

**Charakterisierung des *Paraxialen*
Protocadherins während der
Innenohrentwicklung**

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

Barbara Jung

aus Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referent: Prof. Dr. Doris Wedlich

Co-Referent: PD. Dr. Véronique Orian-Rousseau

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Oktober 2009

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde im Institut für Zell- und Entwicklungsbiologie (Zoologie II) der Universität Karlsruhe in der Zeit von Mai 2006 bis September 2009 durchgeführt.

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

Barbara Jung, Oktober 2009

Verwendete Abkürzungen und Spezialbegriffe

AP	Alkalische Phosphatase
aPKC	Atypische Proteinkinase C
ATF	cAMP-dependent Transcription Factor
Bmp	Bone Morphogenetic Protein
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin, Rinderserumalbumin
Ca	Konstitutiv aktiv
Cdc42	Cell Division Cycle 42, kleine GTPase
Celsr, Fmi	Cadherin EGF LAG 7-pass G-type Receptor, Flamingo
Ch	Chicken, Huhn
Dach	Dachsous
DAPI	4'-6-Diamidino-2-Phenylindol
Dlx	Distal-less Homeobox Protein
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle's Medium
Dn	Dominant negativ
Dsh	Dishevelled
E-Cadherin	Epitheliales Cadherin
EC	Extrazelluläre Cadherindomäne
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
Eya	Eyes Absent
FCS	Fetal Calf Serum, fötales Kälberserum
Fgf	Fibroblast Growth Factor
FL	Full length, vollständige Sequenz
Fmi, Celsr	Flamingo, Celsr Homolog
Fz	Frizzled
Foxi	Forkhead Box Protein I
Gbx	Gastrulation and Brain-specific Homeobox Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HH	Stadium nach Hamilton und Hamburger
HMG	High Mobility Group

ISH	In situ Hybridisierung
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Knockdown	Translationsunterdrückung
Knockout	Ausschalten eines Gens
Lfng	Lunatic Fringe
LRP	Density Lipoprotein Receptor
MAB	Maleic Acid Buffer, Maleinsäurepuffer
MBSH	Modified Barth's Solution High-salt
MEM	Modified Eagle's Medium
MKK	Map Kinase Kinase
Mo, Morpholino	<i>antisense</i> Morpholino Oligonukleotid
Msx	Muscle Segment Homeobox Protein
N-Cadherin	Neuronales Cadherin
PAPC	Paraxiales Protocadherin
Pax	Paired-Box
PBS, TBS	Phosphate Buffered Saline, Tris-buffered Saline
PCNS	Protocadherin in Neural Crest and Somites
PCP	Planar Cell Polarity, planare Zellpolarität
Rac1	Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate, kleine GTPase
RhoA	Ras Homologous Member A, kleine GTPase
Ror2	Orphan Rezeptor Tyrosinkinase2
Shh	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
Sox10	Sry related HMG Box 10
St	Stadium
Tbx	T-Box Transkriptionsfaktor
UTR	Untranslated Region
UV	Ultraviolett
Vangl	Van Gogh Like
Wnt	Wingless/INT-related
XB-Cadherin	<i>Xenopus</i> Blastomer Cadherin
ZO	Zonula Occludens

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Aufbau und Entwicklung des Vertebratenohrs	1
1.1.1 Aufbau des Innenohres von <i>Xenopus laevis</i>	1
1.2 Die Entwicklung des Innenohrs	2
1.2.1 Die Plakodeninduktion	2
1.2.2 Invagination, Innervierung und Musterung	5
1.2.3 Morphogenese und sensorische Epithelien	8
1.4 Die Familie der Cadherine	11
1.4.1 Klassische Cadherine	11
1.4.2 Das Paraxiale Protocadherin	13
1.4.3 Die Rolle von PAPC in <i>Xenopus</i>	16
1.4.4 Regulation der PAPC Genexpression	19
2 Zielsetzung	21
3 Materialien	22
4 Methoden	30
4.1 Entwicklungsbiologische Methoden	30
4.1.1 Haltung von <i>Xenopus laevis</i>	30
4.1.2 Eiablage	30
4.1.3 Testisextraktion	30
4.1.4 <i>In-vitro</i> -Fertilisation	31
4.1.5 Entfernen der Gallerthülle und Färbung mit Nilblau	31
4.1.6 Pflege der Embryonen und Fixierung	31
4.1.7 Mikroinjektion	32
4.1.8 Brut- und Pflegebedingungen von <i>Gallus domesticus</i>	32
4.1.9 Gewebekultur	32
4.1.10 <i>In ovo</i> Elektroporation	33
4.1.11 Gen-Suppression durch <i>antisense</i> -Morpholino Injektion	33
4.1.12 β -Galaktosidase Färbung	34
4.1.13 Synthese von RNA-Sonden für Ganzkeimfärbungen	34

4.1.14 Ganzkeimfärbung von <i>Xenopus laevis</i>	35
4.1.15 Gelatine-Albumin-Einbettung	36
4.1.16 Einbettung in Agarose und Anfertigung von Vibratomschnitten	37
4.1.17 Immunfärbung auf Agarose-und Kryostatschnitten	37
4.1.18 Anfertigung von Gefrierschnitten am Kryostat	37
4.1.19 Immunfärbung mit DAPI	38
4.2 Molekularbiologische und biochemische Methoden	38
4.2.1 Analytische Flachbett-Gelelektrophorese	38
4.2.2 Lösen von Plasmid-DNA aus Filterpapier	39
4.2.3 Restriktionsanalyse von DNA	39
4.2.4 Ethanolfällung von Nukleinsäuren	39
4.2.5 Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	40
4.2.6 Isolierung bakterieller Plasmid-DNA im Kleinmaßstab	40
4.2.7 Isolierung bakterieller Plasmid-DNA im Mittelmaßstab	40
4.2.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren durch das Photometer	41
4.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
4.2.10 Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	42
4.2.11 Sequenzanalyse	42
4.2.12 Gewinnung von RNA aus Gewebe	42
4.2.13 <i>In-vitro</i> -Transkription	43
5 Ergebnisse	44
5.1 Funktionelle Charakterisierung von PAPC während der Innenohrentwicklung	44
5.1.1 PAPC Expression während der Ohrentwicklung	44
5.1.2 Repression der PAPC Translation durch <i>antisense</i> -Morpholino- Oligonukleotide führen zu morphologischen Defekten der Otocyste	45
5.1.3 Nachweis der Spezifität der durch die PAPC Depletion bedingten Defekte in der Oocyte	46
5.1.4 PAPC ist nicht für die Innervierung der Otocyste erforderlich	48
5.1.5 PAPC hat keinen Einfluss auf die Induktion der Ohrplakode und Musterung der Otocyste	49
5.1.6 Die Bildung der Otlithen ist nicht von PAPC abhängig	50

5.1.7 Der Verlust von PAPC beeinflusst die Epithelstruktur der Otocyste	51
5.2 Eingrenzung der domänenspezifischen PAPC Funktion während der Ohrentwicklung	54
5.2.1 Sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre PAPC-Domäne sind essentiell für Ohrentwicklung	54
5.2.2 PAPC interagiert nicht mit Dishevelled im PCP Signalweg	56
5.2.3 Die Aktivierung von RhoA durch PAPC wird während der Ohrentwicklung benötigt	57
5.2.4 Die Funktion von PAPC kann nicht durch andere klassische Cadherine ersetzt werden	59
5.2.5 Die Funktion von PAPC kann durch das Protocadherin PCNS ersetzt werden	60
5.3 Die Rolle von Wnt5a und Ror2 während der Innenohrentwicklung	61
5.3.1 Wnt5a, Ror2 und Frizzled7 werden im Ohr exprimiert	61
5.3.2 Die Expression von PAPC in der Otocyste wird durch Wnt5a und Ror2 reguliert	62
5.3.3 Wnt5a/Ror2 spielen keine Rolle bei der Musterung der Otocyste	64
5.3.4 LRP6 während der Ohrentwicklung	64
5.3.5 Die Rolle von Frizzled7 bei der Ohrentwicklung ist noch unklar	65
5.4 Etablierung des Tiermodells Huhn	66
5.4.1 chPAPC Expressionsprofil der Otocyste	66
5.4.2 Inkulturnahme des isolierten Ohrgewebes	67
5.4.3 Etablierung der Manipulation am Embryo und Explantaten	68
5.4.4 Klonierung des gesamten chPAPC Konstruktes	69
6 Diskussion	71
6.1 Die Repression von PAPC führt zu spezifischen morphologischen Defekten	71
6.2 PAPC wird für die Ausbildung und Beibehaltung der Epithelstruktur benötigt	74
6.3 PAPC Signale benötigen extrazelluläre und cytoplasmatische Domäne	75
6.4 PAPC Signale in der Innenohrentwicklung werden unabhängig von Dishevelled über RhoA vermittelt	77
6.5 PCNS und PAPC haben eine phylogenetische und funktionelle Beziehung	79
6.6 Expressionsregulation von PAPC im Innenohr	80
6.7 Etablierung des Tiermodells Huhn- <i>Gallus gallus</i>	80

7 Zusammenfassung	83
8 Literaturverzeichnis	85
9 Anhang	101
Danksagung	
Publikationen	
Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Entwicklung des Vertebratenohrs

Das Ohr ist bei Vertebraten in drei funktionale Einheiten unterteilt, das äußere Ohr, das Mittelohr und das Innenohr. Das äußere Ohr ist bei den meisten, aber nicht allen, Säugetieren vorhanden. Es besteht aus einer Ohrmuschel (Pinna), die je nach Organismus verschiedene Phänotypen aufweisen kann und dem Gehörgang. Die Aufgabe der Ohrmuscheln ist zum einen als Schalltrichter die Gehörempfindlichkeit zu verstärken, zum anderen kann sie als Richtantenne Richtungsinformationen vermitteln. Da Schalldruck keine Richtungsinformation enthält, wird diese entweder durch die Ohrmuschel oder durch Differenzbildung der zwei Ohren gebildet (Moore, 2002).

Zum Mittelohr gehört das Trommelfell mit den anliegenden Gehörknöchelchen. Einkommender Schall wird durch das Trommelfeld, Amboss, Hammer und Steigbügel über das sogenannte ovale Fenster auf das Innenohr übertragen. Dies ist notwendig, da die Schallperzeption über den Flüssigkeitsdruck im Innenohr gemessen wird. Das Mittelohr dient also der Impedanzanpassung, der Übermittlung des Schalls vom Medium Luft in das Medium Flüssigkeit. Durch die Hebelwirkung der Gehörknöchelchen werden die Luftschallwellen ohne Verlust der Schwingungsamplitude auf die Flüssigkeitssäule im Ohr übertragen (Moore, 2002).

