

A Nachweis der Transkripte mittels RT-PCR.

Die Signalstärke gibt die Menge an Transkript in den angegebenen Stadien wieder.

Die cDNA-Matrize wurde nach RNA-Isolierung aus je 3 Embryonen des angegebenen Stadiums durch reverse Transkription synthetisiert. Durch ein vergleichbares Signal für das Haushaltsgen *h4* (Histon 4) sind die Ansätze miteinander vergleichbar.

- RT zeigt die Amplifikation einer Kontrollprobe ohne reverse Transkriptase.

B Bestimmung der mRNA-Verteilung mit Hilfe der Ganzkeimfärbung.

Nach Hybridisierung mit der *cirp*-antisense-Sonde wurden die Transkripte (blau) in den angegebenen Stadien detektiert und durch eine alkalische Phosphatase katalysierte Farbreaktion visualisiert.

Während eine Unterscheidung der *cirp*-Varianten in der RT-PCR möglich scheint, erlaubt die auf dem *cirp*-ORF beruhende *in-situ*-Sonde keine Unterscheidung zwischen *cirp* und *cirp2* (Abb. 25). Der zeitliche Expressionsverlauf von *cirp* und *cirp2* ist vergleichbar. Die Menge beider *cirp*-Transkripte nimmt mit der späten Gastrula zu und bleibt während der weiteren

Entwicklung mehr oder weniger auf diesem Niveau. Insgesamt scheint es, als zeige *cirp* gegenüber *cirp2* das dynamischere Expressionsprofil mit einer deutlichen Expressionsspitze im Stadium 14 und einem stärkeren Abfall danach (Abb. 25 A).

Die *in-situ*-Hybridisierung gibt die räumliche Verteilung der *cirp*-Transkripte wieder. Während die beiden *cirp*-Transkripte in der Gastrula im gesamten Ektoderm lokalisiert sind, konzentrieren sie sich in der Neurula auffallend stark auf das Neuroektoderm. In späten Entwicklungsstadien belegt die Ganzkeimfärbung die mit *Tcf3* überlappende *cirp*-Expression im zentralen Nervensystem, in den Augen, den Ohrvesikeln und der Schwanzknospe (Abb. 25 B).

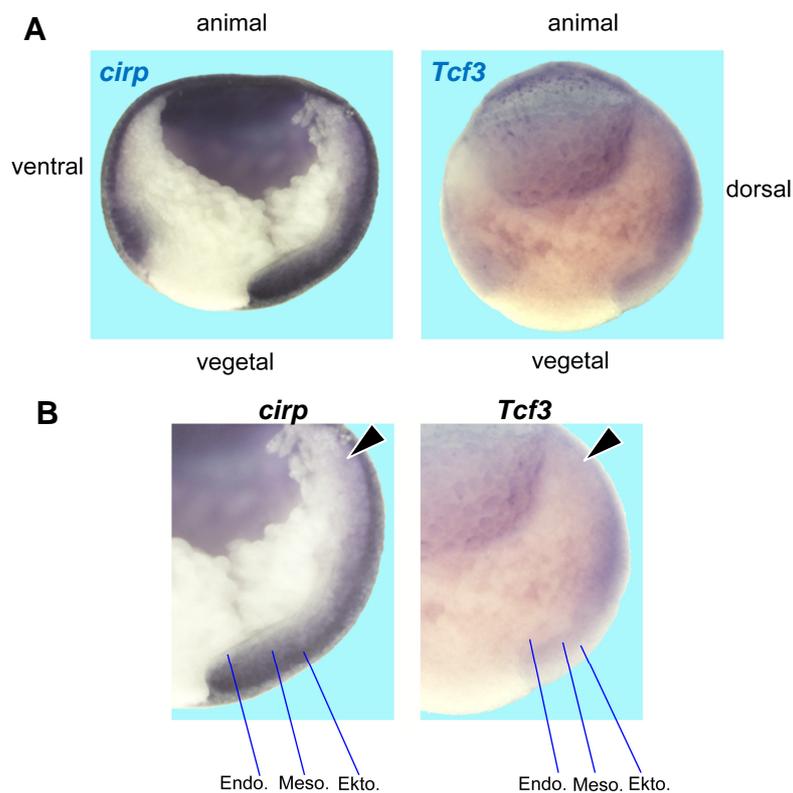


Abb. 26 *Cirp*- und *Tcf3*-Expression während der Gastrula im Vergleich. Durch einen Sagittalschnitt halbierte Embryonen im Stadium 11,5 nach Ganzkeimfärbung mit *cirp*- und *Tcf3*-antisense-Sonde. Die Transkripte (blau) wurden detektiert und durch eine alkalische Phosphatase katalysierte Farbreaktion visualisiert. In der oberen Hälfte der Embryonen ist das Blastocoel als großer Hohlraum sichtbar.

A Überblick **B** Ausschnitts-Vergrößerung des dorsalen Bereichs.

Der Pfeilkopf markiert den Bereich des am weitesten eingewanderten anterioren Endomesoderms.

Endo.: Endoderm; Meso.: Mesoderm; Ekto.: Ektoderm

Für eine eingehendere Beurteilung der mRNA-Verteilung während dieses wichtigen Entwicklungsschrittes wurden Embryonen im Gastrula-Stadium nach einer Ganzkeimfärbung durch einen Sagittalschnitt halbiert. Dies eröffnet einen detaillierten Blick auf das Expressionsmuster in allen Einzelheiten (Abb. 26).

Cirp und *Tcf3* werden beide im Ektoderm sowie im involutierenden Mesoderm exprimiert, während im Endoderm kaum Transkripte nachweisbar sind. Die *cirp*-Expression ist in den tiefer gelegenen Zellen des Ektoderms am intensivsten. Indessen zeichnet sich *Tcf3* durch die stärkste Transkription im einwandernden Mesoderm aus (Abb. 26 B). Folglich ergeben sich bereits im Verlauf der Gastrulation Bereiche, in denen die Expression des Zielgens *cirp* mit der seines Regulators *Tcf3* überlappt. In Gebieten wie den tiefen Ektoderm-Zellen ist die Vermutung naheliegend, dass die *cirp*-Expression neben *Tcf3* von weiteren Faktoren abhängig ist.

Auch in der Neurula gibt es zwischen *Tcf3* und *cirp* eine überlappende Expression. Für einen eingehenden Vergleich wurden daher Transversal-Schnitte von Embryonen in der Neurula herangezogen (Abb. 27). Die *cirp*-Transkripte zeigen eine deutliche Anreicherung im Ektoderm, besonders auffällig ist aber die Lokalisation in der Neuralplatte. Darüber hinaus kann *cirp* im intermediären Mesoderm zwischen den zukünftigen Somiten und dem Seitenplatten-Mesoderm detektiert werden (Abb. 27 links, Pfeilkopf).

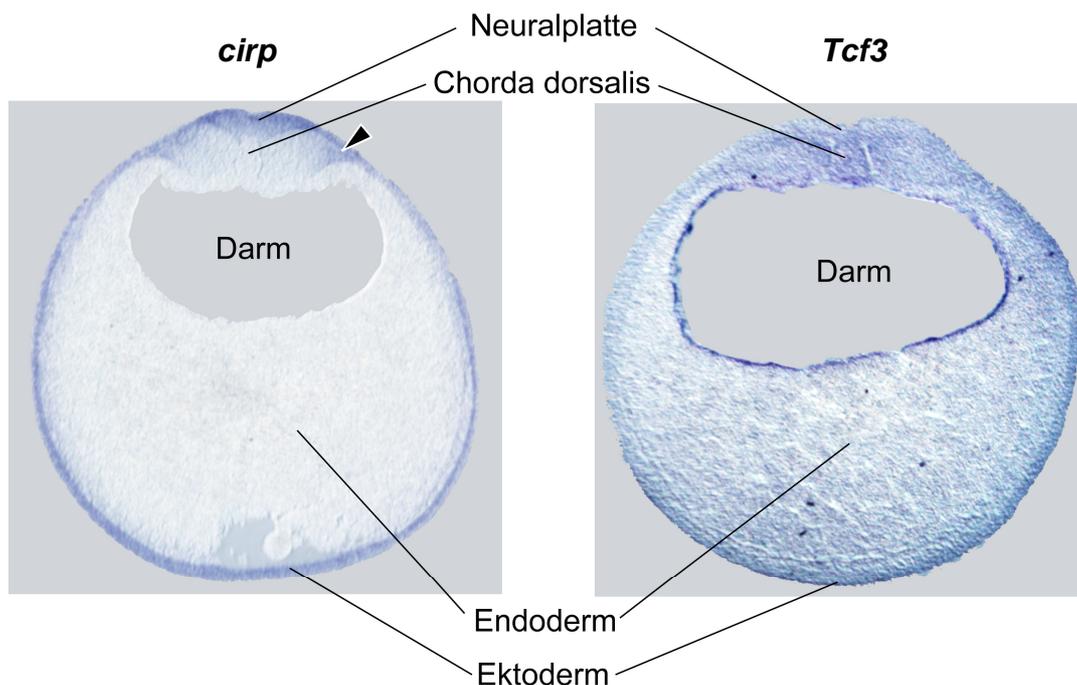


Abb. 27 *Cirp*- und *Tcf3*-Expression während der Neurula im Vergleich. Transversal-schnitte an in Gelatine/Albumin-eingebetteten Embryonen im Stadium 19 nach Ganzkeimfärbung mit *cirp*- und *Tcf3*-antisense-Sonde. Die Transkripte (blau) wurden detektiert und durch eine alkalische Phosphatase katalysierte Farbreaktion visualisiert. Der Pfeilkopf markiert das intermediäre Mesoderm.

Auch *Tcf3* wird in der Neuralplatte sowie im gesamten Ektoderm exprimiert (Abb. 27 rechts). Daneben gibt es *Tcf3*-Transkripte in den mesodermalen Geweben wie der *Chorda dorsalis* und den zukünftigen Somiten. Dies entspricht dem für *Tcf3* beschriebenen Expressionsmuster (Molenaar et al., 1998). Die Färbung der Darmwand könnte eine

unspezifische Farbstoff-Ablagerung sein, wie sie manchmal an der Begrenzung von Hohlräumen zu beobachten ist.

5.5.2 *Cirp* ist vom endogen vorhandenen *Tcf3* abhängig

Auf der injizierten Seite sind die nachweisbaren *cirp*-Transkripte in der Ganzkeimfärbung nach Applikation des *Tcf3*-Morpholinos deutlich vermindert. Beachtet man weiter, dass *cirp* vornehmlich im Neuroektoderm exprimiert wird, kann man vermuten, dass *Tcf3* für die Induktion beziehungsweise Aufrechterhaltung der *cirp*-Expression in den Geweben notwendig ist, in denen beide Transkripte kolokalisieren.

Tatsächlich zeigen Transversalschnitte an Neurula-Embryonen, den deutlichen Verlust der *cirp*-Expression im Bereich der Neuralplatte nach *Tcf3*-Depletion (Abb. 28).

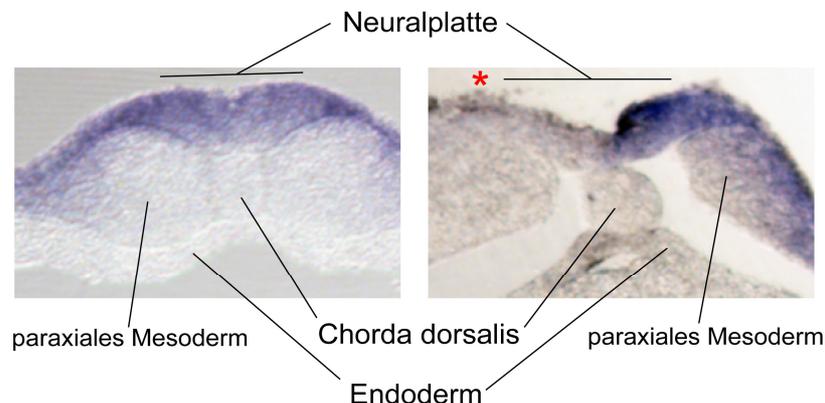


Abb. 28 *Cirp*- und *Tcf3*-Expression während der Neurula im Vergleich. Dorsale Ausschnitte von Transversalschnitten an Neurula-Embryonen im Stadium 19. *Cirp*-Transkripte wurden mittels Ganzkeimfärbung detektiert (blau). Das linke Bild zeigt den Schnitt an einem unbehandelten Embryo. Im rechten Bild wurde ein einseitig injizierter Embryo geschnitten. Das rote Sternchen markiert die injizierte Seite.

5.5.3 *Cirp* ist ein *Tcf3*-spezifisches Zielgen

Wie schon im Verlauf des Verifizierungs-Verfahrens gezeigt werden konnte, ist die *cirp*-Expression von *Tcf4* unabhängig. Es bleibt zu prüfen, ob *cirp* von *Lef1*, das auch im Neuralgewebe exprimiert ist (Molenaar et al., 1998), reguliert wird.

Die *Lef1*-Translation kann durch ein *Lef1*-spezifisches antisense-Morpholino-Oligonukleotid blockiert werden (Albert, Diplomarbeit 2004). Wie in Abb. 29 zu sehen, hatte der *Lef1*-Funktionsverlust jedoch keine Verminderung von *cirp*-Transkripten zur Folge, wie sie nach *Tcf3*-Depletion beobachtet werden kann. Hinsichtlich der *cirp*-Regulation gibt es folglich keine Redundanzen unter den LEF/TCFs. Nach Überexpression aller untersuchter

LEF/TCFs bleibt das *cirp*-Expressionsmuster in seiner Ausdehnung und Intensität unverändert (Abb. 29).

Diese Ergebnisse weisen erneut auf die streng *Tcf3*-abhängige *cirp*-Regulation hin.

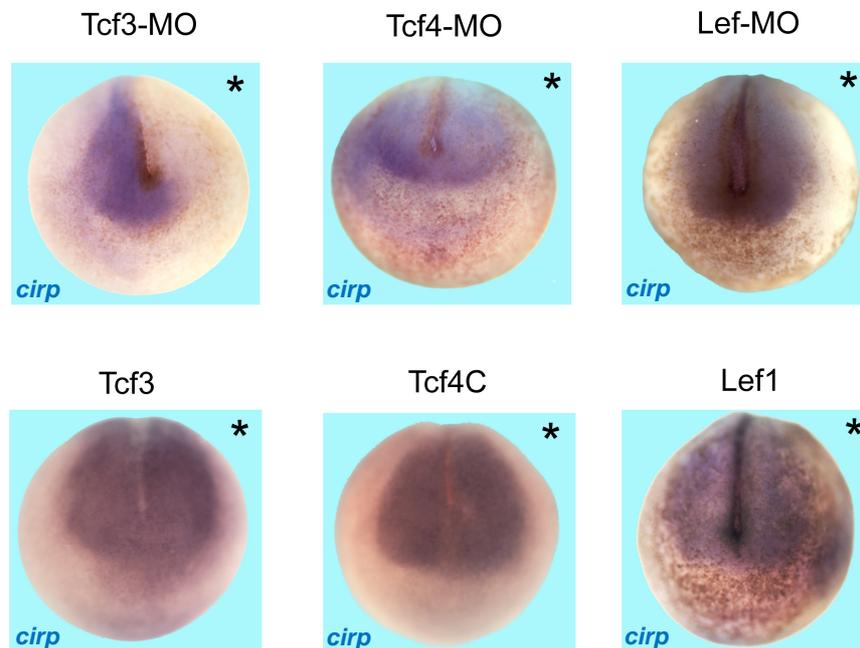


Abb. 29 *Cirp*-Expression während der Neurula im Vergleich (anteriore Ansicht). *Cirp*-Transkripte (blau) wurden mittels Ganzkeimfärbung detektiert. Die obere Reihe zeigt Embryonen nach Applikation des angegebenen antisense-Morpholino-Oligonukleotids (MO). In der unteren Reihe wurde rekombinante mRNA injiziert. Das Sternchen markiert die injizierte Seite.

Die verminderte *cirp*-Expression nach *Tcf3*-Depletion kann durch die Koinjektion rekombinanter *Tcf3*-mRNA wiederhergestellt werden. Diese Rekonstitution war Dosis-abhängig. Damit ist die *Tcf3*-spezifische *cirp*-Regulation im Embryo verifiziert. Überraschenderweise war nach der endogenen *Tcf3*-Reduktion auch *Lef1* mit vergleichbarer Penetranz in der Lage, die *cirp*-Expression wieder zu etablieren (Fichtner, Diplomarbeit, 2007).

5.5.4 *Cirp* ist in neuralisierten animalen Kappen ein Wnt-unabhängiges Zielgen

Die spezifische Regulation der *cirp*-Expression durch *Tcf3*, nicht aber durch *Lef1* und *Tcf4* wirft die Frage auf, ob *cirp* durch übergeordnete Aktivatoren und Repressoren der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade beeinflusst wird. Daher wird seine Regulation in neuralisierten animalen Kappen nach Aktivierung und nach Blockierung der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade untersucht. Dabei dient *Xwnt8* als potenter Aktivator der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade, Conductin dagegen als Inhibitor.

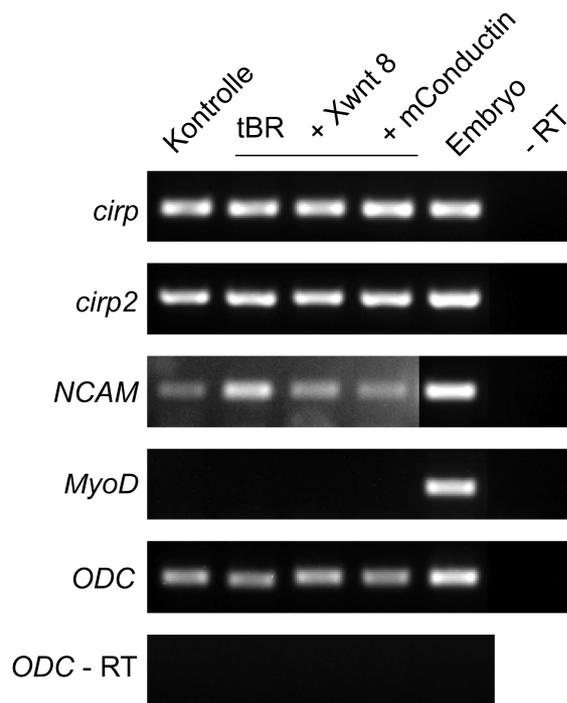


Abb. 30 Regulation der *cirp*-Expression nach Aktivierung und Blockierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in neuralisierten animalen Kappen.

100 pg tBR (trunkierter **BMP-Rezeptor**)-mRNA, 70 pg *Xwnt8*-mRNA und 500 pg *Conductin*-mRNA wurden im Zwei-Zellstadium am animalen Pol injiziert. Animale Kappen aus Blastula-Embryonen wurden kultiviert bis die Geschwisterembryonen (Embryo) die Neurula erreicht hatten. Die Gesamt-RNA aus 10 animalen Kappen bzw. einem Embryo wurde revers transkribiert und die angegebenen Gene amplifiziert.

Als Kontrolle dienen animale Kappen, die aus unbehandelten Embryonen explantiert wurden. Das Haushaltsgen *ODC* (Ornithin-Decarboxylase) dient als Ladekontrolle.

-RT zeigt die Amplifikation einer Kontrollprobe ohne reverse Transkriptase.

Cirp: cold inducible RNA-binding protein; *NCAM*: neural cell adhesion molecule, panneurales Markergen; *MyoD*: myogenic differentiation, mesodermales Markergen.

Obwohl der neuralisierte Grundzustand durch die Aktivierung des panneuralen Markergens *NCAM* belegt ist, führt die Neuralinduktion zu keiner markanten Veränderung der *cirp*- und *cirp2*-Expression (Abb. 30). Auch die zusätzliche Aktivierung und Blockierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs weist auf keine signifikante Induktion oder Repression der *cirp*- und *cirp2*-Expression hin. Somit scheint *cirp* ein *Tcf3*-abhängiges Zielgen zu sein, das zumindest in neuralisierten animalen Kappen nicht durch die Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade reguliert wird.

5.5.5 Cirp-Konstrukte für Funktionsgewinn- und Funktionsverlust-Studien

Um die *cirp*-Funktion während der Embryonal-Entwicklung analysieren zu können, werden Werkzeuge für Funktionsgewinn- und Funktionsverlust-Studien benötigt.

Eine Voraussetzung für die Synthese rekombinanter mRNA ist die Klonierung des offenen Leserahmens in einen geeigneten Vektor. Dazu wurde *cirp* mit genspezifischen Primern aus der cDNA eines Embryos im Neurula-Stadium amplifiziert.

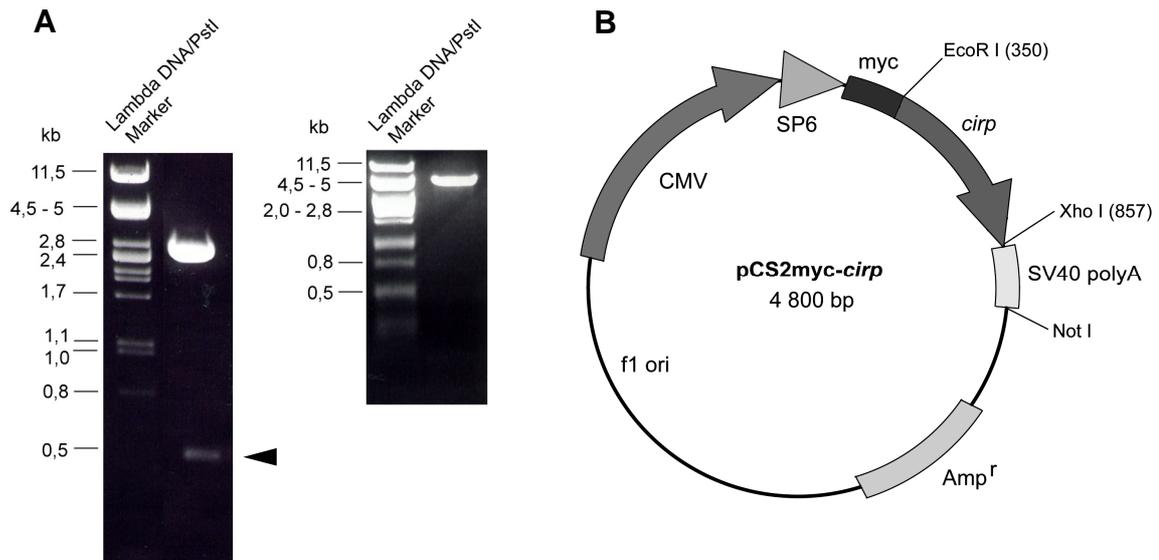


Abb. 31 Klonierung des *cirp*-ORF („open reading frame“, offener Leserahmen) in den Expressionsvektor pCS2myc.

A zeigt links das mit *EcoRI* und *XhoI* aus dem Klonierungsvektor ausgeschnittene Fragment der erwarteten Größe von 500 bp (schwarzer Pfeilkopf) und rechts die Linearisierung des Expressionsvektors pCS2myc mit *NotI* nach Insertion des *cirp*-ORF in der erwarteten Größe von ca. 4,8 kbp. **B** gibt die Orientierung im Expressionsvektor pCS2myc wieder.