Das Innenohr hat bei allen Vertebraten die gleiche Aufgabe. Der vestibuläre Teil dient der Wahrnehmung des Gleichgewichts und der Beschleunigung, der auditorische Teil der Perzeption des Schalls. Dieser kann über die Luft, aber auch über Vibrationen im Boden vermittelt werden.

1.1.1 Aufbau des Innenohres von *Xenopus laevis*

Bei *Xenopus* findet sich kein äußeres Ohr, das Mittelohr ist aber wie bei allen Säugetieren ebenfalls ein luftgefüllter Hohlraum, obwohl *Xenopus* rein aquatisch lebt. Amphibien und Vögel besitzen zudem nicht drei, sondern nur ein Gehörknöchelchen, das als Columella bezeichnet wird. Ihm kommt aber die gleiche Funktion zu.

Nach Paterson (1948) kann man das Amphibienohr noch einmal unterteilen in Pars superior mit den Bogengängen und dem Utriculus (vestibuläres Organ), sowie dem Pars inferior, zu dem Sacculus, Lagena und die basilare und amphibische Papille gehören (akustisches Organ).

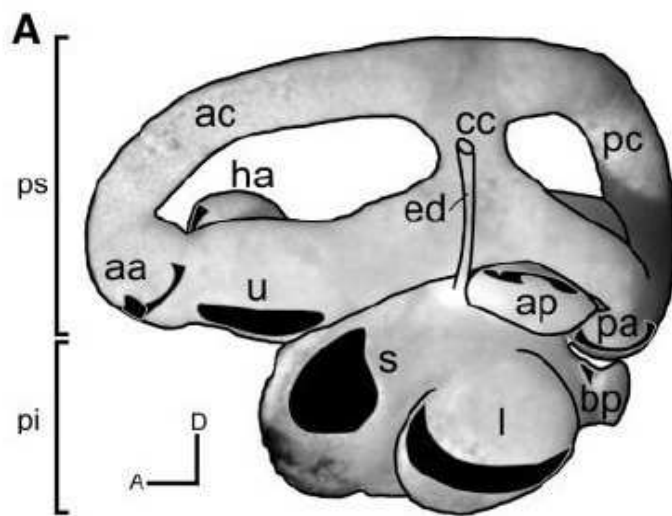


Abb. 1-1: Eine Skizze des Innenohrs von *Xenopus laevis*. Eingeteilt wird es in den vestibulären Apparat, den Pars superior (ps) und den akustischen Apparat, pars inferior (pi). Die Bogengänge, anterior (ac), posterior (pc) und horizontal (hc) enthalten die drei sensorischen Cristae in der anterioren (aa), horizontalen (ha) und posterioren Ampulle (pa). Der endolymphatische Gang (ed) mündet in den endolymphatischen Sack, der

aus Anschauungsgründen nicht eingezeichnet ist. Schwarze Flächen markieren die sensorische Felder des Utriculus (u), Sacculus (s), Lagena (l), sowie der basilaren (bp) und amphibischen Papille (ap). [Abbildung aus Miller-Bever et al., 2003]

Die sensorischen Felder des vestibulären Organs sind die drei Cristae der Bogengänge, sowie die utriculäre Macula (Abb.1-1). Die Lagena der Amphibien und Vogellohren ist das morphologische Analogon zur Gehörschnecke (Cochlea) bei Säugetieren. Die sensorische Macula der Lagena in Anuren dient vermutlich der Perzeption von akustischen Informationen, die in Form von Vibrationen eintreffen (Lewis und Narins, 1999). Die sacculäre Macula hat ähnliche Funktion, sie spricht auf Frequenzen unter 100 Hz an, wie zum Beispiel seismische Signale. Die eigentlichen Hörorgane die auf Schallwellen aus der Luft ansprechen, sind die amphibische und die basiläre Papille. Der Hörbereich liegt zwischen 200 bis 3900 Hz, wobei die amphibische Papille Töne unter 1000 Hz detektiert (Elepfandt, 1996; Wever, 1985). Die basiläre Papille perzipiert Frequenzen über 1000 Hz und sie ist häufig auf den Balzton der Anuren eingestellt (Lewis und Narins, 1999). Funktional und strukturell gesehen entspricht die amphibische Papille dem Hörorgan anderer Vertebraten (Fay und Popper, 1999). Allen sensorischen Feldern außer der basilären und amphibischen Ampulle liegen mineralisierte Otoconien auf (Bever et al., 2003).

1.2 Die Entwicklung des Innenohrs

1.2.1 Die Plakodeninduktion

Das komplette Innenohr der Vertebraten entwickelt sich aus einer ektodermalen epithelialen Verdickung, der sogenannten otischen Plakode. Sie ist der Vorläufer,

aus dem alle Innenohrstrukturen und –zelltypen, wie die Bogengänge, das Hörorgan, die biomineralisierten Otolithen, die mechanosensorischen Haarzellen, unterstützende Zellen und sogar die afferente Innenohrinnervierung entstehen. Die otische Plakode zählt zu den kranialen Plakoden. Sie werden an der Grenze zwischen Neuralplatte und Epidermis gebildet. Zu ihnen zählen unter anderem die Linsenplakode, die Plakoden des Seitenlinienorgans oder die olfaktorische Plakode. Die Entwicklung des Innenohres kann in mehrere Entwicklungsschritte unterteilt werden, die Induktion der otischen Plakode, die Invagination des Plakodenepithels zur Bildung der Otocyste, die Migration der Neuroblasten zur Bildung der afferenten Innervierung, die Musterung der Otocyste und die späte Morphogenese (Baker und Bronner-Fraser, 2001).

Die Induktion der Plakoden erfolgt in drei Teilschritten und die beteiligten Komponenten sind in verschiedenen Organismen nicht konserviert. Im ersten Schritt wird ein präplakodisches Areal spezifiziert, das generell Plakodenkompetenz besitzt (Abb. 1-2). Die Existenz dieses präplakodischen Feldes ist bisher noch umstritten (Streit, 2007). Im Fall der otischen Plakode folgt daraufhin die Spezifizierung des präotischen Areals, welches in einem dritten Schritt zur Abgrenzung der otischen Plakode führt (Abb. 1-2).

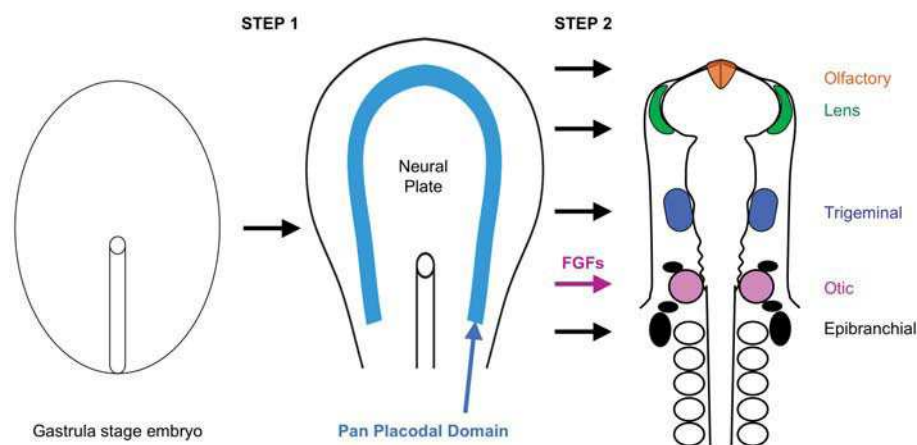


Abb. 1-2: Modell der Ohrinduktion. Im ersten Schritt wird eine präplakodische Domäne errichtet, die in einem Band um die anteriore Neuralplatte verläuft (blau). Durch die Kombination bestimmter Faktoren, wie zum Beispiel die Fgf's, werden im zweiten Schritt die cranialen Plakoden induziert. Hier eingezeichnet sind die olfaktorische Plakoden (orange), die Linsenplakoden (grün), die Trigeminale Plakoden (blau) und otische Plakoden (lila). [Ohyama et al., 2007]

Das präplakodische Feld wird bis Ende der Gastrula gebildet und es verläuft in einem breiten ektodermalen Band um die anteriore Neuralplatte (Baker und Bronner-Fraser,

2001; Streit, 2004; Brugmann und Moody, 2005; Bailey und Streit, 2006). Zunächst kommt es morphologisch gesehen in allen bisher untersuchten Organismen, mit Ausnahme von Huhn und Zebrafisch, zu einer Verdickung des präplakodischen Feldes (Platt, 1896; Knouff, 1935; van Oostrom und Verwoerd, 1972; Verwoerd und van Oostrom, 1979; O’Rahilly und Muller, 1985; Braun, 1996; Miyake et al., 1997; Baker und Bronner-Fraser, 2001; Streit, 2004). Das präplakodische Feld ist durch die Expression verschiedener Marker gekennzeichnet, deren Überexpression oder Inhibition zu einer Verbreiterung oder Verschmälerung führen kann (Brugmann et al., 2004, Glavic et al., 2004, Litsiou et al., 2005). Zu den exprimierten Markern gehören Proteine der Dlx, Eya, Six, Iro, Bmp, Msx und Foxi Familie (Glavic et al., 2004, Ohyama and Groves, 2004a, Streit, 2004, Brown et al., 2005).

Welche Faktoren genau für die nächsten Spezifizierungsschritte benötigt werden ist nicht bekannt. Eine wichtige Rolle spielen aber Fgf Signale aus dem Hinterhirn und dem paraxialen Mesoderm, welches dem präotischen Feld unterliegt (Abb. 1-2). In der Maus konnten Fgf10 und Fgf3, im Huhn Fgf19 und Fgf8, im Fisch Fgf8 und Fgf3 und in *Xenopus* Fgf3 als ausschlaggebende Faktoren identifiziert werden (Mahmood et al., 1995; McKay et al., 1996; Ladher et al., 2005; Reifers et al., 1998; Furthauer et al., 2001; Liu et al., 2003). Sie wirken zusammen mit den Proteinen der Dlx, Six, Eya, Dach und Foxi Familie, die im präplakodischen Feld exprimiert werden, um ein präotisches Areal abzugrenzen (Streit, 2004; Groves, 2005; Ohyama et al., 2007). Ob Fgf dabei downstream oder upstream dieser Faktoren liegt ist bisher noch nicht geklärt. So wird aus dem präplakodischen Feld ein präotisches Areal abgegrenzt, welches noch in otisches und nicht-otisches Gewebe unterteilt werden muss. Diese Feinabstimmung erfolgt durch Wnt Faktoren, die vom Hinterhirn sezerniert werden (Abb.1-3).