Während der Primer am Translationsstart 5' zusätzliche Basen trägt, die für die Restriktionsschnittstelle *EcoRI* kodieren, fügt der Primer am Translationsende 3' eine *XhoI*-Schnittstelle ein. Mit Hilfe der bei der PCR entstehenden A-Überhänge wurde das *cirp*-Amplifikat zunächst in einen Klonierungsvektor ligiert und das Fragment mit einer erwarteten Größe von ca. 500 bp über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *XhoI* in den vorbereiteten Expressionsvektor mit einer Größe von 4,3 kbp umklont. Die Anordnung der Restriktionsschnittstellen wurde so gewählt, dass sich die für *cirp* kodierende cDNA mit den 5' gelegenen kodierenden Sequenzen des Expressionsvektors im gleichen Leserahmen befindet. Dadurch kann eine rekombinante *cirp*-mRNA synthetisiert werden, deren 5'-Bereich von Sequenzen eingeleitet wird, die für myc-Epitope kodieren, während am 3'-Ende eine für A-Überhänge kodierende Sequenz die mRNA stabilisiert (Abb. 31 B).

Gemäß der Sequenzierungsreaktion bestehen zwischen dem isolierten Klon und dem in der Datenbank veröffentlichten *cirp*-Gen zwei Basenpaar-Austausche. Diese haben zwei Aminosäuren-Austausche zur Folge.

Da die Aminosäure-Sequenz des isolierten Klons zu 98% mit Cirp und nur zu 88% mit Cirp2 identisch ist, kann man davon ausgehen, dass es sich um einen für das Cirp- und nicht das Cirp2-Protein kodierenden Klon handelt (Abb. 32).

Cirp isoliert	1	MSDEGKLFIGGLNFETNEDCLEQA ST KYGRISEVVVVKDRETKRSRGFGFVTFENVDDAKD
Cirp DatB	1	MSDEGKLFIGGLNFETNEDCLEQA F TKYGRISEVVVVKDRETKRSRGFGFVTFENVDDAKD
Cirp2 DatB	1	MSDEGKLFIGGLNF D TNE ES LEQ V F S KY Q I S EVVVVKDRETKRSRGFGFVTFEN P DDAKD
Cirp isoliert	62	AMMAMNGK S VDGRQIRVDQAGKSSGERRGGYRGGSSGGRGFFRGGGRGGGGDRGYGSSRFD
Cirp DatB	62	AMMAMNGK S VDGRQIRVDQAGKSSGERRGGYRGGSSGGRGFFRGGGRGGGGDRGYGSSRFD
Cirp2 DatB	62	AMMAMNGK A VDGRQIRVDQAGKSSG D RRGGYRGGSSGGRGFFRGGGRGGGGDRGYGSSRFD
Cirp isoliert	123	NRSGGYGGSSGSRDYYGSGRSQGSYGDRSGGSYRDSYDSY G THE
Cirp DatB	123	NRSGGYGGSSGSRDYYGSGRSQGSYGDRSGGSYRDSYDSY A THE
Cirp2 DatB	123	NRSGGYGGSSGSRDYY S SGRSQGSY D R A GGSYRDSYDSY A THE

Abb. 32 Sequenzvergleich zwischen dem isolierten Klon und Cirp (Zugangsnummer NP_001080069) sowie Cirp2 (NP_00107079794) entsprechend den Datenbank-Einträgen (DatB).

Die *in-vitro*-synthetisierte RNA dieses Klons lieferte nach Injektion in *Xenopus*-Embryonen mit ca. 28 kDa ein Protein der erwarteten Größe. Dieses konnte im Immun-Blot mit einem gegen das myc-Epitop gerichteten Antikörper detektiert werden (Abb. 33).

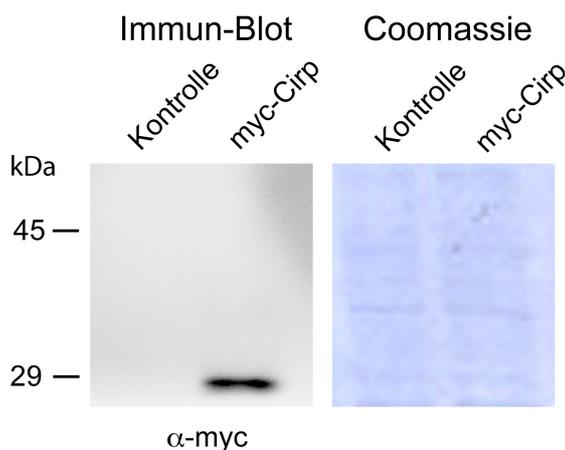


Abb. 33 Die injizierte *cirp*-mRNA wird in ein Protein der erwarteten Größe translatiert. Pro Spur wurden RIPA-Lysate aufgetragen, die der Proteinmenge eines halben Embryos im Stadium 13 entsprechen. Zur Kontrolle dient ein unbehandelter Embryo. Als Ladekontrolle dient das im SDS-PAGE aufgetrennte Gesamtprotein nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blue.

Um den Funktionsverlust von *cirp* untersuchen zu können, wurde ein antisense-Morpholino-Oligonukleotid konzipiert, das durch seine spezifische Bindung an die mRNA im Bereich des ATG die Translation blockiert. Durch die großen Übereinstimmungen in der Nukleinsäure-Sequenz ist es möglich einem Morpholino-Oligonukleotid, sowohl *cirp* als auch *cirp2* zu unterdrücken (Abb. 34 A). Auf diese Weise wird ausgeschlossen, dass *cirp2* einen Funktionsverlust von *cirp* kompensiert.

Das endogene Cirp ist als ein Protein mit der erwarteten Größe von 19 kDa im Immun-Blot mit einem Cirp-spezifischen Antikörper nachweisbar. Aufgrund der großen Übereinstimmungen in der Aminosäure-Sequenz ist anzunehmen, dass sowohl Cirp als auch Cirp2 detektiert werden (Abb. 34 B, α-Cirp). Nach Applikation von 2 pmol *cirp*-spezifischen antisense-Morpholino-Oligonukleotids in beide Blastomere eines Embryos im Zwei-Zellstadium ist das Signal der detektierten Cirp-Proteinbande reduziert.



Da maternales Cirp-Protein in *Xenopus*-Embryonen sehr abundant ist, führt die Morpholino-vermittelte Translationsblockade erst in frühen Neurula-Stadien zu einer im Immun-Blot nachweisbaren Reduktion. Andererseits wirkt sich eine höhere Gabe an *cirp*-Morpholino letal auf die Embryonen aus (Fichtner, Diplomarbeit 2007).

Durch Klonierung einerseits und die Konzipierung eines wirksamen antisense-Morpholino-Oligonukleotids andererseits wurden die Werkzeuge geschaffen, um durch Überexpression und partielles Ausschalten die Funktion von *cirp* in der frühen Embryonal-Entwicklung von *Xenopus laevis* zu untersuchen.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Menge an endogenem Cirp-Protein nach Depletion des Regulators *Tcf3* vermindert ist. Diese Reduktion kann durch Wiederherstellen der *Tcf3*-Funktion aufgehoben werden. Damit ist es gelungen, die *Tcf3*-abhängige *cirp*-Regulation nicht nur auf Ebene der Transkripte (Fichtner, Diplomarbeit 2007) sondern auch auf Proteinebene nachzuweisen (Abb. 34).

5.5.6 Funktionsverlust von *Cirp* und von *Tcf3* führt zu vergleichbaren Phänotypen

Sowohl die Kolo-kalisation als auch die *Tcf3*-gesteuerte *cirp*-Expression sprechen dafür, den *cirp*-Funktionsverlust mit einem besonderen Augenmerk auf die Ausbildung der Neuralplatte zu untersuchen. Dazu wurde das *cirp*-Morpholino in die animale Hemisphäre einer der beiden Blastomeren im Zwei-Zellstadium injiziert. Nachdem sich die Embryonen bis zum Neurula-Stadium entwickelt hatten, wurde die Expression verschiedener Markergene analysiert.

Eya1 (**e**yes **a**bsent-1) ist ein allgemeiner Plakodenmarker und wird in einem sichelförmigen ektodermalen Bereich benachbart zur Neuralplatte exprimiert (Schlosser und Ahrens, 2004). Die Neuralplatte selbst ist frei von *eya1*-Transkripten (Abb. 35).

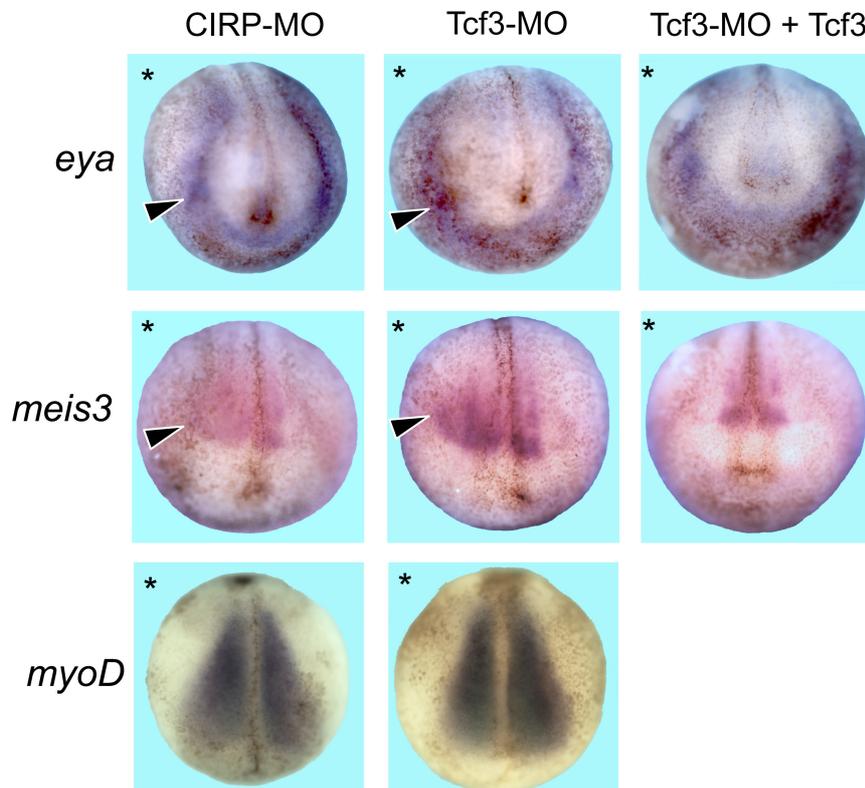


Abb. 35 Expression verschiedener Markergene in der Neurula nach *cirp*-Reduktion, nach *Tcf3*-Verminderung sowie nach Wiederherstellung der *Tcf3*-Funktion. Die angegebenen Transkripte (blau bzw. lila) wurden mittels Ganzkeimfärbung detektiert. Der schwarze Pfeilkopf markiert die laterale Verschiebung der angegebenen Transkripte.

Das Sternchen markiert die injizierte Seite. MO: Morpholino-Oligonukleotid.

Als Folge der *cirp*-Unterdrückung verschiebt sich die *eya1*-Expression lateral und die Neuralplatte ist in 13% der untersuchten Fälle expandiert (n = 38). Die Intensität der *eya1*-Färbung ist abgesehen von ihrer verschobenen Position aber nicht beeinträchtigt (Abb. 35).

Meis3 (myeloid ecotropic viral integration site 1-Homolog 3) wird in *Xenopus*-Embryonen besonders im Hinterhirn und im anterioren Rückenmark exprimiert (Salzberg et al., 1999). Da auch *Meis3* nach Blockierung der *cirp*-Translation bei 25% von 16 untersuchten Embryonen auf der injizierten Seite expandiert war (Abb. 35, mittlere Reihe links), scheint die laterale Ausdehnung nicht auf das anteriore Neuroektoderm beschränkt zu sein.

Die laterale Verbreiterung des Neuroektoderms ist nicht in einer fehlerhaften Anlage oder Musterung des Mesoderms begründet, denn das Muskel-spezifische Markergen *myoD* (myogenic differentiation) war nach Blockieren der *cirp*-Translation nicht verändert (0%, n = 8). Nach Blockierung der *Tcf3*-Translation war die Intensität der *myoD*-Färbung in 47% der Fälle (n = 15) geringfügig reduziert (Abb. 35, untere Reihe links). Diese geringfügigen Änderungen sind keine Form der Musterverschiebung. Stattdessen können sie durch die allgemeine Funktion, die *Tcf3* für die Mesoderm-Induktion spielt, erklärt werden (Liu et al., 2005).

Die Morpholino-vermittelte Unterdrückung der *Tcf3*-Translation führt mit höherer Penetranz als der *cirp*-Funktionsverlust zu vergleichbaren *eya1*- und *Meis3*-Phänotypen. So konnte die laterale Ausdehnung der Neuralplatte an *eya1*-gefärbten Embryonen in 62% aller Fälle (n = 34) beobachtet werden und bei 45% aller *Meis3*-Färbungen (n = 11) (Abb. 35, mittlere Spalte).

Damit ist die laterale Ausbreitung des Neuroektoderms, die das Mesoderm nicht beeinflusst, der vorherrschende Phänotyp animaler Depletion sowohl von *Tcf3* als auch von *Cirp*. Für die Spezifität dieses Phänotyps spricht die spezifische Wiederherstellung einer symmetrischen Neuralplatte. So kann die symmetrische Expression der Markergene *eya1* und *Meis3* nach *Tcf3*-Depletion durch die Koinjektion rekombinanter *Tcf3*-mRNA wiederhergestellt werden (Abb. 35, rechte Spalte). Von 24 untersuchten Embryonen zeigten nur noch 17% eine nach distal verschobene *eya1*-Expression, und das *Meis3*-Expressionsfeld ist nur bei 10% der untersuchten Embryonen (n = 20) verbreitert.

Die nach *Cirp*-Reduktion ermittelten Phänotypen sprechen für eine Verbreiterung der Neuralplatte, wie sie schon nach *Tcf3*-Depletion, nicht aber nach *Tcf4*-oder *Lef1*-Verminderung beobachtet werden konnte. Anhand des panneuralen Markergens *sox2* wurde die Wiederherstellung der *Tcf3*-Funktion einerseits und die Rekonstitution der *cirp*-Funktion andererseits untersucht. Während 72% der untersuchten Embryonen (n = 100) nach Morpholino-vermittelter *Tcf3*-Verminderung eine lateral ausgedehnte *sox2*-Expression aufweisen, sind es nach Koinjektion rekombinanter *Tcf3*-mRNA nur noch 51% (n = 140) (Abb. 36).

Der Phänotyp des verbreiterten *sox2*-Musters tritt nach *cirp*-Reduktion mit geringerer Penetranz auf (Abb. 36 B). So zeigten von 73 untersuchten Embryonen 53% eine *sox2*-Verbreiterung. Durch die Beigabe eines für *cirp*-kodierenden Expressionsvektors konnte

diese Expansion teilweise aufgehoben werden, so dass sie nur noch bei 30% der analysierten Embryonen (n = 23) auftrat (Abb. 36).

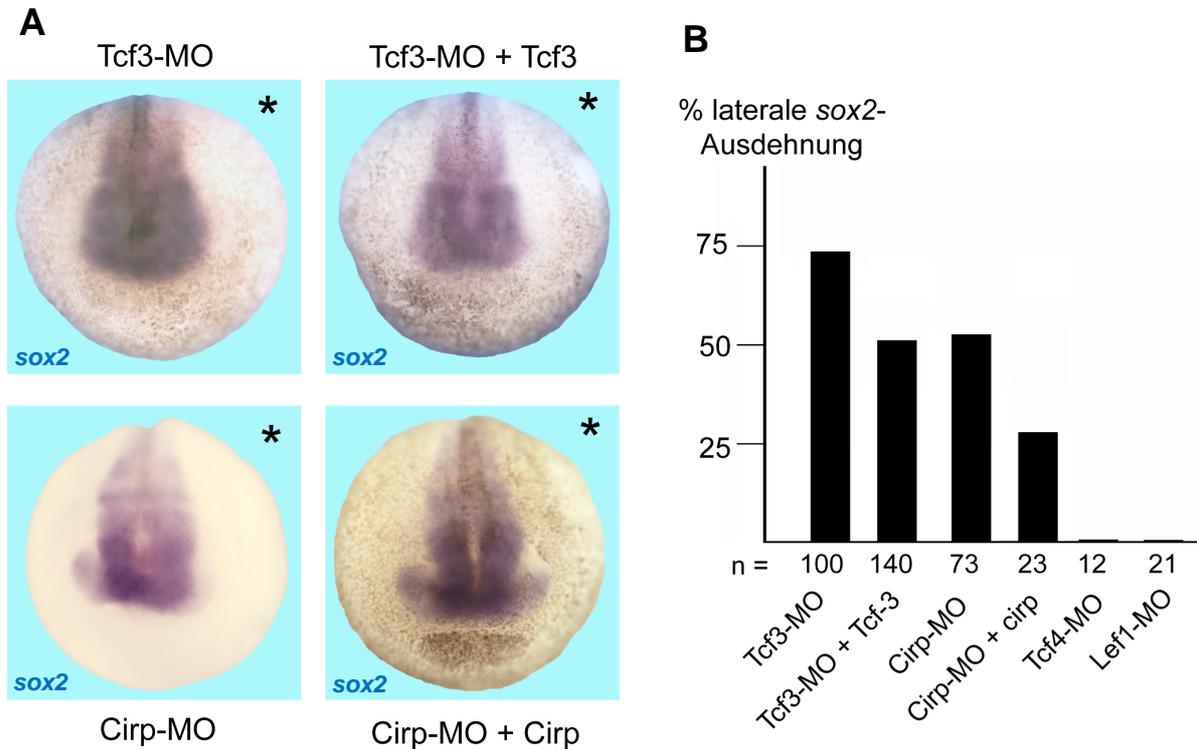


Abb. 36 **A** Sox2-Expression in der Neurula nach *cirp*-Reduktion, nach *Tcf3*-Verminderung (2 pmol) sowie nach Wiederherstellung der *Tcf3*- bzw. *cirp*-Funktion. Die Sox2-Transkripte (blau) wurden mittels Ganzkeimfärbung detektiert.

Das Sternchen markiert die injizierte Seite.

B Anteil der Embryonen mit sox2-Verbreiterung.

MO: Morpholino-Oligonukleotid.

Der Regulator *Tcf3* und sein Zielgen *cirp* können folglich spezifisch die Ausdehnung der Neuralplatte begrenzen. Diese einschränkende Wirkung ist vom endogenen *Tcf3* und *cirp* abhängig.

Durch Applikation rekombinanter *Tcf3*-mRNA kann die nach *Tcf3*-Verminderung hervorgerufene sox2-Verbreiterung aufgehoben werden. Des Weiteren ist die Rekonstitution der symmetrischen sox2-Expression im Fall einer *Cirp*-Reduktion durch *Cirp*-Überexpression möglich. Demgegenüber gelang es nicht, nach Behandlung im Zwei-Zellstadium die *Tcf3*-Morpholino vermittelte laterale Ausdehnung der sox2-Expression durch Beigabe des dem Transkriptionsfaktor *Tcf3* nachgeordneten *Cirp* signifikant aufzuheben (Abb. 37). Liegt der Anteil verbreiteter Embryonen nach *Tcf3*-Morpholino alleine bei rund 78%, so hat die zusätzliche Applikation rekombinanter *Cirp*-mRNA einen Anteil zwischen 61 und 83% zur Folge.

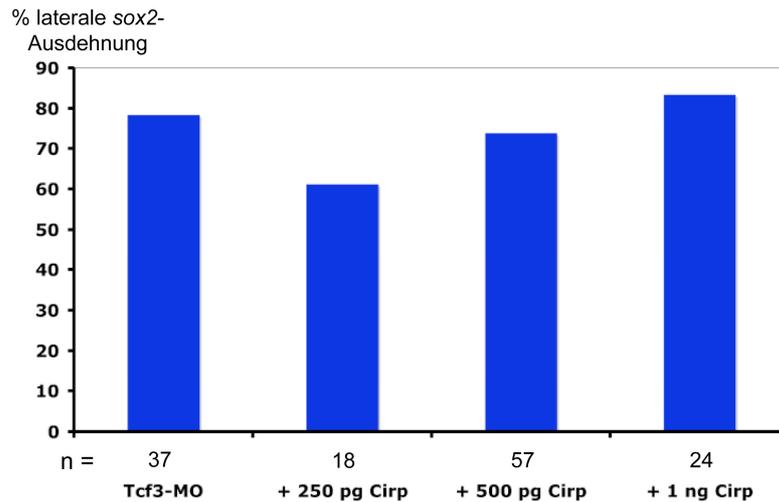


Abb. 37 Anteil der Embryonen in Prozent mit einer lateralen *sox2*-Ausdehnung in der Neurula nach *Tcf3*-Verminderung (4 pmol) sowie nach zusätzlich zunehmender *cirp*-Überexpression. Ergebnisse aus mehr als drei unabhängigen Versuchsreihen wurden zusammengefasst.

Auch die Einschränkung des von der *Tcf3*-Morpholino-Injektion betroffenen Gewebes auf die Abkömmlinge der dorsal-animale Blastomere eines Embryos im 16-Zell-Stadium führt bei 65% der untersuchten Embryonen auf der injizierten Seite zu einer signifikanten Verbreiterung der Neuralplatte (Abb. 38 A).

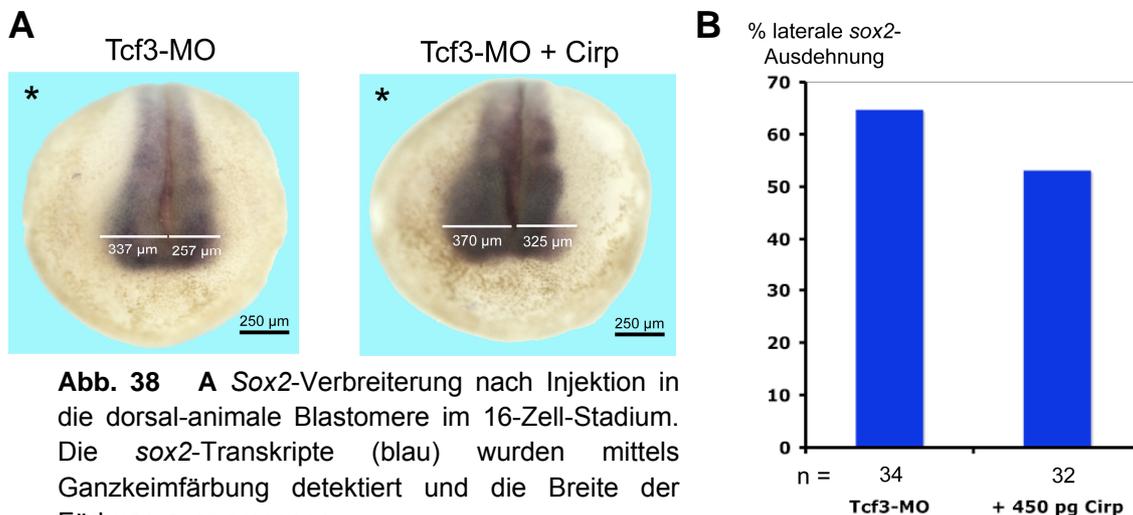


Abb. 38 A *Sox2*-Verbreiterung nach Injektion in die dorsal-animale Blastomere im 16-Zell-Stadium. Die *sox2*-Transkripte (blau) wurden mittels Ganzkeimfärbung detektiert und die Breite der Färbung ausgemessen. Das Sternchen markiert die injizierte Seite.

Das Sternchen markiert die injizierte Seite.