Dabei scheint Wnt8 eine wichtige Rolle zuzukommen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass andere Wnts in diesen Prozess involviert sind (Ladher et al., 2000). Diejenigen Zellen, die eine hohe Wnt Konzentration erhalten, werden zur otischen Plakode. Die Zellen die weniger Wnt Signal erhalten werden Epidermis (Abb. 1-3). Wichtig ist dabei aber, dass die Zellen bereits eine Kombination bestimmter Faktoren, wie zum Beispiel Pax2 und Eya1 exprimieren (Ohyama et al., 2006). Die Kooperation zwischen Fgf und Wnts führt zusätzlich zur Verstärkung der Expression verschiedener otischer Faktoren durch Enhancer Elemente, wie es unter anderem für Sox2 beschrieben ist (Takemoto et al., 2006; Ladher et al., 2000).

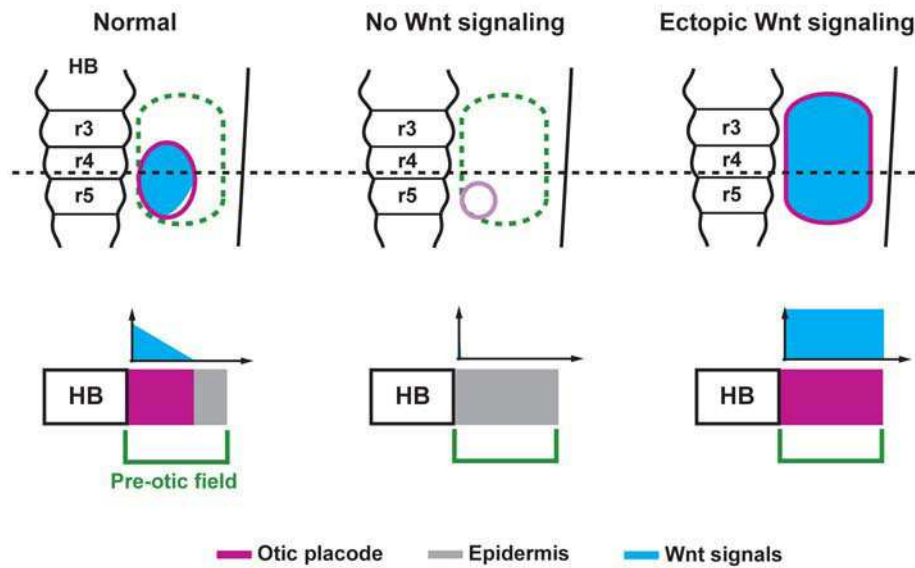


Abb. 1-3: Wnt Signale vermitteln Plakodenschicksal. Skizze einer Aufsicht auf das Hinterhirn (HB) einer Maus auf der Höhe von Rhombomeren 3/4/5 (r3, r4, r5). Im Normalfall wird der Wnt Signalweg (blau) in der präotischen Region (grün) aktiviert. Die Zellen, die ein starkes Wnt Signal erhalten, differenzieren zur otischen Plakode (lila), die Zellen mit schwachem Wnt Signal differenzieren zu epidermalen Zellen (grau). Werden Wnt Signale blockiert, erfahren alle Zellen der präotischen Region ein epidermales Schicksal. Wird, im umgekehrten Fall, in der gesamten präotischen Region β -Catenin stabilisiert, also der Wnt Signalweg aktiviert, dehnt sich die otische Plakode auf die gesamte präotische Region aus. [Abbildung aus Ohyama et al., 2007]

Der früheste bisher bekannte Ohrmarker ist *Foxi1* bei Zebrafisch (Solomon et al. 2003). Bei *Xenopus* und Maus ist *Pax8* der früheste otische Marker, gefolgt von *Pax2* (Pfeffer et al., 1998; Heller und Brändli, 1999; Groves und Bronner-Fraser, 2000). Weitere Faktoren, die noch vor der Invagination exprimiert werden sind *Gata3*, *Nkx5.1*, *Eya1*, *Sox3*, *Sox9*, *Gbx2*, *Bmp7*, sowie Faktoren der *Fgf* Familie (George et al., 1994; Rinkwitz-Brandt et al., 1995; Wright et al., 1995; Penzel et al., 1997; Shamim und Mason, 1998; Sahly et al., 1999; Sheng und Stern, 1999; Solloway und Robertson, 1999; Groves und Bronner-Fraser, 2000; Liu and Joyner, 2001).

1.2.2 Invagination, Innervierung und Musterung

Nachdem die Induktion der otischen Plakode erfolgt ist, was bei *Xenopus* im Stadium 20 erfolgt, verdickt sich das Plakodengewebe und ist zum ersten Mal morphologisch vom umliegenden Gewebe zu unterscheiden. Das Epithel beginnt zu invaginieren, um die Otocyste zu bilden (1-4). Der Vorgang der Plakodeninvagination ist bisher noch nicht sehr gut untersucht.

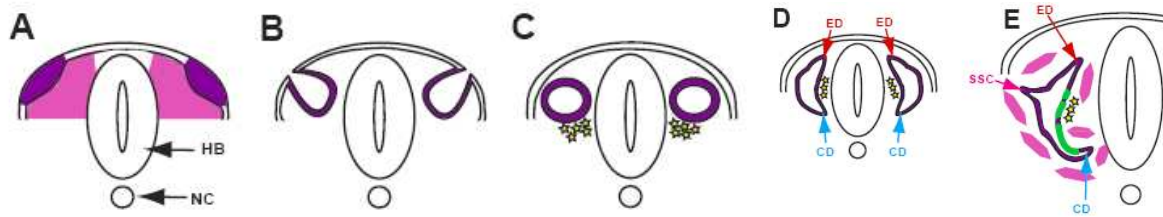


Abb. 1-4: Entwicklungsstadien des Innenohrs bei *Xenopus laevis*. Die Skizzen zeigen einen Querschnitt auf der Höhe des Rhombomers 5. (A) zeigt die bereits verdickten Plakoden (lila), sowie das periotische Mesenchym (rosa) im Bereich zwischen Plakode und Rhombenzephalon (HB). In (B) werden die invaginierenden Plakoden gezeigt, dieses Stadium wird auch als otischer Becher bezeichnet. (C) Ab Stadium 25 beginnen die Neuroblasten zu delaminieren und nach anterior zu migrieren (gelbe Sternchen). Sie bilden das statoakustische Ganglion. Im weiteren Verlauf (D) kommt es zur Elongation, so dass sich der cochleäre (türkis, CD) und der endolymphatische (rot, ED) Gang ausbilden. Es folgen weitere morphologische Veränderungen (E), die Bogengänge (rosa, SSC) und sensorischen Felder (grün) beginnen sich zu Formieren und das periotische Mesenchym (rosa) kondensiert, um die knöchernen Teile des Ohrs zu bilden. [Abbildungen aus Barald und Kelley, 2004]

Experimente, bei denen Aktin und Myosin des Zytoskeletts inhibiert wurden, zeigten keinen Einfluss auf die Ohrinvagination (Hilfer et al., 1989). Dies lässt darauf schließen, dass anders als in anderen invaginierenden Geweben die Bildung eines kontraktiven Ringes keine Rolle spielt (Pilot und Lecuit, 2005). Stattdessen scheint die Befestigung der Plakode am Hinterhirn essentiell für diesen Vorgang zu sein (Visconti und Hilfer, 2002), sowie Komponenten der extrazellulären Matrix, wie zum Beispiel Heparansulfat Proteoglykane oder Laminin (Moro-Balbas et al., 2000; Visconti und Hilfer, 2002; Gerchman et al., 1995). Jedoch gibt es auch kontroverse Studien, bei denen die Plakode in Gewebe verpflanzt wurde, das weit vom Neuralrohr entfernt liegt und sich dennoch normal entwickelt (Groves und Bronner-Fraser, 2000).

Es sind einige Proteine bekannt, die für die Invagination der otischen Plakode benötigt werden. In der Maus konnte gezeigt werden, dass Sox9, ein HMG-Transkriptionsfaktor, die Invagination reguliert. Sox9 ist in Huhn, Zebrafisch und *Xenopus* ebenfalls ein essentieller Faktor für die korrekte Ohrentwicklung (Barrionuevo et al., 2008). Zwei weitere Proteine, die in der Maus bzw. im Huhn zu Defekten während der Invagination führen sind Gata3 und Spalt4 (Lilleväli et al., 2006; Barembaum und Bronner-Fraser, 2007). In Gata3 defizienten Mäusen zeigte sich, dass einige Moleküle des otischen Bechers, die in Zelladhäsion involviert sind,

wie zum Beispiel Cx26 oder Spp1 (von *Connexin 26* und *secreted phosphoprotein 1*), hoch- bzw. herunterreguliert waren. (Wei et al., 2004; Wai und Kuo, 2004; Lilleväli et al., 2006). Spalt4 ist in der Lage, ektopische otische Becher in der näheren Umgebung des endogenen Ohrs zu formen und es ist notwendig, um die Invagination einzuleiten (Barembaum und Bronner-Fraser, 2007). Welche Mechanismen oder molekularen Abläufe direkt zur Invagination der otischen Plakode führen bleibt bisher noch ungeklärt. Sicher ist jedoch, dass viele verschiedene Proteine und Signalwege involviert sind, die miteinander interagieren müssen, um eine normale und vollständige Invagination zu erreichen.

Um die verschiedenen kranialen Plakoden zu spezifizieren, ist eine bestimmte Kombination an Proteinen notwendig, welcher Art ist bisher ungeklärt. Alle Plakoden exprimieren jedoch bereits sehr früh Mitglieder der Pax-Familie. Ein Netzwerk dieser Proteine ist bei der Augenentwicklung von *Drosophila* bekannt, *Eyeless*, *Twin of eyeless* und *Sine oculis*, sowie zwei weitere Proteine, *Eyes absent (Eya)* und *Dachsous (Dach)*; Wawersik und Maas, 2000). Bei Vertebraten wird eine Kombination der entsprechenden Homologe in allen Plakoden exprimiert. Dies ist ein Hinweis auf verschiedene Pax/Six/Eya/Dach Netzwerke in jeder Plakode, welches davon aktiviert wird, hängt von den äußeren Signalen und der jeweiligen Gewebekompetenz ab (Baker und Bronner-Fraser, 2001).

Ab Stadium 28 ist der Invaginationsvorgang abgeschlossen. Bereits kurz nach der Plakodeninduktion beginnt die Musterung der zukünftigen Otocyste. Sie erfolgt einerseits durch das umliegende periotische Gewebe, andererseits durch sezernierte Faktoren des Notochord und der Bodenplatte des Rhombenzephalons. Grob unterschieden werden kann in neurale, sensorische und nicht sensorische Zellschicksale.

Zuerst wird die anterior-posteriore Achse der Plakode festgelegt, dabei spielen vermutlich die spezifischen Genexpressionsmuster der anliegenden Hinterhirnrhombomere 5 und 6 eine Rolle. Sie liegen genau an der anterioren bzw. posterioren Hälfte des otischen Bechers an und jedes Rhombomer exprimiert ein bestimmtes Set an Genen (Brigande et al., 2000). Die Festlegung der dorsoventralen Achse erfolgt erst spät. Obwohl die differentielle Genexpression von dorsalen/ventralen Genen bereits im otischen Becher auftritt, ist die Achse erst endgültig festgelegt, wenn die Otocyste geschlossen ist (Fekete und Wu, 2002; Wu et al., 1998). Für die Festlegung der dorsoventralen Achse werden sezernierte

Moleküle wie Shh (von sonic hedgehog) und Wnts benötigt (Liu et al., 2002; Riccomagno et al., 2002; Bok et al., 2005; Riccomagno et al., 2005). Von Shh, das von der Bodenplatte des Mesenzephalons und vom Notochord sezerniert wird, ist bekannt, dass es das ventrale Schicksal der Otocyste bestimmt (Barald und Kelley, 2004). Es existiert aber mindestens ein von Shh unabhängiger Regulationsmechanismus, der sich ebenfalls auf das ventrale Schicksal der Otocyste auswirkt und über Six1 vermittelt wird (Bok et al., 2005; Bok et al., 2007). Wnt1/Wnt3a defiziente Mäuse hingegen entwickeln keinerlei vestibuläre Strukturen, die aus der dorsalen Otocyste entstehen (Riccomagno et al., 2005). Kanonische Wnts sind also bei der Festlegung des dorsalen Innenohrschicksals essentiell. Es gibt jedoch weitere Moleküle, die für die dorsoventrale Achsenbildung essentiell sind, wie zum Beispiel Bmp's, die in der Dachplatte des Hinterhirns und im dorsalen Ektoderm exprimiert werden (Lee und Jessell, 1999). Shh und Bmp wirken im Neuralrohr antagonistisch, daher ist davon auszugehen, dass in der Otocyste ein ähnlicher Vorgang abläuft, bei dem Shh, Bmp's und Bmp-Inhibitoren die Achsenbildung orchestrieren (Liem et al., 1995; Maklad und Fritsch, 2003).

Die mediolaterale Achse bildet sich zur gleichen Zeit, wie die anterior-posteriore Achse, obwohl das laterale Epithel erst bei der Schliessung der Otocyste gebildet wird (Wu et al., 1998). Dabei scheint das Zusammenspiel von Fgf3 und Wnt1, sowie Wnt3a essentiell für die Ausbildung ventraler Strukturen zu sein (Riccomagno et al., 2005; McKay et al., 1996).

1.2.3 Morphogenese und sensorische Epithelien

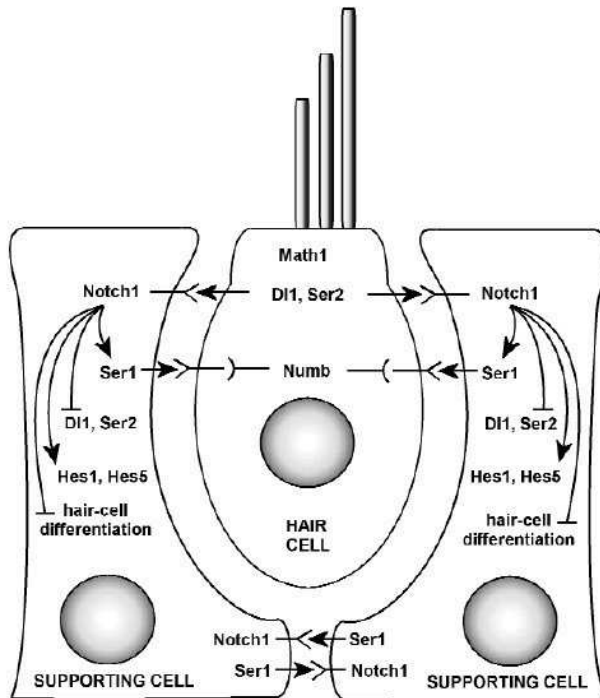
Die Region der otischen Plakode, die neuronale Vorläufer beinhaltet, liegt anterior-medial, sie wird auch als proneurale Domäne bezeichnet (Alsina et al., 2004; Abellò et al., 2007). Während der Bildung der Otocyste beginnen, in *Xenopus* ab Stadium 25, eine Gruppe von etwa 100 Zellen aus dem anterioren Ohrepithel zu delaminieren. Diese Neuroblasten akkumulieren neben der rostralen Seite des Ohrvesikels, zum cochlear-vestibulären Ganglion. Dort proliferieren sie und differenzieren sich zu den Neuronen des statoakustischen Ganglions, die die verschiedenen sensorischen Epithelien mit dem Zentralen Nervensystem verbinden (Haddon und Lewis, 1996; Rubel und Fritsch, 2002). Zellen mit sensorischem Schicksal bilden die sensorischen Felder mit ihren Haar- und unterstützenden Zellen.

Sensorische und nicht sensorische Zellen interagieren vermutlich miteinander, um die weiteren morphogenetischen Prozesse zu steuern (Bok et al., 2007).

Nachdem die Neuroblasten delaminiert sind, wird die proneurale Domäne in verschiedene Abschnitte unterteilt. Sie bilden später die sensorischen Felder der drei Cristae, der Maculae des Utriculus und Sacculus, sowie das sensorische Feld des Gehörorgans. Zwei essentielle Komponenten sind Bmp4 und Lfng. Bmp4 positive Zellen differenzieren zu den sensorischen Feldern der Cristae, wohingegen Lfng exprimierende Zellen sich zu den Maculae und dem Gehörorgan entwickeln (Morsli et al., 1998; Cole et al., 2000). Dabei ist die Interaktion zwischen sensorischen und nicht sensorischen Zellen ausschlaggebend für eine korrekte Ohrentwicklung (Pirvola et al., 2000).

Am Besten untersucht ist die Bildung des Gehörorgans. Bei der Entwicklung des cochleären Gangs beziehungsweise der Lagena spielt die konvergente Ausdehnung, die bereits aus der Gastrula bekannt ist, eine entscheidene Rolle (Bok et al., 2007; Jones und Chen, 2007). Man vermutet, dass der cochleäre Gang zunächst kurz und breit vorliegt und sich durch Interkalation der Zellen verlängert und verschmälert, so lange bis sein typisches Muster aus vier Zellreihen erreicht ist. Hinweise darauf geben Gene des PCP Signalweges, die zu diesem Zeitpunkt exprimiert werden, wie zum Beispiel *Celsr1*, *Dishevelled*, *Vngl2* (Wang et al., 2005, Jones and Chen, 2007). In *Xenopus* sind die ersten Vorläufer der Haarzellen bereits ab Stadium 31 zu detektieren (Quick und Serrano, 2005). Sie werden kurz nach der Spezifizierung der prosensorischen Felder gebildet (Ruben, 1967). Die Entscheidung, ob sich eine Zelle der sensorischen Felder in eine Haarzelle oder eine unterstützende Zelle differenziert, wird über laterale Inhibition durch Notch Signale vermittelt. Die neurogenen Zielgene des Notch Signalwegs spielen eine Rolle bei der Vermittlung der Differenzierung der Haarzellen und unterstützenden Zellen (Adam et al., 1998). Die Zellen in denen Notch überwiegt, differenzieren zu unterstützenden Zellen. Sie exprimieren Proteine des Hairy Homolog *Hes* und inhibieren *Delta1* und *Serrate2*. Haarzellen hingegen exprimieren *Delta1/Serrate2*, sowie *Numb*, welches die Aktivierung der Notch Expression durch *Serrate1* inhibiert. Einer der Hauptfaktoren der Haarzelldifferenzierung ist *Atonal1* (*Ath1*) (Bryant et al., 2002) (Abb.1-5). Während sich die Zellen in unterstützende und Haarzellen ausdifferenzieren, wird durch die Aktivierung des PCP Signalweges eine uniforme Ausrichtung der Stereozilien gegeben. Da die Haarzellen als Einheit auf eine Richtungsauslenkung

reagieren, führen bereits kleine Abweichungen in der Ausrichtung der Stereozilienebene zu vestibulären oder auditorischen Defekten (Yoshida und Liberman, 1999) (Abb. 1-6, D).



[Abbildung aus Bryant et al., 2002]

Abb. 1-5: Modell des Notch Regelkreis. Die Aktivierung von Notch1 in den unterstützenden Zellen führt zur Expression von Serrate1 (Ser1), zur Repression der Expression von Delta1 (DI1) und Serrate2 (Ser2) und zur Hochregulation von Hes1 und Hes5. Dies führt zur Inhibition der Haarzellendifferenzierung. In Haarzellen wird Delta1, Numb und Serrate2 exprimiert. Numb inhibiert die Serrate1 Signale der unterstützenden Zellen, so dass die Notch Expression verhindert wird. Haarzellen exprimieren zudem Atonal1 (Math1), welches zur Ausdifferenzierung der Haarzellen benötigt wird.

So führt zum Beispiel der Knockdown von PCP Genen wie Vngl2, Celsr (Flamingo Homolog), Frizzled6 und Frizzled3 zu einer zufälligen Orientierung der Stereozilien (Montcouquiol et al., 2003; Curtin et al., 2003; Wang et al., 2006).

Die Stereozilien einer Haarzelle sind treppenartig der Höhe nach angeordnet, wobei sich zuerst ein Zilium bildet, welches im späteren Entwicklungsverlauf zum Kinozilium wird (Abb. 1-6, A). Dieses Zilium bewegt sich auf die Peripherie der Seite der Zelle zu, an der es später seine endgültige Position erreichen muss. Noch während der Ausrichtung des Kinoziliums bilden sich die übrigen Stereozilien, die sich mit ihm zur endgültigen Position mitbewegen (Abb. 1-6, C). Es konnte gezeigt werden, dass ein Teil dieser Richtungsinformation über einen Wnt Morphogengradienten vermittelt wird. In der Maus ist Wnt7a ein möglicher Kandidat, die planare Zellpolarität der Stereozilien zu regulieren. Das Modell besagt, dass sich die Zilien am Punkt der niedrigsten Wnt Konzentration anordnen (Dabdoub et al., 2003). Die Stereozilien stehen über verschiedene Verbindungen während ihrer Entstehung und auch im ausgereiften Zustand in Kontakt. Bisher sind zwei dieser Verbindungskomponenten

bekannt, Protocadherin 15 und Cadherin 23, die zur Familie der Cadherine gehören (El-Amraoui und Petit, 2005).