B Anteil der Embryonen in Prozent mit einer lateralen *sox2*-Ausdehnung in der Neurula nach *Tcf3*-Verminderung (1 pmol) sowie nach zusätzlicher *cirp*-Überexpression. Ergebnisse drei unabhängiger Versuchsreihen wurden zusammengefasst. Als Embryonen mit verbreitertem *sox2*-Expressionsmuster wurden solche ermittelt, deren gemessene Breite auf der injizierten Seite signifikant größer war als auf der nicht-injizierten Seite.

Trotz der gezielteren Behandlung damit einem Unterbinden der Einflüsse benachbarter Gewebe, konnte auch nach exaktem Ausmessen in diesem Fall keine signifikante Rekonstitution nach Tcf3-Verminderung durch rekombinante Cirp-Beigabe erzielt werden (Abb. 38). Der Anteil der Embryonen mit einer durch die *sox2*-Transkripte markierten Neuralplatten-Verbreiterung liegt danach bei 53%.

Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis darauf sein, dass die Mechanismen, die für die spezifische Einschränkung des Neuralplatten-Schicksals verantwortlich sind, in Abwesenheit des Regulators Tcf3 nicht allein durch das nachgeordnete Cirp vermittelt werden können.

5.6 Cirp-Funktion

5.6.1 Endogenes Cirp ist nicht für die konvergente Extension erforderlich

Da induktive Ereignisse nicht für die *sox2*-Verbreiterung verantwortlich scheinen, wird im Folgenden untersucht, ob morphogenetische Bewegungen oder die Proliferation verändert sind. Als zuverlässiger und sensitiver Testansatz zur Ermittlung von Störungen in morphogenetischen Bewegungen vor allem der konvergenten Extension dienen Explantate der dorsalen Marginalzone, sogenannte Keller-Explantate (Keller, 2002).

Während der Gastrulation und Neurulation finden im *Xenopus*-Embryo Zellbewegungen statt, die ihn entlang seiner antero-posterioren Achse verlängern. Da diese Extension der Körperachse mit dem Zusammenrücken der Zellen einer Zellpopulation (Konvergenz) in Richtung des Medians einhergeht, spricht man von konvergenter Extension. Diese Wanderungsbewegung findet im dorsalen Mesoderm und darüber liegenden Neuroektoderm statt (Keller, 2002).

Als Folge einer beeinträchtigten konvergenten Zellbewegung kann es zu einer lateral verbreiterten *sox2*-Expression kommen (Unterseher et al., 2004). Daher wurde untersucht, ob der nach *cirp*-Depletion beobachtete *sox2*-Phänotyp auf eine veränderte konvergente Extension zurückzuführen ist. Dazu wird aus Gastrula-Embryonen das Gewebe oberhalb der dorsalen Blastoporuslippe explantiert. Diese dorsale Marginalzone umfasst den Spemann-Organisator und das zukünftige dorsale Mesoderm.

Die Zellen der einwandernden Marginalzone bewegen sich gemäß der konvergenten Extension. Dieser Vorgang kann nach der Gewebeentnahme und der Fixierung der Explantate unterhalb eines Deckglases in einer Ebene beobachtet werden. Nach ihrem Erfinder werden sie Keller-Explantate genannt (Keller, 1991).

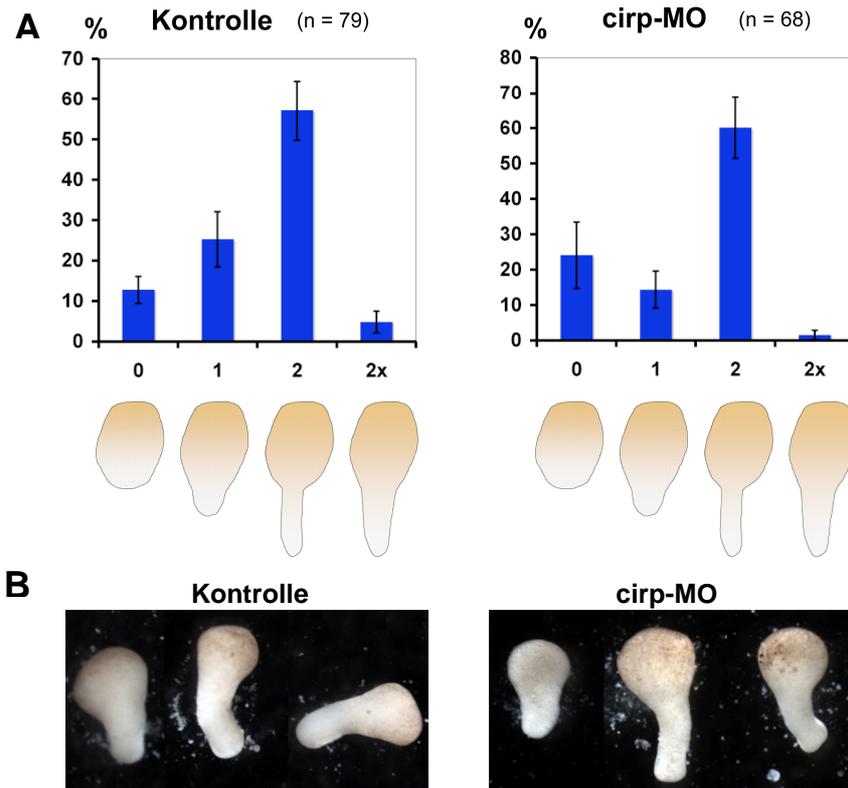


Abb. 39 Konvergente Extension in Kontroll-Keller-Explantaten und in *cirp*-depletierten Keller-Explantaten. **A** Explantate aus fünf unabhängigen Experimenten wurden auf ihre Extension (0 und 1, keine Extension; 2 und 2x, Extension) und Konvergenz (2 konvergiert; 2x nicht konvergiert) untersucht. (Einteilung nach Unterseher et al., 2004) **B** Je ein nicht-elongiertes (links) und zwei elongierte Explantate (Mitte und rechts).

Es konnten keine signifikanten Unterschiede ($\alpha > 0,33$) zwischen Keller-Explantaten aus unbehandelten und CIRP-Morpholino-injizierten Embryonen festgestellt werden (Abb. 39). Es traten bei beiden Gruppen vergleichbar viele elongierte Explantate auf (Phänotypen 2 und 2x). Auch hinsichtlich der Konvergenz wurden analoge Anteile an konvergierenden (Phänotyp 2) und nicht konvergierenden (Phänotyp 2x) Explantaten beobachtet.

Folglich kann die laterale Verbreiterung der Neuralplatte nach *cirp*-Reduktion nicht auf einer unvollständigen konvergenten Extension beruhen.

5.6.2 Endogenes Cirp wird für die Proliferation benötigt

Neben Zellbewegungen kann auch das Maß an proliferierenden Zellen Auswirkungen auf die Ausdehnung eines Gewebes haben. Daher wurde untersucht, welchen Einfluss die Morpholino-vermittelte *cirp*-Verminderung auf die Proliferation hat.

Dazu wurden mit Hilfe eines gegen phosphoryliertes Histon 3 (pH3) gerichteten Antikörpers gezielt mitotische Zellen im Gewebe fixierter Embryonen in transversalen Gefrierschnitten im Stadium 18 detektiert (Abb. 40). Es wurden einseitig mit *cirp*-Morpholino behandelte

Embryonen herangezogen. Die injizierte Seite wurde durch Beigabe einer für grün-fluoreszierendes Protein kodierenden mRNA detektiert.

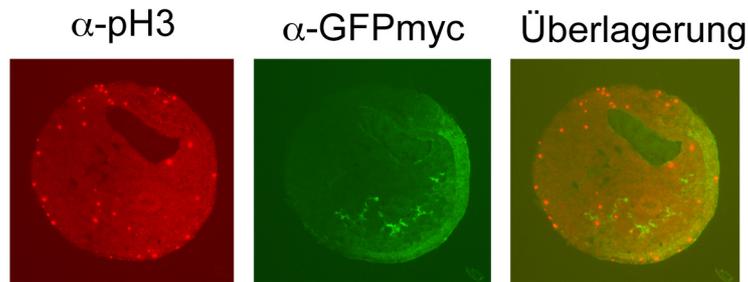


Abb. 40 Proliferation in Embryonen im Stadium 18. Mit einem gegen pH3 gerichteten Antikörper wurden mitotische Zellen in Transversalschnitten detektiert und durch den gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff visualisiert. Anhand der myc-Epitope wurde das grün-fluoreszierende Protein (GFP) nachgewiesen und die injizierte Seite bestimmt.

Nach Auszählen von 1081 Kernen an 31 Schnitten konnte auf der injizierten Seite eine verminderte Proliferation im Vergleich zur unbehandelten Körperseite ermittelt werden. So befanden sich nach *cirp*-Depletion im Vergleich zur unbehandelten Seite nur $81,27 \pm 4,31\%$ der untersuchten Zellen in der Teilung.

Folglich scheint endogenes *cirp* während des untersuchten Stadiums der Neurulation für die Proliferation notwendig zu sein. Allerdings ist die Proliferationsanalyse keinem bestimmten Gewebe zugeordnet und es können keine Aussagen zur Steuerung der Proliferation in früheren Stadien gemacht werden.

5.6.3 Endogenes Cirp stabilisiert mRNAs

Ein Mechanismus mit dessen Hilfe Cirp auf verschiedenen Ebenen in das Zellschicksal regulierend eingreifen könnte, ist die translationale mRNA-Kontrolle. Für Cirp2 konnte gezeigt werden, dass es in Oozyten die Deadenylierung spezifischer mRNAs inhibiert, wodurch es an der Regulation der mRNA-Stabilität beteiligt sein könnte (Aoki et al., 2003).

Um zu untersuchen, ob die beiden Cirp-Varianten auch während der Embryonal-Entwicklung für die mRNA-Stabilität von Bedeutung sind, wurde der RNA-Pool unbehandelter Embryonen in der Neurula mit dem CIRP-depletierter Neurulae verglichen.

Dazu wurde die Gesamt-RNA aus je zwölf Embryonen isoliert und mit Hilfe eines Oligo-dT-Primers einerseits und mit einem zufällig zusammengesetzten Hexamer-Primergemisch (Random Primer) andererseits in cDNA umgeschrieben.

Da der Oligo-dT-Primer ausschließlich mit einer Abfolge von Adeninen hybridisiert, wird davon ausgegangen, dass vorwiegend mRNA in cDNA umgeschrieben wird. Das Zufalls-Hexamere-Primergemisch sollte dagegen nicht zwischen den RNA-Spezies diskriminieren und aus allen cDNA synthetisieren.

Um die cDNA-Produkte detektieren zu können, wurden für den Einbau radioaktiv-markierte [^{32}P]- α -dCTPs angeboten. Durch Auftrennung in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel konnte für jede cDNA-Synthese der Einbau im Vergleich zu den freien [^{32}P]- α -dCTPs normiert werden (Abb. 41 A). Anschließend wurde anhand der gemessenen Signalintensitäten das Verhältnis von mRNA-spezifischer cDNA zu Gesamt-RNA-Transkripten gebildet. Im Vergleich CIRP-depletierter Embryonen mit unbehandelten Embryonen ließ sich eine Verringerung des mRNA-Pools um 10-13% ermitteln (Abb. 41 B).

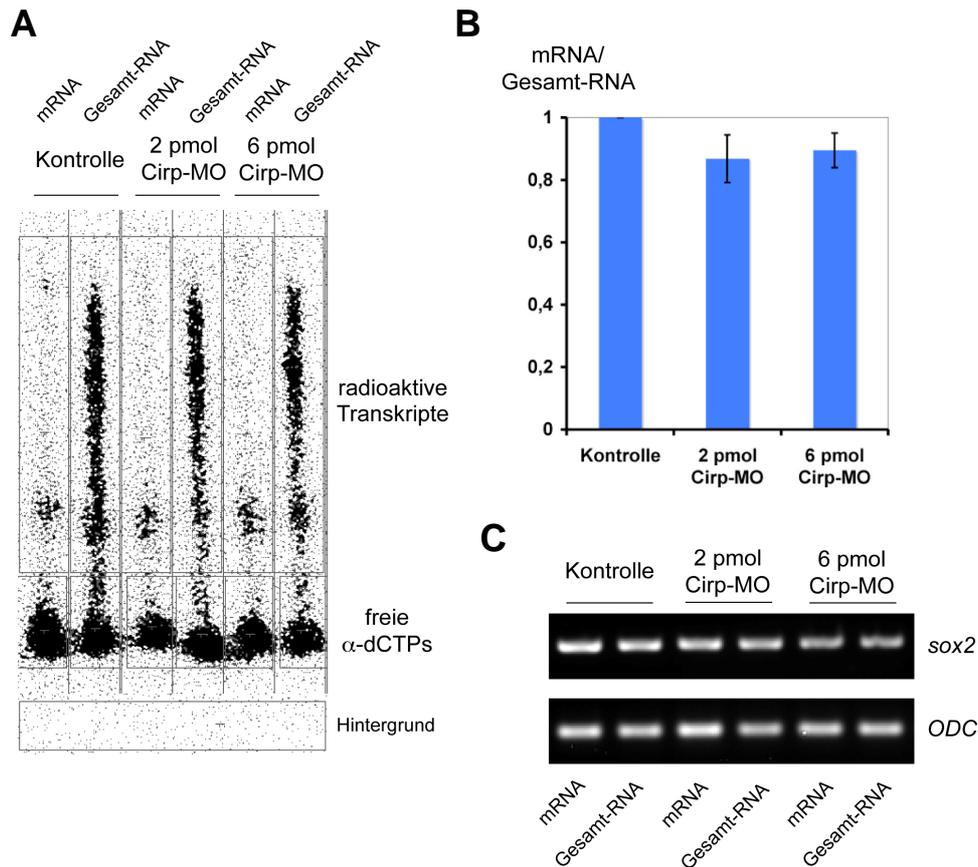


Abb. 41 Untersuchung der mRNA-Stabilität nach CIRP-Funktionsverlust.

A Detektion radioaktiver Transkripte nach Umschreiben mit oligo-dT-Primer (mRNA) einerseits und Random Primer (Gesamt-RNA) andererseits. Die Menge an freien [^{32}P]- α -dCTPs wird zur Normierung herangezogen. Die Transkripte wurden in einem 3,5%igen Harnstoff-Gel aufgetrennt und die radioaktiven Signale im Imager detektiert.

B Die Verhältnisse mRNA zu Gesamt-RNA von unbehandelten Embryonen (Kontrolle) und von Embryonen nach CIRP-Translationsblockade.

2 und 6 pmol CIRP-MO wurden im Zwei-Zellstadium in die animale Hemisphäre beider Blastomere injiziert. Als Kontrolle dienen Embryonen, die nicht injiziert wurden. Alle Embryonen wurden bis zum Stadium 18 kultiviert, die Gesamt-RNA aus je 12 Embryonen revers transkribiert und die angegebenen Gene amplifiziert.

Das Haushaltsgen *ODC* (ornithine decarboxylase) dient der Ladekontrolle.

C *Sox2*-Transkripte sind nach CIRP-Depletion verringert.

MO: Morpholino-Oligonukleotid.

Diese Verringerung wurde in drei unabhängigen Experimenten verifiziert. Dabei war in jedem Ansatz das Verhältnis von mRNA zu Gesamt-RNA nach CIRP-Depletion geringer als im Kontrollansatz. Diese messbaren Änderungen in der mRNA-Menge lassen sich nicht allein auf eine verringerte Stabilität bekannter CIRP-Ziel-mRNAs zurückführen. Erst die Destabilisierung zahlreicher unterschiedlicher polyadenylierter mRNAs kann eine Abnahme um 10% erklären. Dies gilt umso mehr, als die injizierten Mengen an *cirp*-Morpholino die *cirp*-Translation nur partiell unterdrückten, so dass in Embryonen noch nachweisbare Mengen an Cirp-Protein vorhanden waren.

Eine Analyse der isolierten Gesamt-RNA nach klassischer cDNA-Synthese und Amplifikation mit genspezifischen Primern zeigt interessanterweise, dass *sox2* zu den Transkripten gehört, deren Menge nach CIRP-Depletion vermindert ist (Abb. 41 C).

Eine verminderte *sox2*-Expression im posterioren Bereich der Neuralplatte wurde nach CIRP-Depletion auch durch Ganzkeimfärbung an Embryonen im Stadium 15 ermittelt. Diese posteriore Verminderung trat bei 22% der untersuchten Embryonen (n = 73) auf und ging bei 12% mit einer anterioren lateralen Verbreiterung einher (Fichtner, Diplomarbeit 2007).

Die laterale Ausdehnung des *sox2*-Expressionsmusters nach CIRP-Depletion könnte folglich auf der Verringerung von mRNAs beruhen, die das *sox2*-Expressionsfeld direkt oder indirekt einschränken.

6 Diskussion

6.1 Phänotypische Auswirkung der Tcf3-Depletion

In der vorliegenden Arbeit wurden die spezifischen Eigenschaften der individuellen Lef/Tcf-Transkriptionsfaktoren mit einem besonderen Augenmerk auf ihre Rolle in der Neuralentwicklung von *Xenopus*-Embryonen untersucht.

Interessanterweise führt die anti-sense-Morpholino vermittelte Depletion des Transkriptionsfaktors Tcf3 am animalen Pol, nicht jedoch die der beiden verwandten Familienmitglieder Tcf4 oder Lef1 zu einer lateralen Ausdehnung der Neuralplatte im Neurula-Embryo. Der beobachtete Phänotyp liefert einen Hinweis auf die endogene Tcf3-Funktion in der frühen Neuralentwicklung, auf deren Hintergrund die im subtraktiven Screen identifizierten Tcf3-Zielgene zu verstehen und einzuordnen sind.

Funktion von Tcf3 bei der Stabilisierung des Neuralschicksals

Eingriffe in die Funktion von Genen, welche nach Moody und Je (2002) an der Stabilisierung des Neuralschicksals beteiligt sind, können in Neurula-Embryonen einen Phänotyp hervorrufen, wie er auch nach der Morpholino-vermittelten Tcf3-Depletion beobachtet werden konnte. Insofern könnte auch Tcf3 auf der Stabilisierungsebene eine wesentliche Funktion ausüben, und damit im zweiten Schritt der nach dem Modell von Stern in insgesamt drei Schritten vollzogenen Konstitution des Neuralschicksals eine Rolle spielen (Stern et al., 2006). Neben dem zweiten Etablierungsschritt – der Stabilisierung des prä-neuralen Zustandes in der Gastrula – kommen grundsätzlich als Ursachen für ein gestörtes Neuralschicksal auch der erste und dritte Schritt in Frage. Während der erste Schritt die instabile Induktion des prä-neuralen Zustandes in der Blastula beschreibt, modifiziert der dritte im Verlauf der Gastrula einsetzende Schritt das Vorderhirn-Schicksal zu einem zunehmend posterioren Charakter.

Die instabile Induktion des prä-neuralen Status wird im *Xenopus*-Embryo wahrscheinlich durch das in der Blastula Chordin und Noggin sezernierende Zentrum (BCNE) vermittelt. Die Etablierung dieses Zentrums ist β -Catenin abhängig (Heasman et al., 2000; Wessely et al., 2001; Hikasa und Sokol, 2004). Applikation eines dominant-negativen Tcf3-Proteins, dem aufgrund N-terminaler Trunkierung die β -Catenin-Bindungsdomäne fehlt, unterdrückt in der Blastula die das BCNE-Zentrum kennzeichnende und durch β -Catenin aktivierte *Chordin*- und *Noggin*-Expression sowie die der Organisator-Gene *folistatin* und *Xnr-3* (Wessely et al., 2001). Dabei wirkt das dominant-negative Tcf3 als kompetitiver Antagonist aller LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren, was wiederum zeigt, dass die LEF/TCFs als Vermittler des β -Catenin-Signals für die Errichtung des BCNE notwendig sind.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Morpholino-vermittelte Tcf3-Translationsblockade am animalen Pol scheint dagegen keinen Einfluss auf die β -Catenin-abhängige Etablierung des BMP-Antagonisten sezernierenden BCNE-Zentrums zu haben, das bereits früh die Grundlage für eine neurale Entwicklung legt. Dies könnte darin begründet sein, dass die Morpholino-vermittelte TCF-Translationsblockade im *Xenopus*-Embryo erst zu einem späteren Entwicklungsstadium wirksam greift (Liu et al., 2005). Folglich kann die Neuralinduktion im zukünftigen Neuroektoderm trotz Morpholino-vermittelter Tcf3-Depletion weitgehend ungestört ablaufen, was sich in der die Neuralplatte umfassenden Expression panneuraler Markergene wie *sox2* äußert. Applikation eines N-terminal trunkierten Tcf3-Proteins führt dagegen als Folge der eingeschränkten BCNE-Funktion bereits in der Gastrula zur Repression der *sox2*-Expression (Wessely et al., 2001).

Die Tcf3-Depletion scheint auch nicht auf den dritten Schritt zur Konstitution des Neuralschicksals einzuwirken. Der die Neuralplatte verbreiternde Effekt der antisense-Morpholino vermittelten Tcf3-Depletion ist vorwiegend im anterioren Bereich zu beobachten und beeinträchtigt scheinbar nicht die antero-posteriore Musterung. Experimente in neural-induzierten animalen Kappen zeigten, dass trotz der Morpholino-vermittelten Verminderung von Tcf3 anteriore neurale Markergene wie *Xanf* und *Xotx2* exprimiert werden. Gleichzeitig induziert das Fehlen von Tcf3 keine posterioren Markergene wie *krox-20* und *hoxB9* (van Venrooy, Diplomarbeit 2004), wie man es in neuralisierten animalen Kappen nach Applikation ansteigender Mengen eines transformierenden Faktors wie *fgf8* oder *Xwnt8* (Kiecker und Niehrs, 2001) beobachten kann.

Da als Folge der Applikation des Tcf3-Morpholinos weder die basale Neuralinduktion noch die unter anderem durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg vermittelte Transformation zu einem posterioren Neuralschicksal beeinträchtigt sind, kommt als verbleibende Ursache der Neuralplatten-Verbreiterung eine Modulation des stabilisierenden Schritts in Frage.

Unter den bekannten das Neuralschicksal im Neuroektoderm stabilisierenden Genen, sind solche wie *sox*- und *zic* (*zinc finger protein of the cerebellum*)-Gene. Beide modulieren die Kompetenz des prospektiven Neuroektoderms, auf Signale wie BMP zu reagieren. Interessanterweise kann eine Verbreiterung der durch *sox2*-Transkripte gekennzeichneten Neuralplatte nach *zic1*-Depletion beobachtet werden (Hong und Saint-Jeannet, 2007), während *zic1*-Überexpression in animalen Kappen die *Noggin*-vermittelte Neuralinduktion verstärkt (Kuo et al., 1998).

Andere Gene halten neuroektodermale Zellen in einem auf ein neurales Schicksal festgelegten Zustand während sie wie *geminin* ihre proliferative Kapazität aufrechterhalten (Kroll et al., 1998; Seo und Kroll, 2006) oder wie *foxD5a* (*forkhead box D5a*) ihre Differenzierung inhibieren (Sullivan et al., 2001). Auch diese beiden an der Stabilisierung des Neuroektoderms beteiligten Gene haben einen Einfluss auf die Begrenzung der Neuralplatte.

So hat die Überexpression von *foxD5a* eine Verbreiterung der Neuralplatte zur Folge (Sullivan et al., 2001), während dafür im Fall von *geminin* die Depletion des antagonistisch wirkenden, die Neurogenese fördernden *Brg1* (**B**rahma **r**elated **g**ene **1**) verantwortlich ist (Seo et al., 2005b). Interessanterweise scheint die nach *foxD5a*-Überexpression beobachtete Verbreiterung der Neuralplatte keine Folge erhöhter Proliferation zu sein (Sullivan et al., 2001). Stattdessen postulieren die Autoren, dass die Neuralplatten-Expansion die Folge eines vergrößerten Pools von Neuralplatten-Vorläuferzellen und damit einer größeren Zahl sich differenzierender Neuronen sei.

Weitere Ursachen für eine Expansion der Neuralplatte können in der Ausdehnung des Neuralgewebes auf Kosten des benachbarten Gewebes begründet sein. Depletion des transkriptionellen Repressors REST/NRSF (**RE-1 Silencer of Transcription/Neural Restrictive Silencer Factor**) hat eine laterale Ausdehnung der Neuralplatte auf Kosten der benachbarten Neuralleisten und Epidermis zur Folge (Olguin et al., 2006). Auch die Morpholino-vermittelte Zic1-Depletion führt zu einer expandierten Neuralplatte, die mit der Verminderung sowohl von Neuralleisten als auch von Prä-Plakoden-Ektoderm einhergeht (Hong und Saint-Jeannet, 2007).

Eine mit der Expansion der Neuralplatte einhergehende Repression der das Prä-Plakoden-Ektoderm kennzeichnenden *six1*-Expression konnte auch nach Applikation eines N-terminal trunkeierten Tcf3-Proteins beobachtet werden (Heeg-Truesdell und LaBonne, 2006). Dagegen war die Menge an *eya1*-Transkripten, deren Verteilung ebenfalls das Prä-Plakoden-Ektoderm markiert, in der vorliegenden Arbeit nach Morpholino-vermittelter Depletion des endogenen Tcf3 nicht reprimiert. Stattdessen war das die vergrößerte Neuralplatte umgebende *eya1*-Expressionsfeld lateral verschoben.

Der stabilisierende Schritt wird im Neuroektoderm wahrscheinlich durch Signale aus dem benachbarten Prächordal- und Chorda-Mesoderm vermittelt (Stern et al., 2006). Als vermittelnde Moleküle kommen BMP-Inhibitoren wie Chordin und Noggin in Frage, deren Expression zumindest für die anteriore Neuralinduktion wesentlich zu sein scheint (Kuroda et al., 2004). Damit besteht zwar die Idee eines Netzwerks der neuralen Regulation, in dem BMP-Inhibitoren die Expression der die proliferierenden neuralen Vorläufer kennzeichnenden Gene wie *sox2* und *soxD* induzieren (Heasman, 2006), die Frage der mechanistischen Natur der Stabilisierung ist jedoch auf Zellebene noch weitgehend ungeklärt.

Mögliche Hinweise auf die Vorgänge, die den stabilisierenden Schritt in den neuroektodermalen Zellen charakterisieren, könnten sich aus der Betrachtung der TCF-Subtyp-spezifischen Zielgene ergeben (Abb. 42). In ihrer Zusammensetzung spiegelt sich ein Teil der individuellen regulativen Eigenschaften von Tcf3 einerseits und Tcf4 andererseits wieder.

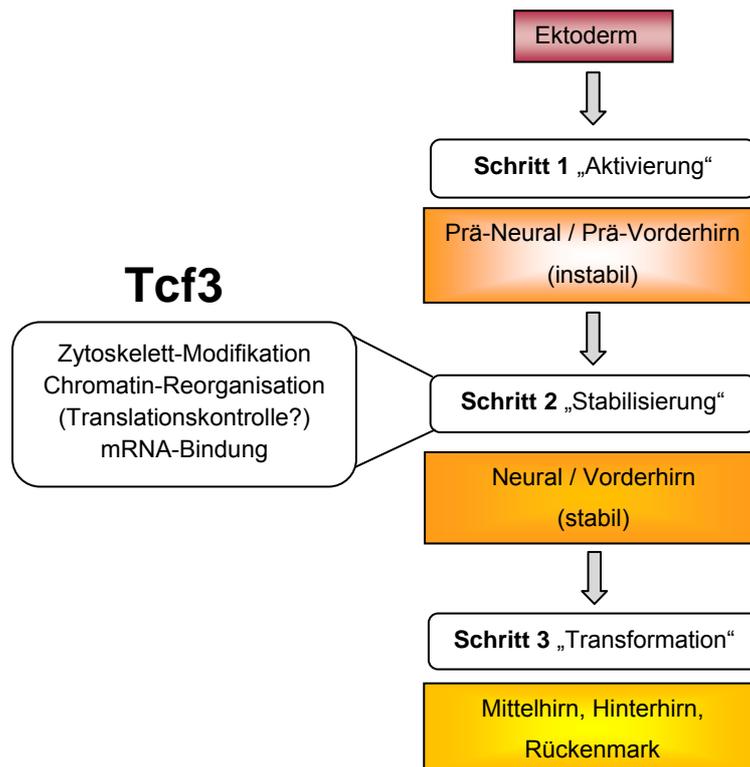


Abb. 42 Einordnung der *Tcf3*-Ziele in das Drei-Schritt-Modell nach Stern (Stern et al., 2006). Zytoskelett-Modifikation, Chromatin-Reorganisation und posttranskriptionelle Genregulation durch mRNA-Bindung könnten die mechanistischen Grundlagen des stabilisierenden Schritts bei der Konstitution des Neuralschicksals sein.

6.2 *Tcf3* und *Tcf4* haben Subtyp-spezifische Zielgene

Als *TCF*-Subtyp-spezifische Zielgene konnten solche identifiziert werden, die so unterschiedlichen Klassen angehören wie Zementdrüsen-spezifischen, DNA-bindenden oder RNA-bindenden Proteinen. Andererseits konnten keine klassischen Transkriptionsfaktoren als *TCF*-Subtyp-spezifische Ziele ermittelt werden.

Des Weiteren unterscheiden sich die Zielgen-Kandidatengruppen zwischen *Tcf3* und *Tcf4* hinsichtlich ihrer Vielfalt und Aussagekraft. Während 159 *Tcf3*-Zielgenkandidaten-Klone für 48 verschiedene Gene kodieren, waren es nur 35 unter den 49 *Tcf4*-Zielgenkandidaten-Klonen, die nicht als *EF1α* identifiziert wurden. Darüber hinaus wurden sechs von elf *Tcf3*-Zielen verifiziert, während unter den sieben *Tcf4*-Zielen nur zwei verifiziert werden konnten. Dies könnte in der Tatsache begründet sein, dass im Fall der *Tcf4*-Zielgen-Kandidatengruppe wegen der großen Abundanz an *EF1α* auch Klone der etwas unsicheren Kategorie II herangezogen werden mussten.

Zu den sicher identifizierten *Tcf3*-Zielen gehören *cirp*, *xag2*, *hmg1* und NM_01096142. Während *xag* und *hmg2* nur mit Einschränkung als verifiziert gelten können. Das einzige sichere *Tcf4*-Ziel ist *xk70*. *Hmg-x* kann dagegen nur mit Einschränkung als *Tcf4*-Ziel bezeichnet werden. Putative *Tcf3*-Zielgene, deren Regulation nicht den Erwartungen

entsprach und die wie *rps2e* nicht verifiziert werden konnten oder wie *gfpt1* und *ywhaq* gar verworfen werden mussten, weisen eine Regulation auf, die dem generellen Verhalten direkter LEF/TCF-aktivierter Zielgene entspricht (Pukrop et al., 2001; Gradl et al., 2002). Diese *Tcf3*-Zielgene sind entgegen der erwarteten Aktivierung durch *Tcf3* durch *Tcf4*-Überexpression deutlicher aktivierbar als durch *Tcf3*-Überexpression.

Möglicherweise liegt die insgesamt ungleichmäßige Zusammensetzung der Zielgen-Kandidatengruppen darin begründet, dass *Tcf3* gegenüber *Tcf4* der abundantere Transkriptionsfaktor ist. So ist die *Tcf3*-Expression bereits maternal durch *in-situ*-Hybridisierung nachweisbar (Molenaar et al., 1998), während *Tcf4*-Transkripte in der Ganzkeimfärbung erst mit der einsetzenden Neurula detektiert werden können (König et al., 2000; vorliegende Arbeit). In der Neurula spiegelt sich das ungleiche Verhältnis der TCF-Transkripte durch die im Vergleich zur panneuralen *Tcf3*-Expression auf das zukünftige Mittelhirn beschränkte *Tcf4*-mRNA-Verteilung wieder. Auch in neuralisierten animalen Kappen sind mehr *Tcf3*- als *Tcf4*-Transkripte nachweisbar. Folglich könnte ein größerer Satz an Genen im Neuroektoderm vom zeitlich und räumlich vorherrschenden Transkriptionsfaktor *Tcf3* abhängig sein.

Andererseits könnte der Unterschied in den beiden Zielgen-Kandidatengruppen auch auf der Tatsache fußen, dass die *Tcf4*-Depletion in der frühen Neurula weitgehend folgenlos bleibt und erst in Schwanzknospen-Stadien zu einer verminderten Proliferation im Mittelhirn führt (Kunz et al., 2004). Demgegenüber äußert sich der Verlust von *Tcf3* während der Neurula in einer TCF-Subtyp-spezifischen lateralen Verbreiterung der Neuralplatte, die auf eine modulierte Stabilisierung des Neuralschicksals zurückzuführen sein könnte.

Auch die Tatsache, dass unter den *Tcf4*-Zielen keine Gene identifiziert werden konnten, die das enge *Tcf4*-spezifische Expressionsmuster im Mittelhirn widerspiegeln, spricht für die insgesamt geringere Aussagekraft der putativen *Tcf4*-Ziele.

Trotz des neuralisierten Grundzustandes der als Ausgangsbasis verwendeten animalen Kappen wurden in keiner der beiden cDNA-Bibliotheken neurale Gene identifiziert, die wie *sox2* oder *NCAM* als neurale Differenzierungsmarker Verwendung finden. Stattdessen konnten epidermale Markergene identifiziert werden, was möglicherweise auf der Tatsache beruht, dass die Festlegung animaler Kappenzellen auf das epidermale Zellschicksal bereits im späten Blastula-Stadium erfolgt (Atsuchi und Shiokawa, 1991). Das neurale Schicksal könnte dagegen im instabilen Prä-Zustand noch von stabilisierenden Signalen abhängen. Diese Idee könnte durch die Beobachtung gestützt werden, dass die Expression des panneuralen Markergens *NCAM* in neuralisierten animalen Kappen nach Translationsblockade sowohl von *Tcf3* als auch von *Tcf4* gegenüber dem neuralisierten Grundzustand vermindert ist. Wobei die Morpholino-vermittelte *Tcf3*-Reduktion zu einer deutlicheren Repression führt als die von *Tcf4* (van Venrooy, Diplomarbeit 2004).

6.2.1 Zytoskelett-assoziierte Zielgene

Die häufigsten putativen Tcf3-Ziele gehören dem Zytoskelett an. Neben *α -Tubulin* sind vorwiegend Keratine vertreten. Interessanterweise stellen sie neben den Zementdrüsen-spezifisch exprimierten Genen innerhalb der beiden Zielgenkandidaten-Gruppen die einzigen bekannten Differenzierungsmarker dar.

Die Tatsache, dass abgesehen von *xk70* im *Tcf4*-Zielgenpool keine Keratine nachgewiesen wurden, könnte darin begründet sein, dass *Tcf3* eher als *Tcf4* eine Rolle bei der Entwicklung von epidermalen Epithelien spielt. So wird *XTcf3* in Neurulae in der sensorischen Schicht des Neuroektoderms exprimiert (Molenaar et al., 1998), in der auch die Vorläufer Cilien-tragender Zellen ihren Ursprung haben (Deblandre et al., 1999). Diese Vorläufer sind bereits von der frühen Neurula an durch ihre zahlreichen Zentriolen nachweisbar und wandern schließlich in die äußere Schicht der Epidermis, wo sie ab der späten Neurula als ausgereifte Cilien-tragende Zellen angesiedelt sind (Deblandre et al., 1999). Neben *α -Tubulin*, dessen Expression die Cilien-tragenden Zellen kennzeichnet (Deblandre et al., 1999; Pollet et al., 2005), gehört auch *xeel*, das in Cilien-freien Zellen exprimiert wird (Nagata et al., 2003), zu den *Tcf3*-Zielgen-Kandidaten.

Die als häufige putative *Tcf3*-Ziele identifizierten Keratine bilden das hauptsächliche Netzwerk intermediärer Filamente in Epithel-Zellen. Die maternale Depletion des in *Xenopus*-Oozyten und frühen Embryonen am weitesten verbreiteten Cytokeratins *XCK1(8)* in den kortikalen Zellen führt in der Blastula zum Verlust der kompakten Epithel-Oberfläche (Torpey et al., 1992). *XCK1(8)* entspricht dem in der *Tcf3*-Zielgenkandidaten-Gruppe am häufigsten identifizierten Keratin NM_001087056. Damit könnte *Tcf3* bedeutender als *Tcf4* für die strukturelle Integrität der sich in der Embryogenese entwickelnden Epidermis sein.

Eine differentielle Regulation von Keratinen konnte in animalen Kappenzellen als Folge einer das Zementdrüsen-Schicksal induzierenden Behandlung mit NH_4Cl gezeigt werden (LaFlamme und Dawid, 1990). Dabei wird die Expression von *Xk endo B* (das dem putativen *Tcf3*-Zielgen *Krt18* entspricht) induziert, während sich die *xk70*-Expression nur wenig verändert. Die Sonderstellung von *xk70* als *Tcf4*-Zielgen könnte auch durch die Bedeutung des homologen Säugergens *Keratin 19 (K19)* erklärt werden. Stasiak et al. (1989) schlugen vor, dass sich *K19* bezogen auf die Differenzierung als „neutrales“ Keratin verhält. Durch die Dimerisierung mit jeglichem früh synthetisierten basischen Typ II-Keratin könnte eine Zelle in einem „flexiblen Zustand der Differenzierung“ gehalten werden, ohne sich auf eine Differenzierungsoption festlegen zu müssen (Stasiak et al., 1989). Im Verlauf von Entwicklung und Differenzierung wird für gewöhnlich in jeglichem Epithelgewebe mindestens ein Paar aus sauren Typ I und basischen Typ II-Keratinen als Heterodimer exprimiert. Das humane *Keratin 19*, das Homologe zu *Xk70*, stellt insofern eine Ausnahme dar, als dass es keinen bekannten basischen Typ II-Keratinpartner hat (Quinlan et al., 1985; Sun et al.,

1985). Daher könnte seine Expression mit einem Prä-Differenzierungszustand einhergehen. Interessanterweise führt das Fehlen von *Tcf3* in murinen embryonalen Stammzellen zu einer verlangsamten Differenzierung (Pereira et al., 2006). Insofern könnte der *Tcf4*-Zielgenpool auch als eine Gruppe von Genen aufgefasst werden, deren Expression weniger auf der Anwesenheit des Transkriptionsfaktors *Tcf4* als auf dem Fehlen von *Tcf3* beruht.

6.2.2 Zementdrüsen-spezifische Zielgene

Die Zementdrüsen-spezifische „Anterior-Gradient“-Familie nimmt unter den epidermal exprimierten Genen einen besonderen Platz ein. Mit *xag2* und *xag* konnten zwei ihrer Vertreter als *Tcf3*-Ziele verifiziert werden. Sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch nach Aberger (1998), konnte *xag2* in animalen Kappen durch Blockierung des BMP-Weges hoch reguliert werden. *Xag-2* zeichnet sich nicht nur durch seine Aktivierung in neuralisierten animalen Kappen aus, es kann auch in ektodermalen Zellen Zementdrüsen- und anteriores neurales Schicksal induzieren (Aberger et al., 1998). Dies eröffnet die Möglichkeit, dass *Tcf3* als übergeordneter Regulator ebenfalls an der anterioren Spezifizierung des Ektoderms beteiligt sein könnte.

6.2.3 Chromatin-assoziierte Zielgene

Als einzige DNA-bindende Proteine unter den putativen TCF-Zielgen-Kandidaten sind die HMG-Proteine besonders interessant. Sie nehmen durch Chromatin-Umorganisation an der Transkriptionskontrolle teil (zusammengefasst in Bianchi und Agresti, 2005; Hock et al., 2007) und gehören zur gleichen Superfamilie wie die TCFs (Giese et al., 1991; Thomas und Travers, 2001). Im Zusammenhang mit der Neuralinduktion besteht die Idee, dass für die transkriptionelle Derepression neuraler Gene umfassende Veränderungen des Chromatins erforderlich sind (Munoz-Sanjuan und Brivanlou, 2002; Stern, 2006).

Geminin (*Gem*) wird in hohem Maße in undifferenzierten neuralen Vorläuferzellen exprimiert und unterbindet die neuronale Differenzierung (Seo et al., 2005a). Interessanterweise scheint diese repressive Eigenschaft darin begründet zu sein, dass *Gem* an das die Neurogenese fördernde *Brg1* (**B**rahma **r**elated **g**ene **1**) bindet und dadurch die Assoziation von *Brg1* mit *Neurogenin* und *NeuroD* blockiert. *Brg1* ist die katalytische Untereinheit des SWI/SNF (**S**Witch/**S**ucrose **N**on **F**ermentable) Chromatin-Umorganisations-Komplexes (Seo et al., 2005a). Da die X*Brg1*-Depletion eine durch *sox2*-Transkripte gekennzeichnete Verbreiterung der Neuralplatte zur Folge hat (Seo et al., 2005b), könnte die Chromatin-Reorganisation ein wesentlicher basaler Beitrag zur Stabilisierung des Neuralschicksals sein. In embryonalen Stammzellen konnte eine weitreichende durch Neuralinduktion geförderte Chromatin-Reorganisation sogar einem bestimmten Locus zugeordnet werden (Williams et

al., 2006). Der *Mash1*-Lokus gehört in embryonalen Stammzellen *in vitro* zu den wichtigsten am Erwerb des Neuralschicksals beteiligten Loci und die *Mash1*-Transkription ist als Folge einer mit der Neuralinduktion einhergehenden Chromatin-Reorganisation deutlich induziert (Williams et al., 2006).

Auch die als putative TCF-Ziele identifizierten HMG-Proteine (*hmgn1*, *hmgn2*, *hmgb3* und *hmg-x*) sind als Folge der Neuralinduktion induziert (Munoz-Sanjuan et al., 2002; Shin et al., 2005). Das panneural exprimierte *hmgb3* ist an der Regulation der Proliferation in den Augen und im Gehirn beteiligt und wurde als nachgeordnetes *Rx/Rax* (retina and anterior neural fold homeobox) -Ziel identifiziert (Terada et al., 2006). *Xrx1* kontrolliert wiederum die Proliferation und Neurogenese in der anterioren Neuralplatte (Andreazzoli et al., 2003). Interessanterweise ist in der Zebrafisch-Tcf3-Mutante *headless* die Expression des verwandten Zebrafisch-Homologen *rx3* reduziert (Kim et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine eindeutige TCF-Subtyp-spezifische *hmgb3*-Regulation nachgewiesen werden. Die Tcf3-Ziele *hmgn1* und *hmgn2* werden im *Xenopus*-Embryo sowohl in vom Neuroektoderm-abgeleiteten Geweben als auch im somitogenen Mesoderm exprimiert (Körner et al., 2003). Interessanterweise konnte in animalen Kappen, in denen durch Activin-Behandlung ein Mesoderm-Schicksal induziert wurde, gezeigt werden, dass sich nach *hmgn1*- und *hmgn2*-Überexpression die Kompetenz zur Annahme eines mesodermalen Charakters verlängert. So lassen sich Mesoderm-spezifische Gene wie *XMyoD* und *xbra* nach *HMGN*-Überexpression über einen längeren Zeitraum induzieren als in ausschließlich mit Activin-stimuliertem Gewebe (Körner et al., 2003).

Tatsächlich muss sich im Verlauf der Entwicklung die Kompetenz des Ektoderms und damit seine Fähigkeit, auf externe Signale zu reagieren, anpassen. Demgemäß verlieren die ektodermalen Zellen in der Gastrula ihre Mesoderm-induktive Kompetenz (Jones und Woodland, 1987; Green et al., 1990), so dass BMP-Antagonisten im Ektoderm ein neurales Schicksal herbeiführen können (Harland und Gerhart, 1997). Neuere Arbeiten unterstützen die Idee, dass der Verlust der Mesoderm-Kompetenz ein notwendiges permissives Ereignis darstellt, durch das die Neuralinduktion erst ermöglicht wird (Snir et al., 2006).

Auch die Expression des HMG-Proteins *hmg-x* ist in animalen Kappen durch die zur Neuralinduktion führende Blockierung von BMP-Signalen gegenüber unbehandelten Kappen induziert (Munoz-Sanjuan et al., 2002; vorliegende Arbeit). Des Weiteren kann *hmg-x*-Überexpression in unbehandelten animalen Kappen die Expression der beiden neuronalen Markergene *Otx2* und *NCAM* induzieren (Munoz-Sanjuan et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte für *hmg-x* eine differentielle Regulation hauptsächlich nach *Tcf3*-Überexpression beobachtet werden, in deren Folge die *hmg-x* Expression reprimiert ist. Interessanterweise unterdrückt *hmg-x*-Überexpression in neuralisierten animalen Kappen die Expression des Zementdrüsen-Markergens *xag* (Munoz-Sanjuan et al., 2002). Während

folglich das *Tcf4*-Zielgen *hmg-x* das Zementdrüsen-Schicksal unterdrückt, wirkt *Tcf3* *hmg-x* entgegen, indem es *hmg-x* reprimiert und die XAGs induziert.

Interessanterweise werden die HMGs im Neuroektoderm mit dem RNA-bindenden Protein Cirp überlappend exprimiert, bilden also eine Synexpressionsgruppe. Dabei handelt es sich um Gene mit einem gemeinsamen komplexen Expressionsmuster, die auch eine gemeinsame Funktion haben (Gawantka et al., 1998; Niehrs und Pollet, 1999). Eine dieser Gruppen ist die „Chromatin-Gruppe“, die Gene umfassen soll, die intensiv und ubiquitär in der Neurula exprimiert werden. Während im Schwanzknospen-Stadium die Somiten, die *Chorda dorsalis*, die Zementdrüse und zum Teil die Bodenplatte des Gehirns weitgehend frei von Transkripten dieser Gene bleiben sollen. Nach Niehrs und Pollet (1999) sind die Gene dieser Gruppe daher dadurch charakterisiert, dass ihre Expression in Geweben, die postmitotisch werden, reprimiert wird. *Hmgn2*, *hmgn1*, *hmg-x*, und *cirp* wurden in diese „Chromatin“-Gruppe subsummiert (Gawantka et al., 1998; Pollet et al., 2005). Die Synexpression soll dabei nur durch einen oder wenige *trans*-agierende Faktoren koordiniert werden, die gemeinsame Promotor-Elemente regulieren (Niehrs und Pollet, 1999).