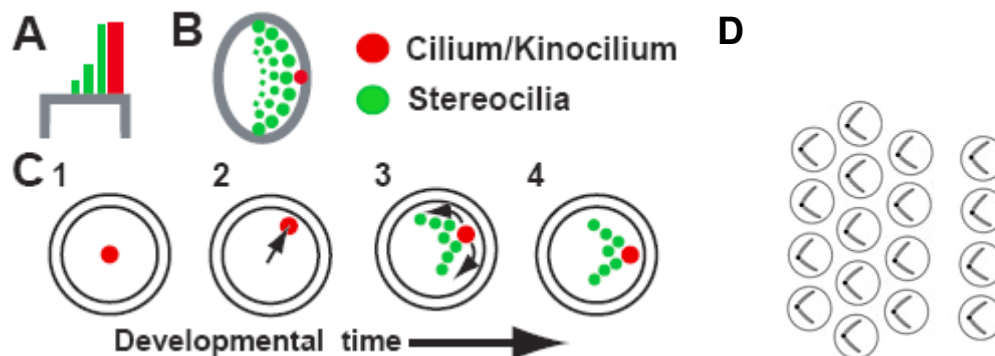


Abb. 1-6: Entwicklung der Stereozilienbündel. (A) zeigt die skizzierte Seitenansicht des apikalen Teils einer Haarzelle. Die treppenartig angeordneten Bündel bestehen aus einem Kinozilium (rot) und den Stereozilien (grün). (B) Die gleiche Zelle in Aufsicht. (C) Entwicklung der Stereozilienbündel, (1) zunächst entsteht ein Kinozilium, das sich in die Peripherie der Zelle bewegt (2). (3) Die Stereozilien formieren sich und bewegen sich mit dem Kinozilium zur (4) endgültigen Position. (D) Ausschnitt der Haarzellebene im Hörorgan. Die Stereozilienbündel sind in der gesamten Ebene gleich ausgerichtet. [Abbildungen aus Barald und Kelley, 2004 und Wang und Nathans, 2007]

Die bisher zusammengefassten Vorgänge bei der Innenohrbildung machen deutlich, dass eine Reihe komplexer morphogenetischer Zellbewegungen nötig sind, um aus einem einschichtigen Epithel ein dreidimensionales Organ mit unterschiedlichen Spezial-Epithelien in richtiger Anordnung zueinander zu formen. Epithelien sind gekennzeichnet durch eine apikal-basale Polarität. Sie können darüber hinaus noch eine planare Polarität enthalten. Beide Polaritäten werden von Cadherinen beeinflusst.

1.4 Die Familie der Cadherine

1.4.1 Klassische Cadherine

Cadherine sind kalziumabhängige Transmembranproteine, die homophile Zelladhäsion vermitteln. Ihr Name leitet sich von „calcium dependent adhesion protein“ ab und sie spielen eine wichtige Rolle bei vielen entwicklungsbedingten Prozessen. Durch Ihre homophilen Adhäsionseigenschaften sind sie, da sie gewebespezifisch exprimiert werden, in der Lage Zellen bzw. Gewebe zu gruppieren. Ein charakteristisches Merkmal für alle Mitglieder der Cadherin Familie sind, wie im Fall der klassischen Cadherine fünf oder je nach Unterfamilie mehr, der extrazellulären Cadherindomänen.

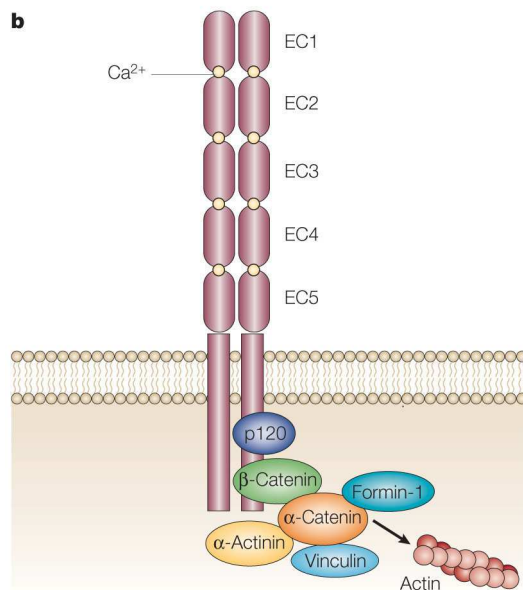


Abb. 1-7: Klassisches Cadherindimer. Die extrazelluläre Domäne besteht aus fünf charakteristischen Wiederholungen des Cadherinmotivs (EC1-EC5). Die korrekte Konformation kann nur durch die Einlagerung von Kalziumionen erreicht werden. Der cytoplasmatische Bereich enthält mehrere Bindedomänen für Adaptorproteine, wie β -Catenin (grün) und p120 (blau). Über diese Adaptoren wird durch α -Aktinin, Vinculin, Formin und α -Catenin eine Verbindung zum Zytoskelett hergestellt. [Abbildung aus Gumbiner, 2005]

Die Cadherinmotive bestehen aus zirka 110 Aminosäuren mit den hoch konservierten Motiven DRE, DXNDNAPXF und DXD, die negativ geladen sind (Takeichi et al., 1990, Overduin et al., 1995). Das bisherige Modell beschreibt die funktionelle Einheit der Cadherine an der Zelloberfläche als *cis* Homodimer (Abb. 1-7) (Koch et al., 1999; Stemmler, 2008). Bei der Bildung von Zell-Zell Kontakten kommt es zur Interaktion der gegenüberliegenden Cadherin Dimere über die extrazelluläre Cadherindomäne 1. Dabei treten die konservierten Tryptophane mit den hydrophoben Taschen des benachbarten Cadherins in Wechselwirkung, so dass eine homophile Bindung zustande kommen kann. Diese *trans*-Bindung besitzt nur geringe Affinität, daher wird vermutet, dass die Stärke der Cadherinbindungen über die laterale Anhäufung vieler Cadherine entsteht (Foty und Steinberg, 2005; Chen et al., 2005).

Anhand der Cadherindomäne 1 unterteilt man klassische Cadherine noch einmal in Typ I und Typ II Cadherine. Typ I Cadherine besitzen ein konserviertes Tryptophan und eine hydrophobe Tasche, welche aus der konservierten Histidin-Alanin-Valin Sequenzfolge besteht, wohingegen Typ II Cadherine jeweils zwei Tryptophane und zwei hydrophobe Taschen aufweisen (Abb.1-8) (Shapiro et al., 1995; Morishita und Yagi, 2007). Cadherine besitzen nicht nur adhäsive Eigenschaften. Die cytoplasmatische Domäne verbindet klassische Cadherine mit dem Zytoskelett und kann Signale weiterleiten. Sie besitzt eine konservierte β -Catenin- und eine p120-Bindestelle. β -Catenin interagiert mit α -Catenin, welches entweder direkt mit

Aktinfilamenten oder indirekt über Vinculin, ZO1 oder α -Aktinin mit dem Zytoskelett interagieren kann (Kobielak und Fuchs, 2006; Watabe-Uchida et al., 1998; Knudsen et al., 1995).

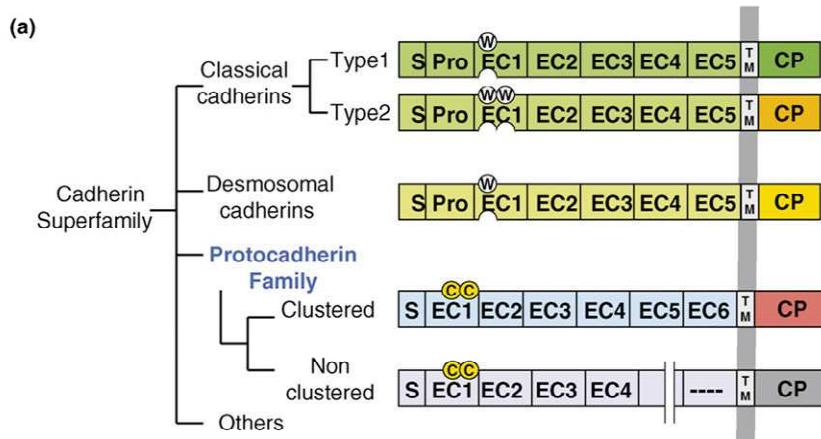


Abb. 1-8: Die Cadherin Superfamilie. Klassische Cadherine besitzen 5 extrazelluläre Domänen (EC1-EC5), eine Transmembrandomäne (TM) und eine cytoplasmatische Domäne (CP). Typ I Cadherine haben eine, Typ II Cadherine zwei hydrophobe Taschen, sowie ein bzw. zwei konservierte Tryptophane (W), durch die sie mit anderen EC1 in Wechselwirkung gehen können. Eine ähnliche Struktur findet sich auch bei den Desmosomalen Cadherinen, wohingegen die Unterfamilie der Protocadherine anders aufgebaut ist, als die klassischen Cadherine. Protocadherine besitzen sechs oder mehr Wiederholungen des Cadherinmotivs und ihre EC1 enthält weder konserviertes Tryptophan, noch eine hydrophobe Tasche. Die Wechselwirkungen der Protocadherine kommen vermutlich über hoch konservierte Motive zustande, die Cysteine enthalten (C). [Abbildung aus Morishita und Yagi, 2007]

P120 hat hauptsächlich regulatorische Funktionen, kann aber auch Catenine binden (Ozawa und Kemler, 1998; Gumbiner 2005). β -Catenin ist unter anderem auch als Effektormolekül des kanonischen Wnt Signalweges bekannt.

Wnts sind cysteinreiche, glykosilierte Wachstumsfaktoren, die, wenn sie sezerniert werden unter anderem Zellwachstum, Differenzierung und das Migrationsverhalten beeinflussen können (Miller et al., 2002; Polakis et al., 2000).