Da *cirp*, *hmgn2* und *hmgn1* als *Tcf3*-Ziele einerseits und *hmg-x* als *Tcf4*-Ziel andererseits verifiziert wurden, könnten *Tcf3* und *Tcf4* die bisher unbekanntenen Regulatoren dieser Synexpressionsgruppe sein. Für eine Bestätigung dieser Annahme fehlen aber Promotor-Studien, welche belegen, dass die hier verifizierten Mitglieder der „Chromatin“-Gruppe direkte TCF-Zielgene sind. Die nach *Tcf3*-Depletion neural verbreiterten Expressionsmuster der HMG-Proteine, die insgesamt mit einer lateralen Expansion des Neuroektoderms einhergehen, lassen dagegen den Schluss zu, dass es sich um eine indirekte Regulation der HMGs handelt.

Tatsächlich zeigt eine neuere Arbeit die indirekte Beteiligung eines HMG-Proteins an einer durch die Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade vermittelten Genregulation. Das Säuger-Homologe Hmgn2/Hmg-17 kolokalisiert mit dem Homöodomänen-Transkriptionsfaktor Pitx2 (**P**ituitary **H**omeobox **2**) an Chromatin-Strukturen im Kern und bildet einen inhibitorischen Komplex. Ein aktiver Wnt/ β -Catenin-Signalweg hat dagegen zur Folge, dass β -Catenin mit Pitx2 im Kern interagiert und den Pitx2/Hmg-17-Komplex dereprimiert (Amen et al., 2007). Interessanterweise ist Pitx2 ein direktes Wnt-Zielgen in der Hypophysen-Entwicklung (Ai et al., 2007) und ein Ausfall von *Tcf4* führt zu einer Hypophysen-Wucherung (Brinkmeier et al., 2007). Folglich könnte *Tcf3* als Regulator von Hmgn2/Hmg-17 indirekt die Pitx2-vermittelte Hypophysen-Entwicklung einschränken, während *Tcf4* Pitx2 als direktes Wnt-Zielgen reguliert.

6.2.4 RNA-assoziierte Zielgene

Eine weitere Gruppe wichtiger TCF-Subtyp-spezifischer Zielgene umfasst solche, die für RNA-bindende Proteine kodieren. Die in dieser Arbeit auf ihre TCF-spezifische Regulation untersuchten Zielgen-Kandidaten aus dieser Gruppe Cirp, Cirp2, Sfrs2 und NM_001092746 zeichnen sich durch eine einzige RRM (RNA Recognition Motif)-Domäne aus. Die RRM-Domäne war unter den RNA-Bindungsdomänen das häufigste Motiv, denn sie trat bei neun von insgesamt dreizehn in dem vorliegenden Screen identifizierten RNA-bindenden Proteinen auf. Neben den auf ihre TCF-Subtyp-spezifische Regulation untersuchten Genen weisen auch Sfrs5 und NM_001086914 nur eine einzige RRM-Domäne auf, indessen verfügen NM_001086140, NM_001087851 und NM_001087020 über zwei dieser Domänen. Die vier verbliebenen RNA-bindenden Proteine mit von der RRM-Domäne verschiedenen RNA-Bindungsdomänen sind NM_001085898, BC044314, NM_001092031 sowie AB191036.

Die besondere Bedeutung der RRM-Proteine für die Embryonal-Entwicklung geht unter anderem aus der Tatsache hervor, dass das „RNA-Recognition Motif“(RRM) neben der Homöobox-Domäne die häufigste Protein-Domäne ist, die in einem Hochdurchsatz-Screen-Verfahren unter 723 Genen ermittelt wurde, die sich während der Embryonal-Entwicklung durch ein differentielles Expressionsmuster auszeichnen (Pollet et al., 2005). Möglicherweise beruht die Bedeutung dieser RNA-bindenden Proteine darauf, dass sie die Genexpression während der Embryonal-Entwicklung post-transkriptional regulieren.

Eine solche durch RNA-bindende Proteine vermittelte mRNA-Regulation kann über so verschiedene Mechanismen erfolgen wie Spleiß-Kontrolle, Steuerung der subzellulären Lokalisation, Translationskontrolle und Regulation der mRNA-Stabilität (Colegrove-Otero et al., 2005). In dieser Hinsicht werden Cirp und Cirp2 nicht an dieser Stelle, sondern wegen ihrer herausragenden Rolle in einem eigenen Abschnitt besprochen.

Neben den Cirp-Proteinen können auch die putativen Tcf3-Ziele Sfrs2 und Sfrs5 eine wichtige Rolle bei der mRNA-Regulation übernehmen. Sie gehören zur konservierten Familie der Serin(S)-Arginin(R)-reichen SR-Proteine, deren Mitglieder Prä-mRNA-Spleißfaktoren sind (Zahler et al., 1992). Das humane Sfrs2/SC35 ist nicht nur für das Spleißen von Prä-mRNA wesentlich, sondern auch in der Lage, die Auswahl alternativer Spleißstellen zu beeinflussen (Tacke und Manley, 1995). Interessanterweise könnte die Variation von SC35-Exon-Spleißverstärker spezifischen Bindungsstellen in der mRNA des Wnt-Antagonisten Axin2, die zelluläre Axin2-Proteinmenge beeinflussen (Mostowska et al., 2006).

Sfrs5/SRp40 vermittelt dagegen in humanen myometrialen Zellen durch alternatives Spleißen des Transkriptionsfaktors CREM (cAMP-response element modulator) das Umschalten von einem Aktivator zu einem Repressor (Tyson-Capper et al., 2005), was als Modell für eine entwicklungsbiologische Funktion dieses Spleißfaktors dienen könnte.

Auch das putative aber als Tcf4-Zielgen unbestätigte ALY (**A**lly of AML-1 and Lef-1)-Homologe NM_001092746 könnte wie das humane ALY am Prä-mRNA-Spleißen und am Kernexport von mRNA beteiligt sein (Cheng et al., 2006). Daneben verstärkt ALY als Koaktivator von Transkriptionsfaktoren wie Lef-1, RUNX1 (AML-1) und c-Myb die Aktivität T-Zellen-spezifischer Enhancer (Bruhn et al., 1997; Mertz et al., 2007) und reguliert die Dimerisierung, DNA-Bindung und transkriptionelle Aktivität von bZIP-Transkriptionsfaktoren (C/EBP; CREB; ATF-1; -2; -3, -6 und jun) (Virbasius et al., 1999). Während einige dieser Transkriptionsfaktoren im adulten Säuger-ZNS basal exprimiert werden, sind Jun und CREB auch an der Entwicklung des Nervensystems beteiligt (zusammengefasst in Herdegen und Leah, 1998). Dem entsprechend könnte das ALY-Homologe NM_001092746 an der Transkriptionskontrolle im *Xenopus*-Neuroektoderm beteiligt sein.

Das nach Cirp zweithäufigste RNA-bindende Protein unter den putativen Tcf3-Zielgenen wird von NM_001085898 kodiert und weist als RNA-Bindungsdomäne keine RRM-, sondern eine „Cold Shock“-Domäne (CSD) auf. Es ist zu 99% mit dem *Xenopus* Y-Box-Bindungsprotein 1 (Ybx1) identisch, auf das auch die Synonyme Frgy1 (**f**rog **Y**-box protein **1**) und Nsep1 (**n**uclease sensitive **e**lement-binding **p**rotein **1**) zutreffen. *Frgy1* wird zumindest während der Gastrula in *Xenopus*-Embryonen exprimiert und ist in diesem Stadium gegenüber *frgy2* abundanter (Tafari und Wolffe, 1990). Beide sind in der Lage, den *Xenopus-hsp70*-Promotor zu stimulieren (Tafari und Wolffe, 1990), was die Identifizierung des *hsp70*-Verwandten *hsc70* (heat shock cognate protein 70) als putatives Tcf3-Zielgen erklären könnte. Andererseits wurde *hsc70* in neuralisierten animalen Kappen als neural-induziert ermittelt (Munoz-Sanjuan et al., 2002) und seinem humanen Homologen *hsp70* wird eine neuroprotektive Rolle zugeschrieben (Yenari et al., 1999), so dass es schlicht als Folge des neuralisierten Grundzustandes exprimiert werden könnte.

Das humane Homologe zu NM_001085898, YB-1, ist ein RNA-bindendes Protein mit einer breiten Palette spezifischer Substrate und es ist an der mRNA-Regulation auf Ebene von Transkription, Translation und Spleißen beteiligt (Evdokimova et al., 2006b).

In Mäusen führt eine homozygote YB-1-Ausfallmutation zu embryonaler Letalität (Uchiumi et al., 2006), was zeigt, dass das murine YB-1 für die Embryonalentwicklung notwendig ist. Bei 20% der untersuchten YB-1^{-/-}-Embryonen ist Exencephalie im Bereich des Vorder-, Mittel- und Hinterhirns nachweisbar, was auf ein defektes Schließen des anterioren Neuralrohrs zurückzuführen ist (Uchiumi et al., 2006). Defekte, die den Verschluss des Neuralrohrs betreffen, wurden mit Mutationen in Zusammenhang gebracht, welche in die Funktion von Actin eingreifen (Harris und Juriloff, 2007). Tatsächlich ist bei YB-1^{-/-}-Embryonen im Vergleich zum Wildtyp die Menge an β -Actin-Protein im Schädelbereich reduziert (Uchiumi et al., 2006). Möglicherweise wurde β -Actin in der vorliegenden Arbeit neben dem YB-1

Homologen NM_001085898 als putatives Tcf3-Zielgen identifiziert, weil es über einen analogen Mechanismus von NM_001085898 reguliert wird.

Interessanterweise führt eine YB-1-Ausfallmutation in murinen Embryonen (Uchiumi et al., 2006) ähnlich wie die Morpholino-vermittelte Cirp-Translationsblockade in *Xenopus*-Embryonen zu einem fehlerhaften Schließen des anterioren Neuralrohrs (Peng et al., 2006). RNA-bindende Proteine greifen auf mehreren Ebenen in die post-transkriptionale Genregulation ein. Zahlreiche Beispiele belegen ihre Rolle bei der Kontrolle der Genexpression in der frühen Embryonal-Entwicklung (Colegrove-Otero et al., 2005).

Die Identifizierung TCF-Subtyp-spezifischer Ziele unter den RNA-bindenden Proteinen zeigt auf, dass die post-transkriptionale durch mRNA-Bindung vermittelte Genregulation ein wesentlicher Beitrag zur TCF-gesteuerten differentiellen Kontrolle der Genexpression während der Neurogenese ist.

Modifikation des Zytoskeletts, Reorganisation des Chromatins und mRNA-Bindung könnten folglich die mechanistischen Grundlagen des stabilisierenden Schritts bei der Konstitution des neuralen Schicksals im Ektoderm bilden (Abb. 42). In dieser Hinsicht könnte Tcf3 der übergeordnete Regulator einer Reihe basaler Mechanismen sein, welche als permissive Ereignisse den Boden für die neurale Differenzierung im Neuroektoderm bereiten.

6.3 Cirp

Mit Cirp wurde im vorliegenden Screen ein RNA-bindendes Protein identifiziert, das sich auszeichnet durch seine große Häufigkeit unter den Tcf3-Zielgenkandidaten-Klonen, seine deutlich Tcf3-abhängige Regulation und seine funktionelle Redundanz zu Tcf3 in der Begrenzung der Neuralplatten-Ausdehnung.

Die Vielzahl der durch die weiteren Zielgene potentiell vermittelten Tcf3-Funktionen während der Neurogenese lässt vermuten, dass nicht ein Zielgen alleine für die laterale Verbreiterung der Neuralplatte verantwortlich ist. Somit wird verständlich, dass die Cirp-Depletion mit schwächerer Penetranz als die Tcf3-Verminderung zu einer lateralen Neuralplatten-Verbreiterung führt und dass eine Cirp-vermittelte Rekonstitution des nach Tcf3-Depletion beobachteten Phänotyps nicht möglich war.

6.3.1 Regulation der Cirp-Expression

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, *cirp* als Tcf3-Zielgen zu identifizieren. Dies konnte nach Tcf3-Depletion in neuralisierten animalen Kappen gezeigt werden. Darüber hinaus ist die *cirp*-Expression nicht nur im Kappengewebe, sondern auch in Neurula-Embryonen vom endogen vorhandenen Tcf3 abhängig, wie anhand einseitig injizierter Embryonen gezeigt

werden konnte. Diese Abhängigkeit spiegelt sich vor allem in der Neuralplatte wieder, in der *Tcf3* und *cirp* kolokalisiert sind. Für eine spezifische *Tcf3*-abhängige *cirp*-Regulation spricht des Weiteren die Tatsache, dass die *Cirp*-Expression nicht nur auf der Ebene der Transkripte (Fichtner, Diplomarbeit 2007), sondern auch auf Protein-Ebene nach *Tcf3*-Depletion durch Beigabe rekombinanter *Tcf3*-mRNA wiederhergestellt werden konnte.

Mit *cirp* wurde zudem ein *Tcf3*-Zielgen identifiziert, das die Zielsetzung des Screen-Verfahrens voll erfüllt. Es handelt sich um ein TCF-Subtyp-spezifisches Ziel, das von *Tcf3* nicht aber vom endogenen *Tcf4* abhängig ist. Dies könnte in der endogen eng auf das Mittelhirn begrenzten *Tcf4*-Expression begründet sein, die mit der *cirp*-mRNA-Verteilung nur kleinräumig überlappt. Weder in neuralisierten animalen Kappen noch in einseitig injizierten Neurula-Embryonen ging mit einer *Tcf4*-Depletion eine Verminderung der *cirp*-Transkripte einher. Auch nach *Lef1*-Verlust war keine Herunterregulierung von *cirp* zu beobachten, was seine spezifische Abhängigkeit von *Tcf3* erneut unterstreicht.

Überraschenderweise konnte aber durch *Lef1*-Applikation eine auf *Tcf3*-Depletion beruhende *cirp*-Verminderung mit vergleichbarer Penetranz aufgehoben werden wie durch *Tcf3*-mRNA-Injektion (Fichtner, Diplomarbeit 2007). Diese Redundanz in der Fähigkeit, die *cirp*-Expression wiederherzustellen, ist insofern erstaunlich, als *Tcf3* allgemein als Repressor von Wnt-Zielgenen gilt, während *Lef1* dagegen als Aktivator aufgefasst wird (Brannon et al., 1999; Merrill et al., 2001; Pukrop et al., 2001; Liu et al., 2005).

Möglicherweise liegt die Fähigkeit von *Lef1* die *cirp*-Expression wiederherstellen zu können, nicht in dem allgemeinen Modell von Repressor- und Aktivator-Funktion begründet, das sich im *Xenopus*-Embryo vor allem auf die Achseninduktion bezieht. Vielmehr könnten *Lef1* und *Tcf3* die Transkriptionsfaktoren sein, die während der Neurula mit vergleichbarer Affinität an die für den *cirp*-Verlust-Phänotyp verantwortlichen Promotoren binden können. Endogen ist die *Lef1*-Expression während der Neurula am stärksten im zukünftigen Mittelhirn sowie dem Schlund-Mesoderm und weiter posterior im intermediären Mesoderm (Molenaar et al., 1998), was erklären könnte, weshalb der *Lef1*-Verlust für die *cirp*-Expression folgenlos bleibt.

Ein weiterer Hinweis, der die *cirp*-Expression von der Steuerung klassischer Wnt-Zielgene abhebt, liegt in der Beobachtung begründet, dass zumindest in neuralisierten animalen Kappen keine signifikante differentielle Regulation durch den Aktivator der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade *Xwnt-8*, noch durch deren Inhibitor *Conductin* erfolgte. *Cirp* könnte somit ein Wnt-unabhängiges Zielgen sein, das durch *Tcf3* positiv reguliert wird.

Interessanterweise kann der *Headless/Tcf3*-Funktionsverlust in Zebrafisch, der zum Fehlen von Augen, Vorderhirn und Teilen des Mittelhirns führt, durch ein *Tcf3*-Deletions-Konstrukt behoben werden, dem die β -Catenin-Bindungsdomäne fehlt (Kim et al., 2000). Dies wurde mit der Rekrutierung von Korepressoren wie Groucho und/oder CtBP erklärt.

Für *cirp*, das durch Tcf3 induziert wird, kommt dagegen eher eine Kooperation mit einem Interaktionspartner in Frage, der in der Lage ist, eine Wnt-unabhängige Aktivierung zu vermitteln. Ein mögliches Beispiel für eine LEF/TCF-vermittelte, aber β -Catenin-unabhängige Aktivierung gibt es für das Homöodomänen-Protein Xtn (*Xenopus twin*). Der *xtn*-Promotor kann durch Smads (Effektoren des Transforming Growth Factor β /BMP-Signalwegs) Lef1-abhängig, aber ohne β -Catenin-Bindung aktiviert werden (Letamendia et al., 2001).

6.3.2 Funktion von Cirp

Cirp ist nicht nur ein Tcf3-Zielgen, sondern es zeichnet sich auch dadurch aus, dass es offensichtlich wie Tcf3 für den stabilisierenden Schritt bei der Konstitution des Neuralschicksal benötigt wird. Denn sowohl nach der Morpholino-vermittelten Tcf3-Depletion als auch nach Cirp-Reduktion kann eine Verbreiterung der Neuralplatte beobachtet werden. Des Weiteren kann die Expansion der Neuralplatte nach Cirp-Verminderung durch Wiederherstellung der Cirp-Funktion aufgehoben werden, was aufzeigt, dass der untersuchte Phänotyp spezifisch ist. Damit ist Cirp das erste RNA-bindende Protein, für das gezeigt wurde, dass es an der Regulation der lateralen Ausdehnung der Neuralplatte beteiligt ist. Bisher wurden Gene mit einer lateralen Ausdehnung der Neuralplatte in Zusammenhang gebracht, die wie *Brg1* und *REST/NRSF* für Bestandteile eines Chromatin-Reorganisations-Komplexes oder für Transkriptionsfaktoren kodieren. Diese Transkriptionsfaktoren gehören wie *zic-1* zur Zink-Finger- oder wie *foxD5a* zur „Forkhead“-Familie.

Andererseits könnte es in der *Xenopus*-Neuralentwicklung ein zu Tcf3 -> Cirp analoges Regulator -> Zielgen-Paar geben. So sind die pan-neural exprimierte Transkripte der für das RNA-bindende Protein Nrp-1 (**N**eurales **R**ibonukleoprotein **1**) kodierenden mRNA nach Morpholino-vermittelter Depletion der eng verwandten Transkriptionsfaktoren Frodo (**F**unctional **R**egulator **o**f **D**ishevelled in **O**rganogenesis) und Dapper stark reduziert (Hikasa und Sokol, 2004). Des Weiteren führt die Depletion der Frodo/Dapper (Frd)-Proteine zu einer Reduktion der *sox2*-Expression in der frühen Neurula. Signifikante Einflüsse auf die Expression des mesodermalen Markergens *myoD* konnten dagegen nicht beobachtet werden (Hikasa und Sokol, 2004).

Damit gibt es als Analogie zu der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Cirp-Reduktion nach Tcf3-Verlust ein Regulationspaar in der *Xenopus*-Neurula, bei dem nach Frd-Verminderung die Nrp-1-Expression reprimiert ist. Dabei ist die Reduktion des im Neuroektoderm exprimierten RNA-bindenden Proteins mit nur einem einzigen RRM-Motiv unabhängig von induktiven Einflüssen des Mesoderms. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression des mesodermalen Markers *myoD* weder nach Tcf3- noch nach Cirp-Depletion signifikant verändert ist.

Interessanterweise gelten die Frd-Proteine als Modulatoren der Wnt-Signalkaskade und könnten an der TCF-abhängigen Zielgen-Induktion beteiligt sein (Brott und Sokol, 2005). So

ist die Aktivierung eines auf dem *siamois*-Promotor beruhenden Wnt-induzierbaren Reportergenkonstrukts durch konstitutiv-aktives Tcf3 nach Applikation von Frodo-Morpholino unterdrückt. Des Weiteren kann die nach Frodo-Depletion reduzierte Expression von *Chordin* und *Xnr3* in der frühen Gastrula durch Beigabe von rekombinantem β -Catenin aufgehoben werden (Hikasa und Sokol, 2004).

In der späten Neurula scheinen die Funktionen von Tcf3 und Frodo als Vermittler des Wnt-Signalwegs stärker zu divergieren. Während Tcf3 und das nachgeordnete Cirp die laterale Ausdehnung des *sox2*-Expressionsfeldes in der Neuralplatte beschränken, kontrollieren die Frd-Proteine eher den Verschluss des Neuralrohrs (Hikasa und Sokol, 2004). Des Weiteren hat Morpholino-vermittelte β -Catenin-Depletion keine *nrp-1*-Reduktion zur Folge. Stattdessen verengt sich das *nrp-1*-Expressionsfeld im posterioren Bereich des Neuralrohrs, während es sich anterior ausdehnt (Hikasa und Sokol, 2004). Auch Morpholino-vermittelte Tcf3-Depletion bleibt für die Intensität der *nrp-1*-Expression folgenlos. Stattdessen kennzeichnen die *nrp-1* Transkripte ähnlich wie *sox2* die lateral verbreiterte Neuralplatte (Dietmar Gradl, persönliche Mitteilung). Möglicherweise vermitteln Frd-Proteine und Tcf3 während der Neurogenese parallele Wnt-Signaltransduktionswege. Dabei könnte der Einfluss des mit Dishevelled-interagierenden Frodo (Gloy et al., 2002) in der Neurulation ein stärkeres Gewicht als Tcf3 bei der Steuerung von morphogenetischen Bewegungen wie dem Verschluss des Neuralrohrs haben, während Tcf3 eher an der Aufrechterhaltung eines Pools neuraler Vorläufer beteiligt ist. Tatsächlich soll Frodo die durch p120-Catenin und den transkriptionellen Repressor Kaiso vermittelte Modulation des β -Catenin unabhängigen nicht-kanonischen Wnt-Wegs mit dem kanonischen β -Catenin/TCF-Signalweg verknüpfen (Park et al., 2006).

Obwohl dem Tcf3-Zielgen Cirp eine Funktion sowohl beim Verschluss des anterioren Neuralrohrs als auch bei morphogenetischen Gastrulationsbewegungen zugeschrieben wurde (Peng et al., 2006), konnte in der vorliegenden Arbeit nach Morpholino-vermittelter Cirp-Depletion keine Beeinträchtigung morphogenetischer Bewegungen in den als Testansatz verwendeten Keller-Explantaten ermittelt werden. Dabei wurde in diesen Experimenten eine genauso hohe Cirp-Morpholino-Dosis appliziert wie diejenige, die eine signifikante Verbreiterung der Neuralplatte zur Folge hat. Folglich kann die laterale Ausdehnung der Neuralplatte nicht auf eine gestörte konvergente Extension zurückgeführt werden.

Das Beispiel einer durch *Xsix3*-(**s**ine oculis homeobox homolog **3**) Überexpression vermittelten Verbreiterung der Neuralplatte zeigt, dass diese Art der Ausdehnung auch die Folge einer erhöhten Proliferation in der Neuralplatte sein kann (Gestri et al., 2005). Umgekehrt geht in der Zebrafisch-Tcf3-Mutante *headless* eine verminderte *six3*-Expression mit einem reduzierten Vorderhirn einher (Kim et al., 2000).

Auch nach Morpholino-vermittelter *Cirp*-Depletion konnte in späten Neurula-Stadien keine erhöhte, sondern eine verminderte Proliferation ermittelt werden. Möglicherweise beruht der Unterschied auf der Tatsache, dass die Proliferation im Fall von *Xsix3* bereits in einem frühen Neurula-Stadium analysiert wurde.

Ähnlich wie nach *Tcf3*-Depletion geht die nach *Cirp*-Reduktion beobachtete Neuralplatten-Verbreiterung nicht auf Kosten des benachbarten Prä-Plakoden-Ektoderms (PPE). Das Expressionsfeld des PPE-Markergens *eya1* ist zwar lateral verschoben, aber nicht reduziert (Abb. 43).

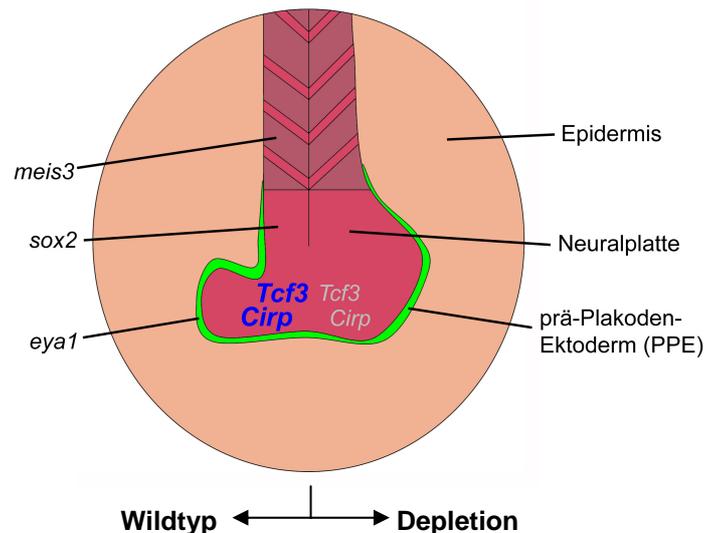


Abb. 43 Schema der durch die Expression von drei Markergenen gekennzeichneten lateralen Expansion der Neuralplatte nach einseitiger *Tcf3*- und *Cirp*-Depletion. Die *sox2*-Expression markiert die gesamte Neuralplatte, die *meis3*-Expression das posteriore Neuralgewebe und die *eya1*-Expression das Prä-Plakoden-Ektoderm.

6.3.3 Molekulare Mechanismen der *Cirp*-Funktion

Hinweise auf die molekularen Mechanismen, die für eine nach *Cirp*-Verminderung expandierte Neuralplatte verantwortlich sein könnten, ergeben sich sowohl aus der Betrachtung bekannter *Cirp*-Funktionen als auch aus der Berücksichtigung von *Cirp*-Interaktionspartnern.

Ein *Cirp*-spezifischer Mechanismus könnte die mRNA-Stabilisierung durch Bindung an den 3' nicht-translatierten Bereich (3'UTR) der betreffenden mRNAs sein (Yang und Carrier, 2001), der durch sogenannte AU-reiche Elemente (ARE) ausgezeichnet sein kann (Aoki et al., 2003). Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit nach Morpholino-vermittelter *Cirp*-Depletion in Neurula-Embryonen eine Verringerung des mRNA-Pools um 10-13% gegenüber unbehandelten Embryonen ermittelt werden. Obwohl die Identität der in diesem Fall betroffenen mRNAs abgesehen von *sox2* unbekannt ist, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um einen großen Satz regulierter mRNAs handeln muss. Diese Idee wird des Weiteren

durch die Tatsache gestützt, dass eine verminderte mRNA-Menge bereits nach einer partiellen Cirp-Depletion beobachtet werden kann.

Andere Arbeiten geben Hinweise auf eine Cirp-vermittelte Stabilisierung von α E- und β -Catenin sowie C- und E-Cadherin (Peng et al., 2006). Da eine auf einer gestörten konvergenten Extension beruhende Verbreiterung der Neuralplatte in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden konnte, kommen diese Zelladhäsionsmoleküle möglicherweise in anderer Hinsicht als operative Vermittler der Cirp-Funktion in Betracht.

Interessanterweise könnten Zell-Zell-Adhäsionsstrukturen in Säugern während der Gehirnentwicklung an der Proliferationskontrolle neuraler Vorläuferzellen beteiligt sein, was ermöglicht, dass das Gehirn seine prä-determinierte Größe erreicht (Lien et al., 2006). So hat konditionelles Ausschalten von α E-Catenin in neuralen Vorläuferzellen des ZNS muriner Embryonen eine Vergrößerung der Großhirnrinde zur Folge, die auf eine Verkürzung der Zellzyklen und eine verminderte Apoptose zurückzuführen ist (Lien et al., 2006).

Auch bei der Zell-Zyklus-Kontrolle könnte Cirp eine Rolle spielen. Einerseits bindet es die mRNAs von Nek2B (NIMA-verwandte Kinase 2b) und CyclinB1 (Aoki et al., 2003; Peng et al., 2006), denen eine Funktion beim Centrosom-Zyklus (Fry et al., 2000) beziehungsweise beim Übergang von der G2- zur M-Phase (Peter et al., 2002) zugeschrieben werden. Andererseits hat die Morpholino-vermittelte Cirp-Verminderung eine Reduktion proliferierender Zellen zur Folge.

Eine weitere die mRNA-Stabilität modulierende Cirp-Funktion könnte in seiner Interaktion mit ElrA (*Xenopus* ELAV-like RNA-binding protein A) dem *Xenopus*-Homologen zum Säuger-Protein HuR (HU-Antigen R) begründet sein. Es wird vermutet, dass ElrA und XCirp2 gemeinsam einen Komplex bilden, der gebundene mRNAs stabilisiert (Aoki et al., 2003).

Interessanterweise konnte den ELAV RNA-bindenden Proteinen vor kurzem eine Funktion in murinen neuralen Stammzellen zugeordnet werden (Ratti et al., 2006). Demnach sind neural exprimierte ELAV-Proteine wesentliche Induktoren neuronaler Differenzierung, indem sie ARE-haltige Zieltranskripte stabilisieren oder deren Translation verstärken. Interessanterweise konnte als ein durch HuD stabilisiertes Transkript die mRNA des zu *Xenopus nrp-1* Homologen *Msi1* (*Musashi-1*) identifiziert werden. *Msi1* gilt als translationaler Repressor, der den Zustand der Stammzell-Proliferation aufrechterhält. Die durch die ELAV-Proteine ausgeübte post-transkriptionelle Kontrolle der *Musashi-1*-Expression könnte in Vorläuferzellen für den Übergang von der Proliferation zur neuronalen Differenzierung wichtig sein (Ratti et al., 2006). Die Aufrechterhaltung einer Vorläufer-Population könnte auch die Ursache der nach Cirp-Depletion beobachteten Neuralplatten-Verbreiterung sein. Möglicherweise kennzeichnen die *nrp-1* Transkripte nicht nur die lateral verbreiterte Neuralplatte, sondern sind Ausdruck der persistierenden neuralen Vorläuferpopulation.

Ein weiterer Mechanismus, der die Cirp-Funktion charakterisieren könnte, ist die Translationskontrolle. Einerseits interagiert humanes Cirp (synonym A18 hnRNP) mit dem Translations-Initiationsfaktor eIF4G (eukaryotic translation initiation factor 4-gamma) (Yang et al., 2006), andererseits kann humanes Cirp in sogenannte Stress-Granulae rekrutiert werden (De Leeuw et al., 2007). Interessanterweise kann auch der Cirp-Interaktionspartner ElrA/HuR in Stress-Granulae rekrutiert werden (Gallouzi et al., 2000). Stress-Granulae werden als Orte angesehen, an denen translational inaktive Messenger-Ribonukleoprotein-Partikel (mRNP) hinsichtlich ihre Unversehrtheit und ihre Struktur überprüft werden (Kedersha et al., 2005). Für XCirp2 wurde bereits eine Rekrutierung an mRNPs vermutet, da es simultan mit Frgy2 mRNAs binden kann (Matsumoto et al., 2000).

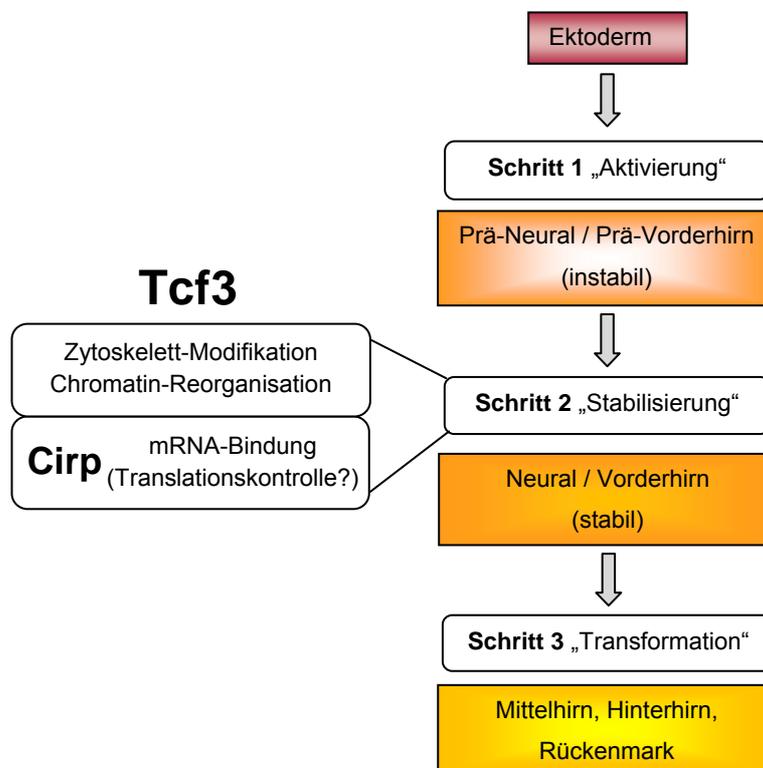


Abb. 44 Einordnung des *Tcf3*-Ziels Cirp in das Drei-Schritt-Modell nach Stern (Stern et al., 2006). Cirp als eines der wichtigsten *Tcf3*-Ziele könnte für die meisten Aspekte der durch mRNA-Bindung vermittelten Stabilisierung des Neuralschicksals in der Neurula verantwortlich sein.

Interessanterweise sind NM_001085898-Homologe YB-1/Frgy1-Proteine sowohl in Keim- als auch in somatischen Zellen die Hauptbestandteile von mRNPs und hauptsächlich für die Speicherung der mRNAs in einem inaktiven Zustand verantwortlich (Evdokimova et al., 2006a). Möglicherweise könnte daher auch Cirp als translationeller Repressor wirken. Andererseits führt Cirp-Überexpression in humanen Dickdarm-Krebszellen zu einer verstärkten Translation (Yang et al., 2006), was eine Kontext-abhängige Translationskontrolle möglich erscheinen lässt.

Cirp könnte folglich sowohl auf Ebene der mRNA-Stabilisierung als auch durch Modulieren der Translationskontrolle zu den das Neuralschicksal stabilisierenden Mechanismen beitragen (Abb. 44). Die weitere Analyse mRNA-bindender Proteine könnte helfen, die Bedeutung dieser bisher wenig beachteten Steuerungsebene für die Embryonalentwicklung weiter aufzuklären und sie in den Kontext individueller LEF/TCF-Funktionen in der *Xenopus*-Neurogenese einzuordnen.

7 Zusammenfassung

Durch die Identifizierung und Analyse differentiell regulierter Zielgene wurden die spezifischen Eigenschaften der individuellen LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* untersucht. Diese Analyse ergab, dass offensichtlich Tcf3 ein übergeordneter Regulator bei der Stabilisierung des Neuralschicksals ist. Damit steht Tcf3 im zweiten Schritt der in insgesamt drei Schritten vollzogenen Konstitution neuraler Identität. Dies spiegelt sich auch in dem nach Tcf3-Depletion beobachteten Effekt auf das Neuroektoderm wieder, denn der Verlust von Tcf3 nicht jedoch der von Tcf4 hat eine laterale Expansion zur Folge. Die Gesamtheit der putativen Tcf3-Zielgene deckt auf, dass als für die Stabilisierung des Neuroektoderms verantwortliche Mechanismen Zytoskelett-Modifikation, Chromatin-Reorganisation und durch mRNA-Bindung vermittelte Regulation von Transkripten in Frage kommen. Dabei nimmt das RNA-bindende Protein Cirp (Cold-inducible RNA-binding Protein) als Tcf3-spezifisches Zielgen eine zentrale Rolle ein. Cirp ist in ähnlicher Weise wie Tcf3 endogen für die Beschränkung der Neuralplatten-Größe nötig. Auf molekularer Ebene konnte belegt werden, dass Cirp eine stabilisierende Funktion auf zahlreiche während der Neuralentwicklung vorhandene Transkripte ausübt. Dies unterstützt die Idee, dass wesentliche Mechanismen, die für eine Stabilisierung des Neuralschicksals verantwortlich sind, weniger in einer Kontrolle der Transkription als vielmehr in der durch mRNA-Bindung vermittelten Regulation von Transkripten und in Chromatin-Reorganisation begründet sind, und dass Tcf3 dabei ein übergeordneter Regulator ist.

8 Literatur

- **Aberger, F., Weidinger, G., Grunz, H. und Richter, K.** (1998). Anterior specification of embryonic ectoderm: the role of the *Xenopus* cement gland-specific gene XAG-2. *Mech Dev* **72**, 115-30.
- **Ai, D., Wang, J., Amen, M., Lu, M. F., Amendt, B. A. und Martin, J. F.** (2007). Nuclear factor 1 and T-cell factor/LEF recognition elements regulate Pitx2 transcription in pituitary development. *Mol Cell Biol* **27**, 5765-75.
- **Albert, I. E.** (2004). Funktion und Regulation von *Xenopus laevis* Lef-1 während der Gastrulation. Diplomarbeit am Zoologischen Institut II. Chemie und Biowissenschaften. Karlsruhe, Universität Karlsruhe (TH).
- **Altmann, C. R. und Brivanlou, A. H.** (2001). Neural patterning in the vertebrate embryo. *Int Rev Cytol* **203**, 447-82.
- **Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-402.
- **Amen, M., Espinoza, H. M., Cox, C., Liang, X., Wang, J., Link, T. M., Brennan, R. G., Martin, J. F. und Amendt, B. A.** (2007). Chromatin-associated HMG-17 is a major regulator of homeodomain transcription factor activity modulated by Wnt/ -catenin signaling. *Nucleic Acids Res.* In press.
- **Andreazzoli, M., Gestri, G., Cremisi, F., Casarosa, S., Dawid, I. B. und Barsacchi, G.** (2003). Xrx1 controls proliferation and neurogenesis in *Xenopus* anterior neural plate. *Development* **130**, 5143-54.
- **Aoki, K., Matsumoto, K. und Tsujimoto, M.** (2003). *Xenopus* cold-inducible RNA-binding protein 2 interacts with ElrA, the *Xenopus* homolog of HuR, and inhibits deadenylation of specific mRNAs. *J Biol Chem* **278**, 48491-7.
- **Atcha, F. A., Syed, A., Wu, B., Hoverter, N., Yokoyama, N. N., Ting, J. H., Munguia, J. E., Mangalam, H. J., Marsh, J. L. und Waterman, M. L.** (2007). A unique DNA binding domain converts TCFs into strong Wnt effectors. *Mol Cell Biol.* In press.
- **Atsuchi Y., Shiokawa K.** (1991). Expression of Embryo-specific Epidermal XK81 Keratin Gene in Dissociated Cells of *Xenopus laevis* Animal Caps Co-cultured with Mesoderm-Inducing Vegetal Cells. *Develop Growth Differ* **33**, 123-130.
- **Baker, J. C., Beddington, R. S. und Harland, R. M.** (1999). Wnt signaling in *Xenopus* embryos inhibits bmp4 expression and activates neural development. *Genes Dev* **13**, 3149-59.
- **Behrens, J., von Kries, J. P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. und Birchmeier, W.** (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**, 638-42.
- **Bianchi, M. E. und Agresti, A.** (2005). HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 496-506.
- **Bieker, J. J. und Yazdani-Buicky, M.** (1992). The multiple beta-tubulin genes of *Xenopus*: isolation and developmental expression of a germ-cell isotype beta-tubulin gene. *Differentiation* **50**, 15-23.

- **Brannon, M., Brown, J. D., Bates, R., Kimelman, D. und Moon, R. T. (1999).** XCtBP is a XTcf-3 co-repressor with roles throughout *Xenopus* development. *Development* **126**, 3159-70.
- **Brannon, M., Gomperts, M., Sumoy, L., Moon, R. T. und Kimelman, D. (1997).** A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes Dev* **11**, 2359-70.
- **Brantjes, H., Roose, J., van De Wetering, M. und Clevers, H. (2001).** All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic Acids Res* **29**, 1410-9.
- **Brinkmeier, M. L., Potok, M. A., Cha, K. B., Gridley, T., Stifani, S., Meeldijk, J., Clevers, H. und Camper, S. A. (2003).** TCF and Groucho-related genes influence pituitary growth and development. *Mol Endocrinol* **17**, 2152-61.
- **Brinkmeier, M. L., Potok, M. A., Davis, S. W. und Camper, S. A. (2007).** TCF4 deficiency expands ventral diencephalon signaling and increases induction of pituitary progenitors. *Dev Biol*. In press.
- **Brott, B. K. und Sokol, S. Y. (2005).** Frodo proteins: modulators of Wnt signaling in vertebrate development. *Differentiation* **73**, 323-9.
- **Brugmann, S. A. und Moody, S. A. (2005).** Induction and specification of the vertebrate ectodermal placodes: precursors of the cranial sensory organs. *Biol Cell* **97**, 303-19.
- **Bruhn, L., Munnerlyn, A. und Grosschedl, R. (1997).** ALY, a context-dependent coactivator of LEF-1 and AML-1, is required for TCRalpha enhancer function. *Genes Dev* **11**, 640-53.
- **Brunner, E., Peter, O., Schweizer, L. und Basler, K. (1997).** pangolin encodes a Lef-1 homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wingless signal in *Drosophila*. *Nature* **385**, 829-33.
- **Bustin, M. (2001).** Chromatin unfolding and activation by HMGN(*) chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci* **26**, 431-7.
- **Cheng, H., Dufu, K., Lee, C. S., Hsu, J. L., Dias, A. und Reed, R. (2006).** Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA. *Cell* **127**, 1389-400.
- **Cho, E. A. und Dressler, G. R. (1998).** TCF-4 binds beta-catenin and is expressed in distinct regions of the embryonic brain and limbs. *Mech Dev* **77**, 9-18.
- **Colegrove-Otero, L. J., Minshall, N. und Standart, N. (2005).** RNA-binding proteins in early development. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40**, 21-73.
- **Cramton, S. E. und Laski, F. A. (1994).** string of pearls encodes *Drosophila* ribosomal protein S2, has Minute-like characteristics, and is required during oogenesis. *Genetics* **137**, 1039-48.
- **De Leeuw, F., Zhang, T., Wauquier, C., Huez, G., Kruys, V. und Gueydan, C. (2007).** The cold-inducible RNA-binding protein migrates from the nucleus to cytoplasmic stress granules by a methylation-dependent mechanism and acts as a translational repressor. *Exp Cell Res*. In press.
- **De Robertis, E. M. (2006).** Spemann's organizer and self-regulation in amphibian embryos. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 296-302.

- **De Robertis, E. M., Larrain, J., Oelgeschlager, M. und Wessely, O.** (2000). The establishment of Spemann's organizer and patterning of the vertebrate embryo. *Nat Rev Genet* **1**, 171-81.
- **Deblandre, G. A., Wettstein, D. A., Koyano-Nakagawa, N. und Kintner, C.** (1999). A two-step mechanism generates the spacing pattern of the ciliated cells in the skin of *Xenopus* embryos. *Development* **126**, 4715-28.
- **Delaune, E., Lemaire, P. und Kodjabachian, L.** (2005). Neural induction in *Xenopus* requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. *Development* **132**, 299-310.
- **Dje, M. K., Mazabraud, A., Viel, A., le Maire, M., Denis, H., Crawford, E. und Brown, D. D.** (1990). Three genes under different developmental control encode elongation factor 1-alpha in *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Res* **18**, 3489-93.
- **Dorsky, R. I., Itoh, M., Moon, R. T. und Chitnis, A.** (2003). Two tcf3 genes cooperate to pattern the zebrafish brain. *Development* **130**, 1937-47.
- **Evdokimova, V., Ovchinnikov, L. P. und Sorensen, P. H.** (2006a). Y-box binding protein 1: providing a new angle on translational regulation. *Cell Cycle* **5**, 1143-7.
- **Evdokimova, V., Ruzanov, P., Anglesio, M. S., Sorokin, A. V., Ovchinnikov, L. P., Buckley, J., Triche, T. J., Sonenberg, N. und Sorensen, P. H.** (2006b). Akt-mediated YB-1 phosphorylation activates translation of silent mRNA species. *Mol Cell Biol* **26**, 277-92.
- **Fichtner, D.** (2007). Die Rolle des neuen XTcf-3 Zielgens XCIRP in der frühen Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*. Diplomarbeit am Zoologischen Institut II. Chemie und Biowissenschaften. Karlsruhe, Universität Karlsruhe (TH).
- **Franz, J. K. und Franke, W. W.** (1986). Cloning of cDNA and amino acid sequence of a cytokeratin expressed in oocytes of *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 6475-9.
- **Fry, A. M., Descombes, P., Twomey, C., Bacchieri, R. und Nigg, E. A.** (2000). The NIMA-related kinase X-Nek2B is required for efficient assembly of the zygotic centrosome in *Xenopus laevis*. *J Cell Sci* **113**, 1973-84.
- **Galceran, J., Farinas, I., Depew, M. J., Clevers, H. und Grosschedl, R.** (1999). Wnt3a^{-/-}-like phenotype and limb deficiency in Lef1^(-/-)Tcf1^(-/-) mice. *Genes Dev* **13**, 709-17.
- **Galceran, J., Miyashita-Lin, E. M., Devaney, E., Rubenstein, J. L. und Grosschedl, R.** (2000). Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1. *Development* **127**, 469-82.
- **Gallouzi, I. E., Brennan, C. M., Stenberg, M. G., Swanson, M. S., Eversole, A., Maizels, N. und Steitz, J. A.** (2000). HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3073-8.
- **Gawantka, V., Pollet, N., Delius, H., Vingron, M., Pfister, R., Nitsch, R., Blumenstock, C. und Niehrs, C.** (1998). Gene expression screening in *Xenopus* identifies molecular pathways, predicts gene function and provides a global view of embryonic patterning. *Mech Dev* **77**, 95-141.
- **Gestri, G., Carl, M., Appolloni, I., Wilson, S. W., Barsacchi, G. und Andreatzoli, M.** (2005). Six3 functions in anterior neural plate specification by promoting cell proliferation and inhibiting Bmp4 expression. *Development* **132**, 2401-13.