1.4.2 Das Paraxiale Protocadherin

Die Protocadherine stellen eine der größten Unterfamilien der Cadherine. Sie besitzen bis zu elf Wiederholungen des Cadherinmotivs, die sich in ihrer Struktur jedoch von denen der klassischen Cadherine unterscheiden. Am bemerkenswertesten ist dabei, dass vielen Protocadherinen die hydrophobe Tasche

und das Tryptophan der ersten extrazellulären Cadherindomäne fehlt, welche bei den klassischen Cadherinen für die Adhäsion benötigt werden. Es wurde aber ein konserviertes Tyrosin identifiziert, das eventuell die Rolle des Tryptophans einnimmt (Chen et al., 2007). Kürzlich durchgeführte Studien lassen vermuten, dass sich Protocadherine eines anderen Bindemotivs bedienen. Ein hoch konserviertes Motiv Cys-(X)₅-Cys, sowie ein RGD Motiv findet sich bei allen Protocadherinen, nicht aber bei den klassischen Cadherinen, in der ersten extrazellulären Domäne (Morishita et al., 2006). Zusätzlich zu dem obigen Cysteinmotiv, gibt es zwei weitere Protocadherin-spezifische Cysteine (Suzuki, 1996) (Abb.3). Die Adhäsion die Protocadherine vermitteln ist nur von schwacher Intensität und in manchen Fällen sogar umstritten. Im Gegensatz zu den klassischen Cadherinen kann sie sowohl kalziumabhängig, als auch kalziumunabhängig vermittelt werden (Sano et al., 1993). Ein weiterer Unterschied zu den klassischen Cadherinen ist die fehlende Verbindung zum Zytoskelett über die cytoplasmatische Domäne. Jedoch findet sich bei den meisten Protocadherine ein hoch konserviertes Motiv von etwa 17 Aminosäuren, dessen Funktion bisher noch unbekannt ist (Wolverton und Lalande, 2001).

Das *paraxiale Protocadherin* (PAPC) ist eines der Protocadherine, die nicht in einem Gencluster vorliegen. PAPC wurde bei einem differentiellen Screen der dorsalen Blastoporus Lippe identifiziert und ist für *Xenopus* bisher am Besten untersucht (Bouwmeester et al., 1996). Es besitzt sechs extrazelluläre Wiederholungen des Cadherinmotivs und es wurden zwei verschiedene mRNA's isoliert, bei denen es sich um Pseudoallele handelt (Kim et al., 1998; Medina et al., 2004). Homologe von PAPC fanden sich bisher in Zebrafisch (Protocadherin8), Huhn (Protocadherin8), Mensch (Protocadherin8), Maus (Protocadherin8) und Ratte (Arcadlin) (Yamamoto et al., 1998; Strehl et al., 1998; Yamamoto et al., 2000; Yamagata et al., 1999). Bei all diesen Homologen findet sich ein hoch konservierter Abschnitt von ~25 Aminosäuren in der cytoplasmatischen Domäne (Chen et al., 2007).

Die Expression von PAPC in *Xenopus* beginnt sehr früh in der dorsalen Marginalzone (Stadium 9,5) und expandiert dort in der frühen Gastrula (Stadium 10,5) (Abb. 1-9). Im weiteren Verlauf der Gastrula wird PAPC im gesamten Mantelmesoderm exprimiert, wohingegen die Notochordanlage PAPC-negativ bleibt. Ab Stadium 13 bildet sich eine Grenze zwischen Kopf- und Stammesoderm. Kurz vor Beginn und während der Somitogenese beginnt auch dort die Expression von PAPC. Während der Somitenbildung finden sich PAPC Transkripte nur in der

anterioren Grenze der reifenden, nicht aber in den ausgereiften Somiten. Während der gesamten Somitogenese wird PAPC außerdem in der Segmentplatte, also dem unsegmentierten paraxialen Mesoderm exprimiert, woher auch sein Name stammt (Kim et al., 1998).

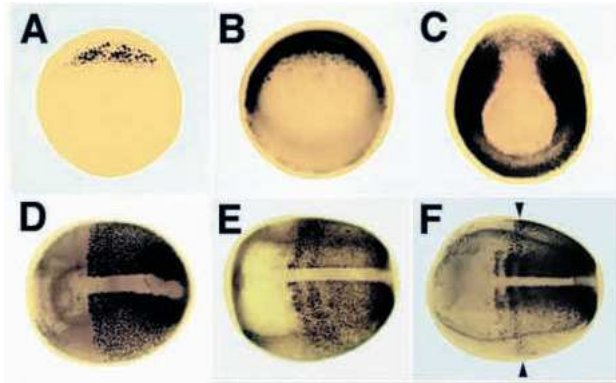


Abb. 1-9: PAPC Expressionsprofil. Im Stadium 9,5 (A) ist die PAPC Expression in der dorsalen Marginalzone zu sehen, sie expandiert (B) im Stadium 10,5 und befindet sich schließlich im paraxialen Mesoderm ab Stadium 11,5 (C). Deutlich zu sehen ist, dass die Region des zukünftigen Notochord von einer PAPC Expression ausgeschlossen ist. (D) Ab Stadium 13 kommt es zu einer strikten Trennung des Kopf- und Stammesoderms. (E) Expression im unreifen Somiten, Stadium 14. (F) Nachdem sich der erste Somit gebildet hat (Stadium 17) verschwindet die PAPC Expression und setzt sich im nächsten reifenden Somiten fort. [Abbildung aus Kim et al., 1998]

Die PAPC-negative Region des Notochords wird durch die Expression eines anderen Protocadherins, dem *axialen Protocadherin* (AXPC) spezifiziert. Es wird ab Stadium 13 ausschließlich im Notochord exprimiert und komplementiert so die PAPC Expression (Kim et al., 1998).

Das Expressionsmuster des PAPC im Zebrafisch ist dem von *Xenopus* sehr ähnlich. In beiden Fällen wurden zunächst Funktionsanalysen mit dnPAPC Konstrukten durchgeführt. Diese zeigten, dass PAPC in beiden Fällen eine ähnliche Funktion während der konvergenten Ausdehnung und der Somitogenese hat. Nach Injektion der dominant negativen Konstrukte zeigte sich entweder eine laterale Verbreiterung oder das Fehlen der Somiten. Beides weist auf Defekte bei der konvergenten Ausdehnung hin (Yamamoto et al., 1998; Kim et al., 1998).

Das vollständige Ausschalten („Knock-out“) von PAPC in der Maus (*papc*^{-/-}) hingegen führte zu keinem Phänotyp, die *papc*^{-/-} Mäuse waren fertil und normal ausgebildet. Eine Redundanz kann aber nicht ausgeschlossen werden, da bisher zehn Protocadherine identifiziert wurden, deren Expression mit der von PAPC überlappen

(Yamamoto et al., 2000). Mutationsstudien des humanen PAPC Orthologs Protocadherin 8 zeigten, dass dessen Inaktivierung die Onkogenese (im Besonderen Brustkrebs) fördert. Dabei wird die Zellproliferation und Zellmigration gefördert, was vermutlich auf eine gestörte Zell-Zell Kommunikation zurückzuführen ist (Yu et al., 2008). Für Huhn und Ratte liegen bisher keine Daten vor. Bemerkenswert ist jedoch, dass sich bei Maus und Huhn das Expressionsprofil ändert. Zusätzlich zur Expression in den Somiten, den Ohranlagen und im paraxialen Mesoderm, finden sich Transkripte im dorsalen und ventralen Mittelhirn, sowie in den Extremitäten (Yamamoto et al., 2000; Daten der Diplomarbeit).

1.4.3 Die Rolle von PAPC in *Xenopus*

Bisher konnte in *Xenopus* gezeigt werden, dass PAPC während der Gastrulation die morphogenetischen Bewegungen während der konvergenten Ausdehnung reguliert, sowie in Prozesse der Gewebetrennung, Somitogenese und auch Organogenese involviert ist (Kim et al., 2000; Medina et al., 2004; Unterseher et al., 2004; Hu et al., 2006).

Zunächst wurde dabei angenommen, dass PAPC hauptsächlich adhäsive Eigenschaften aufweist (Townes und Holtfreter, 1955; Kim et al., 1998). Neuere Studien zeigen jedoch, dass PAPC in der Lage ist, die Adhäsionseigenschaften anderer Cadherine zu regulieren und indirekt die Adhäsion beeinflusst, so dass ältere Adhäsionsstudien neu überdacht werden müssen (Chen und Gumbiner, 2006a; Chen und Gumbiner, 2006b). Neben der indirekten Adhäsionsregulation fungiert PAPC selbst auch als Signalmolekül. Es wird während der Gastrula in dem Teil des Mesoderms exprimiert, in dem konvergente Ausdehnung stattfindet (Kim et al., 1998). Die Zellen ordnen sich entlang der Achse an und beginnen zu interkalieren, um das Gewebe zu strecken. DnPAPC ist in der Lage diese Elongationsbewegung zu inhibieren. Die beiden Signalwege, die die konvergente Ausdehnung regulieren sind der PCP und der kanonische Wnt Signalweg (Mlodzik, 2002; Kuehl et al., 2001). Die Effektoren des Wnt/PCP Signalwegs sind die kleinen GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42, die verschiedene Funktionen haben und unter anderem die c-Jun N-terminale Kinase aktivieren (Winklbauer et al., 2001; Yamanaka et al., 2002; Habas et al., 2003; Penzo-Mendez et al., 2003). Knock-down Studien mit *antisense* Morpholino Oligonukleotiden zeigen, dass PAPC funktional mit dem PCP Signalweg interagiert, indem es über einen Frizzled Rezeptor und kleine GTPasen JNK aktiviert,

was wiederum zu einer Veränderung des Zytoskeletts führt (Unterseher et al., 2004). Dabei konnte beobachtet werden, dass es durch den Verlust von PAPC zwar zu Elongationsbewegungen kommt, die Konvergenz jedoch gestört ist.

Bevor die Zellen interkalieren, kann eine Veränderung der Zellmorphologie beobachtet werden, die Zellen nehmen eine bipolare Form an und ordnen sich entlang der mediolateralen Achse an (Shih und Keller, 1992). Wird die PAPC Translation durch Morpholinos unterdrückt, kommt es zwar zur Ausbildung der bipolaren Form, die Zellen migrieren aber ungerichtet und eine mediolaterale Ausrichtung bleibt aus (Unterseher et al., 2004). Ein Modell der Signalfunktion von PAPC wird in Abbildung. 1-10 gezeigt.