- **Ghogomu, S. M., van Venrooy, S., Ritthaler, M., Wedlich, D. und Gradl, D.** (2006). HIC-5 is a novel repressor of lymphoid enhancer factor/T-cell factor-driven transcription. *J Biol Chem* **281**, 1755-64.
- **Giese, K., Amsterdam, A. und Grosschedl, R.** (1991). DNA-binding properties of the HMG domain of the lymphoid-specific transcriptional regulator LEF-1. *Genes Dev* **5**, 2567-78.
- **Giese, K. und Grosschedl, R.** (1993). LEF-1 contains an activation domain that stimulates transcription only in a specific context of factor-binding sites. *Embo J* **12**, 4667-76.
- **Giese, K., Kingsley, C., Kirshner, J. R. und Grosschedl, R.** (1995). Assembly and function of a TCR alpha enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. *Genes Dev* **9**, 995-1008.
- **Gilbert, S. F.** (2006). Developmental Biology (8th edition). *Sinauer Associates, Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts USA*.
- **Gloy, J., Hikasa, H. und Sokol, S. Y.** (2002). Frodo interacts with Dishevelled to transduce Wnt signals. *Nat Cell Biol* **4**, 351-7.
- **Gomez-Skarmeta, J., de La Calle-Mustienes, E. und Modolell, J.** (2001). The Wnt-activated Xiro1 gene encodes a repressor that is essential for neural development and downregulates Bmp4. *Development* **128**, 551-60.
- **Gradl, D., König, A. und 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**, 14159-71.
- **Green, J. B., Howes, G., Symes, K., Cooke, J. und Smith, J. C.** (1990). The biological effects of XTC-MIF: quantitative comparison with *Xenopus* bFGF. *Development* **108**, 173-83.
- **Gregorieff, A., Grosschedl, R. und Clevers, H.** (2004). Hindgut defects and transformation of the gastro-intestinal tract in Tcf4(-)/Tcf1(-) embryos. *Embo J* **23**, 1825-33.
- **Harland, R. und Gerhart, J.** (1997). Formation and function of Spemann's organizer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 611-67.
- **Harris, M. J. und Juriloff, D. M.** (2007). Mouse mutants with neural tube closure defects and their role in understanding human neural tube defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* **79**, 187-210.
- **Hata, K., Nishijima, K. und Mizuguchi, J.** (2007). Role for Btg1 and Btg2 in growth arrest of WEHI-231 cells through arginine methylation following membrane immunoglobulin engagement. *Exp Cell Res* **313**, 2356-66.
- **Heasman, J.** (2002). Morpholino oligos: making sense of antisense? *Dev Biol* **243**, 209-14.
- **Heasman, J.** (2006). Patterning the early *Xenopus* embryo. *Development* **133**, 1205-17.
- **Heasman, J., Kofron, M. und Wylie, C.** (2000). Beta-catenin signaling activity dissected in the early *Xenopus* embryo: a novel antisense approach. *Dev Biol* **222**, 124-34.

- **Hecht, A. und Stemmler, M. P.** (2003). Identification of a promoter-specific transcriptional activation domain at the C terminus of the Wnt effector protein T-cell factor 4. *J Biol Chem* **278**, 3776-85.
- **Heeg-Truesdell, E. und LaBonne, C.** (2006). Neural induction in *Xenopus* requires inhibition of Wnt-beta-catenin signaling. *Dev Biol* **298**, 71-86.
- **Herdegen, T. und Leah, J. D.** (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev* **28**, 370-490.
- **Hikasa, H. und Sokol, S. Y.** (2004). The involvement of Frodo in TCF-dependent signaling and neural tissue development. *Development* **131**, 4725-34.
- **Hobmayer, B., Rentzsch, F., Kuhn, K., Happel, C. M., von Laue, C. C., Snyder, P., Rothbacher, U. und Holstein, T. W.** (2000). WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan Hydra. *Nature* **407**, 186-9.
- **Hock, R., Furusawa, T., Ueda, T. und Bustin, M.** (2007). HMG chromosomal proteins in development and disease. *Trends Cell Biol* **17**, 72-9.
- **Hong, C. S. und Saint-Jeannet, J. P.** (2007). The activity of Pax3 and Zic1 regulates three distinct cell fates at the neural plate border. *Mol Biol Cell* **18**, 2192-202.
- **Houston, D. W., Kofron, M., Resnik, E., Langland, R., Destree, O., Wylie, C. und Heasman, J.** (2002). Repression of organizer genes in dorsal and ventral *Xenopus* cells mediated by maternal XTcf3. *Development* **129**, 4015-25.
- **Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J., Ohsugi, M., Herrmann, B. G. und Kemler, R.** (1996). Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* **59**, 3-10.
- **Jones E. A., Woodland H. R.** (1987). The development of animal cap cells in *Xenopus*: a measure of the start of animal cap competence to form mesoderm. *Development* **101**, 557-563.
- **Kawano, Y. und Kypta, R.** (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* **116**, 2627-34.
- **Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M. J., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Golan, D. E. und Anderson, P.** (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* **169**, 871-84.
- **Keller, R.** (1991). Early embryonic development of *Xenopus laevis*. *Methods Cell Biol* **36**, 61-113.
- **Keller, R.** (2002). Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. *Science* **298**, 1950-4.
- **Kiecker, C. und Niehrs, C.** (2001). A morphogen gradient of Wnt/beta-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in *Xenopus*. *Development* **128**, 4189-201.
- **Kim, C. H., Oda, T., Itoh, M., Jiang, D., Artinger, K. B., Chandrasekharappa, S. C., Driever, W. und Chitnis, A. B.** (2000). Repressor activity of Headless/Tcf3 is essential for vertebrate head formation. *Nature* **407**, 913-6.

- **Kinoshita, M., Hatada, S., Asashima, M. und Noda, M.** (1994). HMG-X, a *Xenopus* gene encoding an HMG1 homolog, is abundantly expressed in the developing nervous system. *FEBS Lett* **352**, 191-6.
- **Klein, S. L., Strausberg, R. L., Wagner, L., Pontius, J., Clifton, S. W. und Richardson, P.** (2002). Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NIH *Xenopus* initiative. *Dev Dyn* **225**, 384-91.
- **König, A. O.** (2003). Isolierung und Charakterisierung des Transkriptionsfaktors XTcf-4 in *Xenopus laevis*. Dissertation am Institut für Biochemie. Medizin. Ulm, Universität Ulm.
- **König, A., Gradl, D., Kühl, M. und Wedlich, D.** (2000). The HMG-box transcription factor XTcf-4 demarcates the forebrain-midbrain boundary. *Mech Dev* **93**, 211-4.
- **Körner, U., Bustin, M., Scheer, U. und Hock, R.** (2003). Developmental role of HMGN proteins in *Xenopus laevis*. *Mech Dev* **120**, 1177-92.
- **Korinek, V., Barker, N., Willert, K., Molenaar, M., Roose, J., Wagenaar, G., Markman, M., Lamers, W., Destree, O. und Clevers, H.** (1998). Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Mol Cell Biol* **18**, 1248-56.
- **Krieg, P. A., Varnum, S. M., Wormington, W. M. und Melton, D. A.** (1989). The mRNA encoding elongation factor 1-alpha (EF-1 alpha) is a major transcript at the midblastula transition in *Xenopus*. *Dev Biol* **133**, 93-100.
- **Kroll, K. L., Salic, A. N., Evans, L. M. und Kirschner, M. W.** (1998). Geminin, a neuralizing molecule that demarcates the future neural plate at the onset of gastrulation. *Development* **125**, 3247-58.
- **Kunz, M.** (2005). Die Rolle der Lef/Tcf-Transkriptionsfaktoren in der Gehirnentwicklung von *Xenopus laevis*. Dissertation am Zoologischen Institut II. Chemie und Biowissenschaften. Karlsruhe, Universität Karlsruhe (TH).
- **Kunz, M., Herrmann, M., Wedlich, D. und Gradl, D.** (2004). Autoregulation of canonical Wnt signaling controls midbrain development. *Dev Biol* **273**, 390-401.
- **Kuo, J. S., Patel, M., Gamse, J., Merzdorf, C., Liu, X., Apekin, V. und Sive, H.** (1998). Opl: a zinc finger protein that regulates neural determination and patterning in *Xenopus*. *Development* **125**, 2867-82.
- **Kuroda, H., Wessely, O. und De Robertis, E. M.** (2004). Neural induction in *Xenopus*: requirement for ectodermal and endomesodermal signals via Chordin, Noggin, beta-Catenin, and Cerberus. *PLoS Biol* **2**, E92.
- **LaFlamme, S. E. und Dawid, I. B.** (1990). Differential keratin gene expression during the differentiation of the cement gland of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* **137**, 414-8.
- **LaFlamme, S. E., Jamrich, M., Richter, K., Sargent, T. D. und Dawid, I. B.** (1988). *Xenopus* endo B is a keratin preferentially expressed in the embryonic notochord. *Genes Dev* **2**, 853-62.
- **Lang, L., Miskovic, D., Lo, M. und Heikkila, J. J.** (2000). Stress-induced, tissue-specific enrichment of hsp70 mRNA accumulation in *Xenopus laevis* embryos. *Cell Stress Chaperones* **5**, 36-44.
- **Le Douarin, N. M. und Smith, J.** (1988). Development of the peripheral nervous system from the neural crest. *Annu Rev Cell Biol* **4**, 375-404.

- **Letamendia, A., Labbe, E. und Attisano, L.** (2001). Transcriptional regulation by Smads: crosstalk between the TGF-beta and Wnt pathways. *J Bone Joint Surg Am* **83-A Suppl 1**, S31-9.
- **Levanon, D., Goldstein, R. E., Bernstein, Y., Tang, H., Goldenberg, D., Stifani, S., Paroush, Z. und Groner, Y.** (1998). Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11590-5.
- **Lien, W. H., Klezovitch, O., Fernandez, T. E., Delrow, J. und Vasioukhin, V.** (2006). alphaE-catenin controls cerebral cortical size by regulating the hedgehog signaling pathway. *Science* **311**, 1609-12.
- **Lin, R., Thompson, S. und 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.
- **Liu, F., van den Broek, O., Destree, O. und Hoppler, S.** (2005). Distinct roles for *Xenopus* Tcf/Lef genes in mediating specific responses to Wnt/beta-catenin signalling in mesoderm development. *Development* **132**, 5375-85.
- **Matsumoto, K., Aoki, K., Dohmae, N., Takio, K. und Tsujimoto, M.** (2000). CIRP2, a major cytoplasmic RNA-binding protein in *Xenopus* oocytes. *Nucleic Acids Res* **28**, 4689-97.
- **Merrill, B. J., Gat, U., DasGupta, R. und Fuchs, E.** (2001). Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin. *Genes Dev* **15**, 1688-705.
- **Merrill, B. J., Pasolli, H. A., Polak, L., Rendl, M., Garcia-Garcia, M. J., Anderson, K. V. und Fuchs, E.** (2004). Tcf3: a transcriptional regulator of axis induction in the early embryo. *Development* **131**, 263-74.
- **Mertz, J. A., Kobayashi, R. und Dudley, J. P.** (2007). ALY is a common coactivator of RUNX1 and c-Myb on the type B leukemogenic virus enhancer. *J Virol* **81**, 3503-13.
- **Miller, J. R., Rowning, B. A., Larabell, C. A., Yang-Snyder, J. A., Bates, R. L. und Moon, R. T.** (1999). Establishment of the dorsal-ventral axis in *Xenopus* embryos coincides with the dorsal enrichment of dishevelled that is dependent on cortical rotation. *J Cell Biol* **146**, 427-37.
- **Miyatani, S., Winkles, J. A., Sargent, T. D. und Dawid, I. B.** (1986). Stage-specific keratins in *Xenopus laevis* embryos and tadpoles: the XK81 gene family. *J Cell Biol* **103**, 1957-65.
- **Molenaar, M., Roose, J., Peterson, J., Venanzi, S., Clevers, H. und Destree, O.** (1998). Differential expression of the HMG box transcription factors XTcf-3 and XLef-1 during early *Xenopus* development. *Mech Dev* **75**, 151-4.
- **Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O. und Clevers, H.** (1996). XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* **86**, 391-9.
- **Moody, S. A. und Je, H. S.** (2002). Neural induction, neural fate stabilization, and neural stem cells. *ScientificWorldJournal* **2**, 1147-66.

- **Mostowska, A., Biedziak, B. und Jagodzinski, P. P.** (2006). Axis inhibition protein 2 (AXIN2) polymorphisms may be a risk factor for selective tooth agenesis. *J Hum Genet* **51**, 262-6.
- **Muncan, V., Faro, A., Haramis, A. P., Hurlstone, A. F., Wienholds, E., van Es, J., Korving, J., Begthel, H., Zivkovic, D. und Clevers, H.** (2007). T-cell factor 4 (Tcf712) maintains proliferative compartments in zebrafish intestine. *EMBO Rep* **8**, 966-73.
- **Munoz-Sanjuan, I., Bell, E., Altmann, C. R., Vonica, A. und Brivanlou, A. H.** (2002). Gene profiling during neural induction in *Xenopus laevis*: regulation of BMP signaling by post-transcriptional mechanisms and TAB3, a novel TAK1-binding protein. *Development* **129**, 5529-40.
- **Munoz-Sanjuan, I. und Brivanlou, A. H.** (2002). Neural induction, the default model and embryonic stem cells. *Nat Rev Neurosci* **3**, 271-80.
- **Nacken, W.** (1997). Members of the AAA-gene family are involved in early embryogenesis of vertebrates. *Biochim Biophys Acta* **1354**, 1-6.
- **Nagata, S., Nakanishi, M., Nanba, R. und Fujita, N.** (2003). Developmental expression of XEEL, a novel molecule of the *Xenopus* oocyte cortical granule lectin family. *Dev Genes Evol* **213**, 368-70.
- **Niehrs, C.** (2004). Regionally specific induction by the Spemann-Mangold organizer. *Nat Rev Genet* **5**, 425-34.
- **Niehrs, C. und Pollet, N.** (1999). Synexpression groups in eukaryotes. *Nature* **402**, 483-7.
- **Nieuwkoop, P. D., Botternenbrood, E. C., Kremer, A., Bloesma, F. F. S. N., Hoessels, E. L. M. J., Meyer, G. und Verheyen, F. J.** (1952). Activation and organization of the central nervous system in amphibians. *J Exp Zool* **120**, 1-108.
- **Nieuwkoop, P. D. und Faber, J.** (1967). Normtabelle von *Xenopus laevis*. Elsevier Noth-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- **Nieuwkoop, P. D. und Nigtevecht, G. V.** (1954). Neural activation and transformation in explants of competent ectoderm under the influence of fragments of anterior notochord in urodeles. *J Embryol Exp Morphol* **2**, 175-193.
- **Nishita, M., Hashimoto, M. K., Ogata, S., Laurent, M. N., Ueno, N., Shibuya, H. und Cho, K. W.** (2000). Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature* **403**, 781-5.
- **Novoselov, V. V., Alexandrova, E. M., Ermakova, G. V. und Zraisky, A. G.** (2003). Expression zones of three novel genes about the developing anterior neural plate of *Xenopus* embryo. *Gene Expr Patterns* **3**, 225-30.
- **Olguin, P., Oteiza, P., Gamboa, E., Gomez-Skarmeta, J. L. und Kukuljan, M.** (2006). RE-1 silencer of transcription/neural restrictive silencer factor modulates ectodermal patterning during *Xenopus* development. *J Neurosci* **26**, 2820-9.
- **Ou, W. J., Thomas, D. Y., Bell, A. W. und Bergeron, J. J.** (1992). Casein kinase II phosphorylation of signal sequence receptor alpha and the associated membrane chaperone calnexin. *J Biol Chem* **267**, 23789-96.

- **Park, J. I., Ji, H., Jun, S., Gu, D., Hikasa, H., Li, L., Sokol, S. Y. und McCrea, P. D.** (2006). Frodo links Dishevelled to the p120-catenin/Kaiso pathway: distinct catenin subfamilies promote Wnt signals. *Dev Cell* **11**, 683-95.
- **Pelegri, F. und Maischein, H. M.** (1998). Function of zebrafish beta-catenin and TCF-3 in dorsoventral patterning. *Mech Dev* **77**, 63-74.
- **Peng, Y., Yang, P. H., Tanner, J. A., Huang, J. D., Li, M., Lee, H. F., Xu, R. H., Kung, H. F. und Lin, M. C.** (2006). Cold-inducible RNA binding protein is required for the expression of adhesion molecules and embryonic cell movement in *Xenopus laevis*. *Biochem Biophys Res Commun* **344**, 416-24.
- **Pera, E. M., Ikeda, A., Eivers, E. und De Robertis, E. M.** (2003). Integration of IGF, FGF, and anti-BMP signals via Smad1 phosphorylation in neural induction. *Genes Dev* **17**, 3023-8.
- **Pereira, L., Yi, F. und Merrill, B. J.** (2006). Repression of Nanog gene transcription by Tcf3 limits embryonic stem cell self-renewal. *Mol Cell Biol* **26**, 7479-91.
- **Peter, M., Le Peuch, C., Labbe, J. C., Meyer, A. N., Donoghue, D. J. und Doree, M.** (2002). Initial activation of cyclin-B1-cdc2 kinase requires phosphorylation of cyclin B1. *EMBO Rep* **3**, 551-6.
- **Pollet, N., Muncke, N., Verbeek, B., Li, Y., Fenger, U., Delius, H. und Niehrs, C.** (2005). An atlas of differential gene expression during early *Xenopus* embryogenesis. *Mech Dev* **122**, 365-439.
- **Pollice, A., Nasti, V., Ronca, R., Vivo, M., Lo Iacono, M., Calogero, R., Calabro, V. und La Mantia, G.** (2004). Functional and physical interaction of the human ARF tumor suppressor with Tat-binding protein-1. *J Biol Chem* **279**, 6345-53.
- **Prieve, M. G., Guttridge, K. L., Munguia, J. und Waterman, M. L.** (1998). Differential importin-alpha recognition and nuclear transport by nuclear localization signals within the high-mobility-group DNA binding domains of lymphoid enhancer factor 1 and T-cell factor 1. *Mol Cell Biol* **18**, 4819-32.
- **Pukrop, T., Gradl, D., Henningfeld, K. A., Knöchel, W., Wedlich, D. und Kühl, M.** (2001). Identification of two regulatory elements within the high mobility group box transcription factor XTCF-4. *J Biol Chem* **276**, 8968-78.
- **Quinlan, R. A., Schiller, D. L., Hatzfeld, M., Achtstatter, T., Moll, R., Jorcano, J. L., Magin, T. M. und Franke, W. W.** (1985). Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments. *Ann N Y Acad Sci* **455**, 282-306.
- **Ratti, A., Fallini, C., Cova, L., Fantozzi, R., Calzarossa, C., Zennaro, E., Pascale, A., Quattrone, A. und Silani, V.** (2006). A role for the ELAV RNA-binding proteins in neural stem cells: stabilization of Msi1 mRNA. *J Cell Sci* **119**, 1442-52.
- **Salzberg, A., Elias, S., Nachaliel, N., Bonstein, L., Henig, C. und Frank, D.** (1999). A Meis family protein caudalizes neural cell fates in *Xenopus*. *Mech Dev* **80**, 3-13.
- **Schlosser, G. und Ahrens, K.** (2004). Molecular anatomy of placode development in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* **271**, 439-66.
- **Schneider, S., Steinbeisser, H., Warga, R. M. und Hausen, P.** (1996). Beta-catenin translocation into nuclei demarcates the dorsalizing centers in frog and fish embryos. *Mech Dev* **57**, 191-8.

- **Seo, S., Herr, A., Lim, J. W., Richardson, G. A., Richardson, H. und Kroll, K. L.** (2005a). Geminin regulates neuronal differentiation by antagonizing Brg1 activity. *Genes Dev* **19**, 1723-34.
- **Seo, S. und Kroll, K. L.** (2006). Geminin's double life: chromatin connections that regulate transcription at the transition from proliferation to differentiation. *Cell Cycle* **5**, 374-9.
- **Seo, S., Richardson, G. A. und Kroll, K. L.** (2005b). The SWI/SNF chromatin remodeling protein Brg1 is required for vertebrate neurogenesis and mediates transactivation of Ngn and NeuroD. *Development* **132**, 105-15.
- **Shin, Y., Kitayama, A., Koide, T., Peiffer, D. A., Mochii, M., Liao, A., Ueno, N. und Cho, K. W.** (2005). Identification of neural genes using *Xenopus* DNA microarrays. *Dev Dyn* **232**, 432-44.
- **Sive, H. L., Hattori, K. und Weintraub, H.** (1989). Progressive determination during formation of the anteroposterior axis in *Xenopus laevis*. *Cell* **58**, 171-80.
- **Smith, D. J.** (1988). The complete sequence of a frog alpha-tubulin gene and its regulated expression in mouse L-cells. *Biochem J* **249**, 465-72.
- **Snir, M., Ofir, R., Elias, S. und Frank, D.** (2006). *Xenopus laevis* POU91 protein, an Oct3/4 homologue, regulates competence transitions from mesoderm to neural cell fates. *Embo J* **25**, 3664-74.
- **Spemann, H. und Mangold, H.** (1924) Über Induktion von Embryonanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* **100**, 599-638
- **Standley, H. J., Destree, O., Kofron, M., Wylie, C. und Heasman, J.** (2006). Maternal XTcf1 and XTcf4 have distinct roles in regulating Wnt target genes. *Dev Biol* **289**, 318-28.
- **Stasiak, P. C., Purkis, P. E., Leigh, I. M. und Lane, E. B.** (1989). Keratin 19: predicted amino acid sequence and broad tissue distribution suggest it evolved from keratinocyte keratins. *J Invest Dermatol* **92**, 707-16.
- **Stern, C. D.** (2006). Neural induction: 10 years on since the 'default model'. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 692-7.
- **Stern, C. D., Charite, J., Deschamps, J., Duboule, D., Durston, A. J., Kmita, M., Nicolas, J. F., Palmeirim, I., Smith, J. C. und Wolpert, L.** (2006). Head-tail patterning of the vertebrate embryo: one, two or many unresolved problems? *Int J Dev Biol* **50**, 3-15.
- **Sullivan, S. A., Akers, L. und Moody, S. A.** (2001). foxD5a, a *Xenopus* winged helix gene, maintains an immature neural ectoderm via transcriptional repression that is dependent on the C-terminal domain. *Dev Biol* **232**, 439-57.
- **Sun, T. T., Tseng, S. C., Huang, A. J., Cooper, D., Schermer, A., Lynch, M. H., Weiss, R. und Eichner, R.** (1985). Monoclonal antibody studies of mammalian epithelial keratins: a review. *Ann N Y Acad Sci* **455**, 307-29.
- **Tacke, R. und Manley, J. L.** (1995). The human splicing factors ASF/SF2 and SC35 possess distinct, functionally significant RNA binding specificities. *Embo J* **14**, 3540-51.