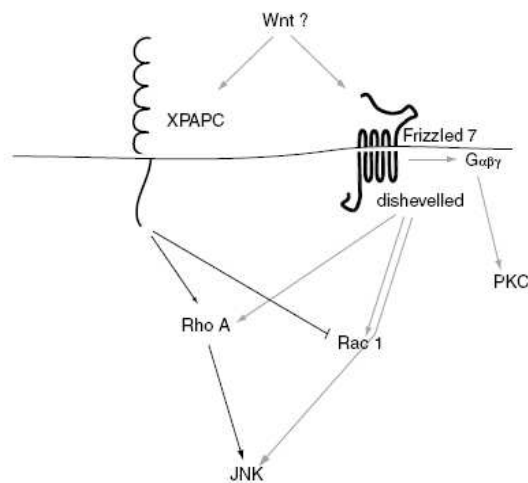


Abb. 1-10: PAPC Signalkaskade. Durch die Bindung eines Wnt-Liganden und die Interaktion zwischen Frizzled7 und PAPC kommt es zur Aktivierung von RhoA und zur Inhibition von Rac1. Dadurch wird JNK aktiviert, welche weitere Effektoren phosphorylieren kann. Die Effektoren des PCP Signalweges sind ebenfalls die kleinen GTPasen Rho und Rac, so dass sich beide Signalwege überschneiden. [Abbildung aus Unterseher et al., 2004]

Durch die Interaktion von PAPC mit Frizzled 7 kommt es zur Aktivierung von RhoA und zur gleichzeitigen Inhibition von Rac1. Dadurch wird JNK aktiviert, welche wiederum Einfluss auf die Zytoskelett Organisation hat (Abb. 1-10).

Bisher wurden vier Proteine identifiziert, die mit PAPC wechselwirken. In einem Hefe Zwei-Hybrid Ansatz zeigte sich, dass die cytoplasmatische Domäne von PAPC mit Sprouty1 interagiert (Wang et al., 2008). Von Sprouty 1 ist bekannt, dass es als Inhibitor des PCP Signalweges gilt und auch während der konvergenten Ausdehnung der Gastrulation eine Rolle spielt (Sivak et al., 2005). Sprouty inhibiert dabei die Signalweiterleitung von Rezeptortyrosinkinasen (Mason et al., 2006). Es wird vermutet, dass Sprouty 1 an die phosphorylierte cytoplasmatische Domäne von PAPC bindet und die Aktivierung des PCP downstream von Frizzled7, aber upstream von PKC δ , Dishevelled und RhoA hemmt. PAPC und Sprouty1 wirken antagonistisch (Wang et al., 2008).

Ein anderer Interaktionspartner der cytoplasmatischen PAPC Domäne ist ANR5, ein Fgf Zielgen. ANR5 (von *ankyrin repeats domain protein 5*) reguliert die Zellmorphologie und Gewebetrennung während der Gastrulation durch die Interaktion mit PAPC und reguliert die RhoA und JNK Aktivität (Chung et al., 2007). Wie bereits erwähnt kann PAPC Adhäsionsaktivitäten indirekt durch eine Bindung an Cadherine regulieren. Dies konnte in *Xenopus* an C-Cadherin gezeigt werden. C-Cadherin ist ein klassisches Cadherin, das Zell-Zell Adhäsion während der ersten Entwicklungsstadien vermittelt und bereits maternal exprimiert wird (Choi et al., 1990). Es spielt außerdem eine Rolle bei der Beibehaltung embryonaler Integrität und während der morphogenetischen Zellbewegungen der konvergenten Ausdehnung (Heasman et al., 1994; Briher und Gumbiner, 1994). Die C-Cadherin Aktivität wird durch PAPC inhibiert, ohne den Abbau von C-Cadherin zu stimulieren. Die inhibitorische Regulation erfolgt über die extrazelluläre Domäne und sie ist unabhängig von Frizzled7. Der genaue Mechanismus ist noch ungeklärt, Abbildung 1-11 schlägt jedoch ein Modell vor, in dem Aktivin (Abschnitt 1.4.4) die PAPC Expression induziert, was zur Inhibierung von C-Cadherin führt. Die dynamische Regulation der Zell-Zell Adhäsion wird für die konvergenten Ausdehnungsbewegungen benötigt (Zhong et al., 1999). Ergänzend greift vermutlich der über Frizzled7 vermittelte PCP Signalweg in die Regulation der konvergenten Ausdehnung ein (Chen und Gumbiner, 2006).

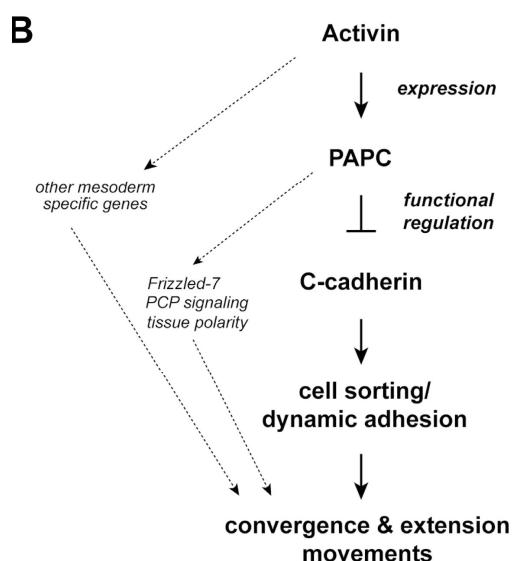


Abb. 1-11: Aktivin induzierte Gewebemorphogenese. Aktivin aktiviert die PAPC Expression. PAPC wiederum inhibiert die Zelladhäsion, indem es die Funktion von C-Cadherin hemmt. Dadurch kann es zur Zellsortierung mit Hilfe dynamischer Adhäsion kommen, was für die konvergenten Ausdehnungsbewegungen während der Gastrula essentiell ist. Andere Signalwege, die in diesen Prozess ebenfalls regulierend eingreifen sind grau hinterlegt. [Abbildung aus Chen und Gumbiner, 2006]

1.4.4 Regulation der PAPC Genexpression

Die frühe Aktivierung der PAPC Expression ist bei *Xenopus* und Maus Lim1-, bei Zebrafisch *spadetail*-abhängig (Huckriede et al., 2003; Yamamoto et al., 1998). In *Xenopus* sind weitere Faktoren, wie Activin/Nodal und Wnt5a/Ror2 bekannt, die einen Einfluss auf die Expression von PAPC haben (Huckriede et al., 2003; Lou et al., 2008; Chen und Gumbiner, 2006; Schambony und Wedlich, 2007). Activin/nodal Signale sind Fgfβ gesteuert und sie sind involviert in Gastrulation, Morphogenese und Zellbewegungen. Unter anderem, indem sie die Zelladhäsion durch Endozytose von Cadherinen beeinflussen (Zhou et al., 1993; Ogata et al., 2007). Die frühe PAPC Expression ist Activin/nodal abhängig und wird über ein Smad Bindeelement im PAPC Promotor reguliert (Lou et al., 2008).

Ein zweiter regulativer Signalweg, der die PAPC Expression beeinflusst, wird über Wnt5a und die Rezeptortyrosinkinase Ror2 vermittelt (Abb. 1-12).

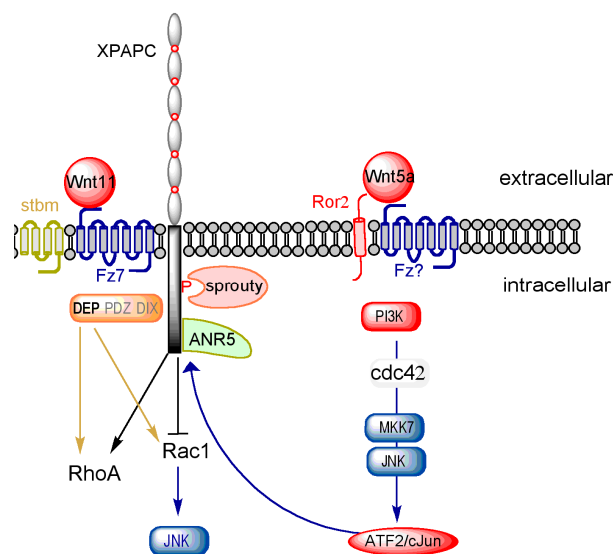


Abb. 1-12: Regulation der PAPC Expression. Im linken Bildbereich ist die PAPC Signalkaskade dargestellt. Die Bindung eines Wnt Liganden mit PAPC und Frizzled7 führt zur Aktivierung der kleinen GTPase RhoA und zu Inhibition von Rac1, so dass es zu einer Aktivierung von JNK kommt. Die Adaptorproteine ANR5 und Sprouty binden am cytoplasmatischen Teil von PAPC. Die Interaktion von PAPC mit Dishevelled ist bisher umstritten. Im rechten Bildbereich ist die Signalkaskade aufgeführt, die zur Regulation der PAPC Expression führt. Wnt5a bindet an einen Frizzled Rezeptor und die Rezeptortyrosinkinase Ror2. Die Phosphoinositol 3 Kinase phosphoryliert Cdc42, welche wiederum MKK7 aktiviert. Über JNK werden die Transkriptionsfaktoren ATF2 und c-Jun aktiviert, die die Expression von PAPC einleiten. [Abbildung von Wedlich, nicht veröffentlicht]

Von Wnt Liganden ist bekannt, dass sie nicht ausschließlich auf Frizzleds als Rezeptoren angewiesen sind, sondern zum Beispiel auch mit Ryk oder Ror2 interagieren können (Hikasa et al., 2002; Keeble und Cooper, 2006; Oishi et al., 2003). Der Wnt5a/Ror2 Signalweg wird als unabhängiger und neuer Zweig der nicht kanonischen Wnt/PCP Signalwege beschrieben. Wnt5a bindet an Ror2 und aktiviert es. Das führt zur Phosphorylierung und Aktivierung der Phosphoinositol 3 Kinase, die über die kleine GTPase Cdc42 zunächst MKK7 aktiviert, welches wiederum die c-Jun N-terminale Kinase aktiviert. Die endgültigen transkriptionalen Aktivatoren sind ATF2 und c-Jun (Schambony und Wedlich, 2007).

2 Zielsetzung

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, die Funktion des *Paraxialen Protocadherins* während der Innenohrentwicklung zu charakterisieren. Der Fokus lag dabei auf der frühen Innenohrentwicklung, wobei insbesondere adhäsive und signalvermittelnde Funktionen von PAPC untersucht werden sollten.

Um die Funktion von PAPC zu analysieren, sollte die Translation der beiden Pseudoallele von PAPC mit Hilfe zweier *antisense* Morpholino Oligonukleotide unterdrückt werden. Die Auswirkungen der Morpholinos sollten mittels verschiedener Ohrmarker, sowie histologischen Schnitten und Immunfärbungen charakterisiert werden. Da sich die Innenohrentwicklung in mehreren Teilschritten vollzieht, sollte PAPC im Bezug auf seine mögliche Funktion während der Plakodeninduktion, Neuroblastenmigration, Invagination und Musterung untersucht werden.