- **Tafari, S. R. und Wolffe, A. P.** (1990). *Xenopus* Y-box transcription factors: molecular cloning, functional analysis and developmental regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9028-32.
- **Takezaki, N., Figueroa, F., Zaleska-Rutczynska, Z., Takahata, N. und Klein, J.** (2004). The phylogenetic relationship of tetrapod, coelacanth, and lungfish revealed by the sequences of forty-four nuclear genes. *Mol Biol Evol* **21**, 1512-24.
- **Terada, K., Kitayama, A., Kanamoto, T., Ueno, N. und Furukawa, T.** (2006). Nucleosome regulator Xhmgb3 is required for cell proliferation of the eye and brain as a downstream target of *Xenopus* rax/Rx1. *Dev Biol* **291**, 398-412.
- **Thomas, J. O. und Travers, A. A.** (2001). HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **26**, 167-74.
- **Torpey, N., Wylie, C. C. und Heasman, J.** (1992). Function of maternal cytokeratin in *Xenopus* development. *Nature* **357**, 413-5.
- **Tyson-Capper, A. J., Bailey, J., Krainer, A. R., Robson, S. C. und Europe-Finner, G. N.** (2005). The switch in alternative splicing of cyclic AMP-response element modulator protein CREM τ ₂ α (activator) to CREM α (repressor) in human myometrial cells is mediated by SRp40. *J Biol Chem* **280**, 34521-9.
- **Uchiumi, T., Fotovati, A., Sasaguri, T., Shibahara, K., Shimada, T., Fukuda, T., Nakamura, T., Izumi, H., Tsuzuki, T., Kuwano, M. et al.** (2006). YB-1 is important for an early stage embryonic development: neural tube formation and cell proliferation. *J Biol Chem* **281**, 40440-9.
- **Unterseher, F., Hefele, J. A., Giehl, K., De Robertis, E. M., Wedlich, D. und Schambony, A.** (2004). Paraxial protocadherin coordinates cell polarity during convergent extension via Rho A and JNK. *Embo J* **23**, 3259-69.
- **Valenta, T., Lukas, J. und 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**, 2369-80.
- **van de Wetering, M. und Clevers, H.** (1992). Sequence-specific interaction of the HMG box proteins TCF-1 and SRY occurs within the minor groove of a Watson-Crick double helix. *Embo J* **11**, 3039-44.
- **van Venrooy, S.** (2004). Einfluss der *Xenopus* LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren auf die anteriore-posteriore Musterung des ZNS. Diplomarbeit am Zoologischen Institut II. Chemie und Biowissenschaften. Karlsruhe, Universität Karlsruhe (TH).
- **Verbeek, S., Izon, D., Hofhuis, F., Robanus-Maandag, E., te Riele, H., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Wilson, A., MacDonald, H. R. und Clevers, H.** (1995). An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation. *Nature* **374**, 70-4.
- **Villanueva, S., Glavic, A., Ruiz, P. und Mayor, R.** (2002). Posteriorization by FGF, Wnt, and retinoic acid is required for neural crest induction. *Dev Biol* **241**, 289-301.
- **Virbasius, C. M., Wagner, S. und Green, M. R.** (1999). A human nuclear-localized chaperone that regulates dimerization, DNA binding, and transcriptional activity of bZIP proteins. *Mol Cell* **4**, 219-28.

- **Wada, I., Rindress, D., Cameron, P. H., Ou, W. J., Doherty, J. J., 2nd, Louvard, D., Bell, A. W., Dignard, D., Thomas, D. Y. und Bergeron, J. J.** (1991). SSR alpha and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* **266**, 19599-610.
- **Wells, L., Whelan, S. A. und Hart, G. W.** (2003). O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification. *Biochem Biophys Res Commun* **302**, 435-41.
- **Wessely, O., Agius, E., Oelgeschlager, M., Pera, E. M. und De Robertis, E. M.** (2001). Neural induction in the absence of mesoderm: beta-catenin-dependent expression of secreted BMP antagonists at the blastula stage in *Xenopus*. *Dev Biol* **234**, 161-73.
- **Williams, R. R., Azuara, V., Perry, P., Sauer, S., Dvorkina, M., Jorgensen, H., Roix, J., McQueen, P., Misteli, T., Merckenschlager, M. et al.** (2006). Neural induction promotes large-scale chromatin reorganisation of the Mash1 locus. *J Cell Sci* **119**, 132-40.
- **Wilson, P. A. und Hemmati-Brivanlou, A.** (1995). Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. *Nature* **376**, 331-3.
- **Winkles, J. A., Sargent, T. D., Parry, D. A., Jonas, E. und Dawid, I. B.** (1985). Developmentally regulated cytokeratin gene in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol* **5**, 2575-81.
- **Wong, J. F., Ma, D. P., Wilson, R. K. und Roe, B. A.** (1983). DNA sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial heavy and light strand replication origins and flanking tRNA genes. *Nucleic Acids Res* **11**, 4977-95.
- **Yang, C. und Carrier, F.** (2001). The UV-inducible RNA-binding protein A18 (A18 hnRNP) plays a protective role in the genotoxic stress response. *J Biol Chem* **276**, 47277-84.
- **Yang, R., Weber, D. J. und Carrier, F.** (2006). Post-transcriptional regulation of thioredoxin by the stress inducible heterogenous ribonucleoprotein A18. *Nucleic Acids Res* **34**, 1224-36.
- **Yenari, M. A., Giffard, R. G., Sapolsky, R. M. und Steinberg, G. K.** (1999). The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). *Mol Med Today* **5**, 525-31.
- **Young, R. M., Reyes, A. E. und Allende, M. L.** (2002). Expression and splice variant analysis of the zebrafish tcf4 transcription factor. *Mech Dev* **117**, 269-73.
- **Zahler, A. M., Lane, W. S., Stolk, J. A. und Roth, M. B.** (1992). SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev* **6**, 837-47.

Anhang

Anhang-Tabellen

Anhang-Tab. 1 Vollständige Auflistung der *Tcf3*-Zielgen-Kandidaten entsprechend ihrer Häufigkeit.

Zytosk.: Zytoskelett; AGR: Anterior Gradient; RNA-B.: RNA-Bindung; DNA-B.: DNA-Bindung; Chap.: Chaperon; Transl.: Translation; Metab.: Metabolismus; Signaltr.: Signaltransduktion; Ves.Tr.: Vesikel-Transport; Fettsre.-Syn.: Fettsäure-Synthese; n. e.: nicht eindeutig.

Häufigkeit	Gen	Bemerkungen	Zugangsnummer	Referenz	Funktion
23	<i>alpha-Tubulin</i>	<i>tubulin, alpha 1</i>	BC106380	Smith, 1988	Zytosk.
19		<i>cytokeratin type II</i>	NM_001087056	Franz und Franke, 1986	Zytosk.
12	<i>xag2</i>	<i>Xenopus anterior gradient 2, np77</i>	NM_001088200	Sive et al., 1989	AGR
11	<i>cirp</i>	<i>cold inducible RNA-binding protein, cirbp</i>	NM_001086600	Peng et al., 2006	RNA-B.
9		mitochondriale DNA	M10217	Wong et al., 1983	n. e.
7	<i>hmg2</i>	<i>high mobility group HMG-17, hmg-17</i>	NM_001088261	Körner et al., 2003	DNA-B.
6		hypothetical protein homolog zu <i>XK81B2</i>	NM_001088963	Miyatani et al., 1986	Zytosk.
5		<i>similar to nuclease sensitive element binding protein 1</i>	NM_001085898	Tafari and Wolffe, 1990	RNA-B.
5	<i>xeel</i>	<i>embryonic epidermal lectin</i>	NM_001089101	Nagata et al., 2003	n. e.
4	<i>xag</i>	hypothetical protein homolog zu <i>np77</i>	NM_001086198	Sive et al., 1989	AGR
4	<i>krt18</i>	<i>keratin 18</i>	NM_001087341	LaFlamme et al., 1988	Zytosk.
3		<i>cytoplasmic beta actin</i>	AF079161		Zytosk.
3	<i>hsc70</i>	<i>heat shock cognate protein 70</i>	NM_001086599	Lang et al., 2000	Chap.
3	<i>rps27</i>	<i>ribosomal protein S27</i>	NM_001087225	Klein et al., 2002	Transl.
3		<i>similar to anterior gradient 2 homolog</i>	NM_001086251	Klein et al., 2002	AGR
2		<i>similar alpha Tubulin</i>	NM_001086054	Klein et al., 2002	Zytosk.
2	<i>gfpt1</i>	<i>glutamine fructose-6-phosphate transaminase 1</i>	NM_001087014	Klein et al., 2002	Metab.
2	<i>hmg1</i>	<i>high-mobility group nucleosome binding domain 1</i>	NM_001087294	Körner et al., 2003	DNA-B.
2	<i>rps2e</i>	<i>ribosomal protein S2e</i>	NM_001087413	Gawantka et al., 1998	Transl.
2	<i>sfrs2</i>	<i>splicing factor, arginine/serine-rich 2</i>	NM_001087274	Klein et al., 2002	RNA-B.
2		<i>beta-Tubulin</i>	NM_001087097	Bieker und Yazdani-Buicky, 1992	Zytosk.
2	<i>cgs</i>	<i>cement gland specific protein</i>	BC128956	Novoselov et al., 2003	AGR
2	<i>eef1a-s</i>	<i>eukaryotic elongation factor 1 alpha, somatic form</i>	NM_001087442	Krieg et al., 1989	Transl.
2		hypothetical protein homolog zu <i>X. tropicalis ribosomal protein S4</i>	NM_001097003	Takezaki et al., 2004	Transl.
1	<i>cirp2</i>	<i>cold-inducible RNA binding protein 2, xcirp2</i>	NM_001086325	Matsumoto et al., 2000	RNA-B.
1	<i>hmg3</i>	<i>high mobility group box 3b, hmgb3b</i>	NM_001095694	Terada et al., 2006	DNA-B.
1	<i>xk70</i>	<i>xk70</i>	NM_001087819	Winkles et al., 1985	Zytosk.
1		hypothetical protein homolog zu <i>Danio 40S ribosomal protein S30</i>	NM_001096142	Klein et al., 2002	n. e.

Anhang

Häufigkeit	Gen	Bemerkungen	Zugangsnummer	Referenz	Funktion
1	<i>ywhaq</i>	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide</i>	NM_001086903	Klein et al., 2002	Signaltr.
1	<i>calr</i>	<i>calreticulin</i>	NM_001087296	Treves et al., 1992	Signaltr.
1		<i>similar to alpha-tubulin at 84B</i>	NM_001086054	Klein et al., 2002	Zytosk.
1		vermutlich 3'UTR zu <i>X. laevis caveolin-3</i>	BC099319	Klein et al., 2002	Ves.Tr.
1	<i>elov1</i>	<i>elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3 yeast)-like 1</i>	NM_001086902	Klein et al., 2002	Fettsre.-Syn.
1	<i>hdlbp</i>	<i>high density lipoprotein binding protein (vigilin)</i>	BC044314	Klein et al., 2002	RNA-B.
1		<i>similar to heterogenous nuclear ribonucleoprotein D-like</i>	NM_001086140	Klein et al., 2002	RNA-B.
1		<i>similar to DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2</i>	NM_001086217	Klein et al., 2002	Chap.
1		homolog zu humanem <i>ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein</i>	BC129744	Klein et al., 2002	n. e.
1		hypothetical protein MGC132029	BC111503	Klein et al., 2002	n. e.
1		hypothetical protein homolog zu murinem <i>ribosomal protein, large, P1</i>	NM_001090161	Klein et al., 2002	Transl.
1	<i>rpl3</i>	<i>ribosomal protein L3</i>	NM_001086872	Klein et al., 2002	Transl.
1		hypothetical protein homolog zu humanem <i>ribosomal protein L32</i>	NM_001093837	Klein et al., 2002	Transl.
1		hypothetical protein homolog zu <i>X. tropicalis ribosomal protein S16</i>	NM_001091744	Klein et al., 2002	Transl.
1		<i>ribosomal protein S19</i>	V01443	Amaldi et al., 1982	Transl.
1		<i>similar to splicing factor, arginine/serine-rich 5</i>	BC044284	Voigt et al., 2005	RNA-B.
1	<i>slc25a5</i>	<i>solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine translocator), member 5</i>	NM_001087026	Klein et al., 2002	n. e.
1		MGC80249 protein homolog zu murinem <i>small nuclear ribonucleoprotein E</i>	NM_001092031	Klein et al., 2002	RNA-B.
1		<i>XK81A1 keratin</i>	X04668	Miyatani et al., 1986	Zytosk.
1			CT030625		n. e.
1			AF549891		n. e.
4		keine signifikante Übereinstimmung zu bekannten Datenbank-Sequenzen			
17		Sequenz unleserlich			

Anhang-Tab. 2 Vollständige Auflistung der *Tcf4*-Zielgen-Kandidaten entsprechend ihrer Häufigkeit

Transl.: Translation; Zytosk.: Zytoskelett; Proteas.: Proteasom; DNA-B.: DNA-Bindung; ER: Endoplasmatisches Reticulum; Ionenk.: Ionenkanal; DNA-Sy.: DNA-Synthese; Signaltr.: Signaltransduktion; Zellzyk.: Zellzyklus; RNA-B.: RNA-Bindung; Transk.: Transkription; Nucleo.: Nucleosom; Chap.: Chaperon; n. e.: nicht eindeutig.

Häufigkeit	Gen	Bemerkungen	Zugangsnummer	Referenz	Funktion
112	<i>eef1a-o1</i>	<i>elongation factor 1 alpha, oocyte form</i>	NM_001086133	Dje et al., 1990	Transl.
5	<i>xk70</i>	<i>xk70</i>	NM_001087819	Winkles et al., 1985	Zytosk.
3	<i>psmc3</i>	<i>proteasome (prosome, macropain) 26 S subunit, ATPase 3</i>	NM_001086780	Nacken, 1997	Proteas.
3		hypothetical protein homolog zu <i>X. tropicalis ribosomal potein L35</i>	NM_001096138	Klein et al., 2002	Transl.
2	<i>hmg2</i>	<i>high mobility group HMG-17, hmg-17</i>	NM_001088261	Körner et al., 2003	DNA-B.
2		<i>chloride channel; clc-5</i> (48% von 104 bp übereinstimmend)	Y09940		Ionenk.
2		mitochondriale DNA	M10217	Wong et al., 1983	n. e.
2		hypothetical portein homolog zu <i>X. tropicalis ribosomal protein S23</i>	NM_001093433	Klein et al., 2002	Transl.
2	<i>rrm1</i>	<i>similar to ribonucleotide reductase M1</i>	NM_001090843	Klein et al., 2002	DNA-Sy.
2		hypothetical protein homolog zu muriner <i>serine/threonine kinase 24</i>	NM_001092259	Klein et al., 2002	Signaltr.
1	<i>hmg1</i>	<i>high-mobility group nucleosome binding domain 1</i>	NM_001087294	Körner et al., 2003	DNA-B.
1	<i>hmg3</i>	<i>high mobility group box 3</i>	NM_001087116	Terada et al., 2006	DNA-B.
1	<i>hmg-x</i>	<i>similar to high mobility group box 2; hmg-x</i>	NM_001085918	Kinoshita et al., 1994	DNA-B.
1	<i>simBtg1</i>	<i>similar to B-cell translocation gene 1</i>	NM_001085911	Gawantka et al., 1998	Zellzyk.
1		MGC84169 protein homolog zu <i>R. norvegicus PREDICTED: similar to THO complex subunit 4 (Tho 4) (RNA and export factor binding protein 1) (REF1-I) (Ally of AML-1 and LEF-1) (Aly/REF) isoform 2</i>	NM_001092746	Bruhn et al., 1997	RNA-B.
1		hypothetical protein homolog zu <i>similar to signal sequence receptor, alpha</i>	NM_001086452	Ou et al., 1992	ER
1	<i>crc</i>	<i>calreticulin</i>	NM_001086627	Treves et al., 1992	Signaltr.
1	<i>crop</i>	<i>cisplatin resistance-associated overexpressed protein</i>	NM_001096916	Cazalla et al., 2005	RNA-B.
1		homolog zu murinem <i>elongation factor 1 homolog (ELF1)</i>	BC071070	Klein et al., 2002	Transk.
1	<i>epid21</i>		DQ096899	Pollet et al., 2000	n. e.
1		<i>fusion, derived from t(12;16) malignant liposarcoma (human) (fus)</i>	NM_001086914	Klein et al., 2002	RNA-B.
1		<i>histone H2A</i>	M21287	Perry et al., 1985	Nucleo.
1		<i>ribonucleoprotein (LOC397773)</i>	NM_001087851	Good et al., 1993	RNA-B.
1	<i>hnrpab</i>	<i>heterogenous ribonucleoprotein A/B</i>	NM_001087020	Czaplinski et al., 2005	RNA-B.
1	<i>hsc70</i>	<i>heat shock cognate protein 70</i>	NM_001086599	Smith et al., 2005	Chap.

Anhang

Häufigkeit	Gen	Bemerkungen	Zugangsnummer	Referenz	Funktion
1	<i>lap2 omega</i>	<i>nucleomorph mRNA for lamina-associated polypeptide 2 omega</i>	AJ514937	Schoft et al., 2003	Zellzyk.
1		homolog zu <i>X. tropicalis prothymosin, alpha</i>	NM_001094011	Klein et al., 2002	n. e.
1		hypothetical protein homolog zu humanem <i>ribosomal protein L7</i>	NM_001096628	Klein et al., 2002	Transl.
1	<i>rpl9</i>	<i>ribosomal protein L9</i>	NM_001087300	Klein et al., 2002	Transl.
1		<i>similar to ribosomal protein L17</i>	BC043971	Klein et al., 2002	Transl.
1		hypothetical protein homolog zu humanem <i>similar to ribosomal protein L23a</i>	NM_001093830	Klein et al., 2002	Transl.
1		hypothetical protein homolog zu <i>similar to signal sequence receptor, alpha</i>	NM_001086452	Ou et al., 1992	Transl.
1	<i>rpl27</i>	<i>ribosomal protein L27</i>	NM_001086954	Klein et al., 2002	Transl.
1		hypothetical protein homolog zu humanem <i>ribosomal protein L31</i>	NM_001091241	Klein et al., 2002	Transl.
1	<i>rps8</i>	<i>ribosomal protein S8</i>	NM_001087374	Klein et al., 2002	Transl.
1	<i>rps8B</i>	<i>ribosomal protein S8</i>	NM_001091033	Mariottini et al., 1988	Transl.
1	<i>xtr</i>	<i>tudor repeat protein</i>	AB191036	Hiyoshi et al., 2005	RNA-B.
1		keine signifikante Übereinstimmung zu bekannten Datenbank-Sequenzen			
13		Sequenz unleserlich			

Anhang-Literatur

- **Amaldi, F., Beccari, E., Bozzoni, I., Luo, Z. X. und Pierandrei-Amaldi, P.** (1982). Nucleotide sequences of cloned cDNA fragments specific for six *Xenopus laevis* ribosomal proteins. *Gene* **17**, 311-6.
- **Cazalla, D., Newton, K. und Caceres, J. F.** (2005). A novel SR-related protein is required for the second step of Pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol* **25**, 2969-80.
- **Czaplinski, K., Kocher, T., Schelder, M., Segref, A., Wilm, M. und Mattaj, I. W.** (2005). Identification of 40LoVe, a *Xenopus* hnRNP D family protein involved in localizing a TGF-beta-related mRNA during oogenesis. *Dev Cell* **8**, 505-15.
- **Good, P. J., Rebbert, M. L. und Dawid, I. B.** (1993). Three new members of the RNP protein family in *Xenopus*. *Nucleic Acids Res* **21**, 999-1006.
- **Hiyoshi, M., Nakajo, N., Abe, S. und Takamune, K.** (2005). Involvement of Xtr (*Xenopus* tudor repeat) in microtubule assembly around nucleus and karyokinesis during cleavage in *Xenopus laevis*. *Dev Growth Differ* **47**, 109-17.
- **Mariottini, P., Bagni, C., Annesi, F. und Amaldi, F.** (1988). Isolation and nucleotide sequences of cDNAs for *Xenopus laevis* ribosomal protein S8: similarities in the 5' and 3' untranslated regions of mRNAs for various r-proteins. *Gene* **67**, 69-74.
- **Perry M., Thomsen, G. H. und Roeder, R. G.** (1985). Genomic organization and nucleotide sequence of two distinct histone gene clusters from *Xenopus laevis*: Identification of novel conserved upstream sequence elements. *J Biol Chem* **260**, 479-499.
- **Pollet, N., Schmidt, H. A., Gawantka, V., Vingron, M. und Niehrs, C.** (2000). Axeldb: a *Xenopus laevis* database focusing on gene expression. *Nucleic Acids Res* **28**, 139-40.
- **Schoft, V. K., Beauvais, A. J., Lang, C., Gajewski, A., Prufert, K., Winkler, C., Akimenko, M. A., Paulin-Levasseur, M. and Krohne, G.** (2003). The lamina-associated polypeptide 2 (LAP2) isoforms beta, gamma and omega of zebrafish: developmental expression and behavior during the cell cycle. *J Cell Sci* **116**, 2505-17.
- **Treves, S., Zorzato, F. und Pozzan, T.** (1992). Identification of calreticulin isoforms in the central nervous system. *Biochem J* **287**, 579-81.
- **Voigt, J., Chen, J. A., Gilchrist, M., Amaya, E. und Papalopulu, N.** (2005). Expression cloning screening of a unique and full-length set of cDNA clones is an efficient method for identifying genes involved in *Xenopus* neurogenesis. *Mech Dev* **122**, 289-306.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Doris Wedlich nicht nur für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut für Molekulare Entwicklungs- und Zellphysiologie anzufertigen, sondern auch für die große Unterstützung und Förderung sowie die konstruktive Kritik.

Herrn Prof. Dr. Holger Puchta danke ich für die Übernahme des Korreferats und für die Erlaubnis, ein Teil der radioaktiven Experimente mit Hilfe der in seinem Institut vorhandenen Geräte durchzuführen.

Spezieller Dank gebührt meinem Betreuer PD Dr. Dietmar Gradl für seinen unerschütterlichen Optimismus und sein großes Engagement bei der Betreuung meiner Doktorarbeit.

Gerne möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Zoologischen Instituts II für eine angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre, die große Hilfsbereitschaft und Kollegialität bedanken.

Ein großer Dank geht auch an die Studienstiftung des deutschen Volkes, die mich nicht nur während meines Studiums, sondern auch bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit finanziell und ideell unterstützt hat.

Mein spezieller und besonderer Dank gilt meinem Lebenspartner Bartosz für sein Verständnis und die liebevolle Unterstützung.

Publikationen

Veröffentlichung

- **Ghogomu, S. M., van Venrooy, S., Ritthaler, M., Wedlich, D. und Gradl, D.** (2006). HIC-5 is a novel repressor of lymphoid enhancer factor/T-cell factor-driven transcription. *J Biol Chem* **281**, 1755-64.

Poster

- **van Venrooy S., Kunz M., Wedlich D. und Gradl D.** Lef/Tcf transcription factors modulate the specification of neural tissue. 28. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ). Heidelberg, März 2005.
- **van Venrooy S., Kunz M., Wedlich D., Gradl D.** Identification of TCF subtype specific target genes during early neural development in *Xenopus laevis*. 3rd Workshop on „Early developmental processes in vertebrates“. Dresden, Juli 2006.
- **van Venrooy S., Fichtner D., Wedlich D., Gradl D.** Identification of *XCIRP* as a novel and *XTcf-3* specific wnt target gene during early neural development in *Xenopus laevis*. 17. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Entwicklungsbiologie (GfE). Marburg, März 2007.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stephanie van Venrooy
Geburtsdatum: 01. Juni 1978
Geburtsort: Karlsruhe
Familienstand: ledig

Schulausbildung

1984-88 Südend-Grundschule, Karlsruhe
1988-97 Fichte-Gymnasium, Karlsruhe

Ausbildung im gehobenen Dienst

1997/98 Fachhochschule des Bundes für öffentliche Verwaltung, Mannheim
Diplomverwaltungswirtin (FH), Zwischenprüfung

Studium

1998-2004 Studiengang Diplom-Biologie, Universität Karlsruhe (TH)
Hauptfächer: Zoologie und Botanik
Nebenfächer: Mikrobiologie und Geologie

Diplomarbeit

Dezember 2003-
September 2004 „Einfluss der *Xenopus* LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren auf die anteriore-posteriore Musterung des ZNS“
Institut für Molekulare Entwicklungs- und Zellphysiologie,
Universität Karlsruhe (TH)

Promotion

Seit Oktober 2004 Institut für Molekulare Entwicklungs- und Zellphysiologie,
Universität Karlsruhe (TH)