Zur funktionellen Analyse wurden Rekonstitutionsexperimente durchgeführt, die die molekularen Effektoren der signalvermittelnden Funktion von PAPC aufdecken, sowie dessen Expressionsregulation während der Ohrentwicklung erfassen sollten. Für weiterführende Studien zur Beteiligung von PAPC an der Haarzellentwicklung sollte das Hühnchen als Tiermodell eingeführt und grundlegende methodische Techniken, wie zum Beispiel die Elektroporation oder die Entnahme und Kultivierung von Organexplantaten, etabliert werden.

3 Materialien

Kits

- mMESSAGE mMACHINE™ (Ambion Ltd, Huntingdon, Großbritannien)
- Fluorescein/Digoxygenin RNA-Labeling Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Nucleobond XtraMidi (Macherey Nagel, Düren)
- ProbeQuant G-50 Micro Columns (GE Healthcare, München)

Antikörper

- AP-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG (Dianova, Hamburg)
- CyTM-2-konjugierte Ziege-anti-Kaninchen IgG (Dianova, Hamburg)
- CyTM-3-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG (Dianova, Hamburg)
- CyTM-2-konjugierte Ziege-anti-Ratte IgG (Dianova, Hamburg)
- Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Anti- aPKC, C-20, Kaninchen (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
- Anti- E-Cadherin, 10H3 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, USA)
- Anti- β -Catenin, 7D12 (Ralph Rupp, München)
- Anti-C-Cadherin, 6B6 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, USA)
- Anti-Fibronektin, 6D9 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, USA)
- Anti-XB-Cadherin, 6D5 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, USA)

Enzyme

- Sp6, T7, T3 RNA-Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim)
- DNase I, RNasefrei (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Proteinase K (Merck, Darmstadt)
- RNase Inhibitor (Promega, Mannheim)
- RNase A (Fermentas, St. Leon-Rot)
- Restriktionsendonukleasen (Promega, Mannheim)
- Taq DNA-Polymerase (Promega, Mannheim)
- Reverse Transkriptase (Promega, Mannheim)
- Enzyme Mix (Sp6, T3, T7) (Ambion Ltd, Huntingdon, Großbritannien)

Verwendeter Bakterienstamm

NEB 5-Alpha (New England Biolabs, Frankfurt)

Genotyp: *fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15
gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17***Primer**

ch_papc_fwd1	5'-GTA CGG CCG AGT GCA AGA T-3'
ch_papc_rev1	5'-TCT CAG TGG CAT CAG TCT GG-3'
chβ-Actin_fwd	5'-GCT GTG CTG TCC CTG TAT GC-3'
chβ-Actin_rev	5'-ACC CAA GAA AGA TGG CTG GA-3'
oligo Dt	5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT-3'

Morpholino-Oligonukleotide

Kontroll-MO	5'-CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A-3'	GeneTools; Philmath, USA
XFz7-MO	5'-CCA ACA AGT GAT CTC TGG ACA GCA G-3'	Winklbauer et al., 2001
XPAPC-MO 1	5'-CCT AGA AAC AGT GTG GCA ATG TGA A-3'	Medina et al., 2004; Unterseher et al., 2004
XPAPC-MO 2	5'-CTT GCC TAG AAA GAG TGC TGC TGT G-3'	Medina et al., 2004 Unterseher et al., 2004
Wnt5a MO	5'-GGT GCA ACC AGG GCA CAA TTA CTT T-3'	Schambony u. Wedlich, 2007
Ror2 MO	5'-GTG AGG GGA GCT AAG GCG CAA GAC T-3'	Schambony u. Wedlich, 2007
LRP6 MO	5'-CCC CGG CTT CTC CGC TCC GAC CCC T-3'	Hassler et al., 2007

Verwendete Plasmide

M-XPAPC	pCS2	Mikroinjektion	E. De Robertis, USA
XDsh Δ DEP	pCS 2	Mikroinjektion	R.T. Moon, USA
XDsh Δ DIX	pCS 2	Mikroinjektion	R.T. Moon, USA
XDsh Δ PDZ	pCS 2	Mikroinjektion	R.T. Moon, USA
XDsh	pCS2	Mikroinjektion	R.T. Moon, USA
C-PAPC	pGEMT	Mikroinjektion	A. Schambony, Karlsruhe
XB-Cadherin	sp64T3	Mikroinjektion	N. Kücükiyeilan, Ulm
N-Cadherin	pCS2	Mikroinjektion	Y. Imamichi, Ulm
E-Cadherin	pCS2	Mikroinjektion	Y. Imamichi, Ulm
caRac1	pCS2	Mikroinjektion	K.Giehl, Ulm
caRhoA	pCS2	Mikroinjektion	K.Giehl, Ulm
caCdc42	pCS2	Mikroinjektion	K.Giehl, Ulm
dnRac1	pCS2	Mikroinjektion	K.Giehl, Ulm
dnRhoA	pCS2	Mikroinjektion	K.Giehl, Ulm
Ror2	pCS2	Sonde, Mikroinjektion	M. Taira, Tokyo
FLPAPC	pCS2	Sonde, Mikroinjektion	E.M. De Robertis, USA
PCNS	pCMVSPORT6	Sonde	T.D. Sargent, Bethesda, USA
Tbx2	pGEM-3Zf(-)	Sonde	T. Hayata, Tokyo
Sox10	pCS2	Sonde	J. Saint-Jeannet, USA
XNkx5.1	pGEMT	Sonde	A. Zaraisky, Moskau
Pax2	pBluescriptII SK+	Sonde	N. Heller, Zürich
Wnt5a	pRC/CMV	Sonde	D. Gradl, Karlsruhe
Fz7	pCS2	Sonde	D. Gradl, Karlsruhe

Geräte

- Brutschrank, APT LineSerieBD/ED/FD (Binder, Tuttlingen)
- Cryostat 2800-Frigocut N (Leica Instruments GmbH, Nussloch)
- Digitalkamera Retiga Color 12 bit (QImaging, Burnaby, Kanada)
- Digitalkamera C4742-95-12 ERG (Hamamatsu, Herrsching)
- Elektrische Vorschaltquelle für Quecksilber-Kurzbogenlampe (Leistungselektronik Jena, Jena)
- Fluoreszenzmikroskop DMIRE2 und CTR MIC (Leica Mikrosysteme, Bensheim)
- Konfokales Mikroskop LSM510 (Zeiss, Jena)

- Flachbettgelelektrophoresekammern (Amersham, Freiburg)
- Feinwaage (Sartorius, Göttingen)
- Fluoreszenzbinokular Leica S8AP0 (Leica Mikrosysteme, Bensheim)
- DIANA Geldokumentationsanlage (Raytest, Straubenhardt)
- Kühlbrutschrank BK-600 (Kendro, Langenselbold)
- Kühlbrutschrank Sanyo (Sanyo Electric Co., Ltd, Japan)
- Kaltlichtquelle KL 1500 LDD (Schott Glas, Wiesbaden)
- Micropipette Puller Model P-97 (Sutter 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)
- PCR Cycler iCycler Version 2.039 (Bio-Rad, München)
- Photometer, Bio-Photometer (Eppendorf, Hamburg)
- Software
 - Openlab 4.0.3 und 5.5.0 (Openlab, Heidelberg)
 - ApE v1.12 (Freeware von M. Wayne Davis, USA)
 - Diana software (Raytest, Straubenhardt)
 - LSM Image Browser Version 4.2.0.121 (Zeiss, Jena)
- Schüttelinkubator, Orbital Shaker (Thermo Forma, Marietta, USA)
- Vibratom, VT 1000S (Leica Mikrosysteme, Bensheim)
- Wasserbad (Memmert, Schwabach)
- Wasserbad 1086 (GFL, Burgwedel)
- Zentrifugen
 - Biofuge fresco (Kendro, Langenselbold)
 - Multifuge® 3 S-R (Kendro, Langenselbold)
 - Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg)
- Vortex Reax Control (Heidolph, Nürnberg)

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)

- 2Log DNA Marker (New England Biolabs, Frankfurt/Main)
- Agarose (Serva, Heidelberg)
- Dextran (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Blockierungsreagenz (Roche Diagnostics, Mannheim)
- BSA (Bovine Serum Albumin) (PAA Laboratories GmbH, Cölbe)
- Desoxyribonukleotide (Promega GmbH, Mannheim)
- DIG RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- DMEM (Cambrex, Charles City, USA)
- FCS (Fetal Calf Serum) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Hefeextrakt (USB, Cleveland, USA)
- Magermilchpulver (Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell)
- Natriumdodecylsulfat (SDS) (Serva)
- Pferdeserum (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Tween 20 (Serva, Heidelberg)

Lösungen

- Ampicillin-Stammlösung (1000x)
100 mg Ampicillin pro ml Aqua bidest., bei – 20 °C lagern.
- Äquilibrierungspuffer für Kryostatschnitte
100mM Tris-HCl, 100mM NaCl (pH7.4)
- Alkalische Phosphatasepuffer für NBT/BCIP (AP Puffer)
100mM Tris-HCl pH 9.5, 50mM MgCl₂, 100mM NaCl, 0.1% Tween 20 in DEPC-Wasser
- Antikörperlösung für Hühnchen-Ganzkeimfärbung
1mg/ml Blockingpuffer in TBST, 0.1% inaktives Ziegenserum
- Aqua bidest., Lagerung bei 4 °C

- Betäubungslösung
2,5g/l Aminobenzoessäureethylester in Aqua bidest. lösen, pH7,4 einstellen,
Lagerung bei 4°C
- β-Galaktosidase Färbelösung
47ml PBS, 1ml X-Gal, je 500µl 500mM K₃Fe(CN)₆III und K₃Fe(CN)₆II
- Blockierungspuffer für Hühnchen-Ganzkeimfärbung
10% inaktiviertes Ziegen Serum in TBST
- Blockierungspuffer für Ganzkeimfärbung von *Xenopus laevis*
1x BMB, 10% Pferdeserum, 0.05% Tween 20 in DEPC-Wasser
- BMB
10% Böhlinger Blocking Reagent in MAB
- Bleichlösung
6% H₂O₂ in PBST
- Cysteinlösung
2% Cystein in 0.1x MBSH, mit 10 M NaOH pH 8.2.
- DAPI-Kernfärbelösung
Stammlösung 1mg/ml in PBST. Lagerung im Dunkeln bei 4°C
- DEPC-Wasser
1ml Diethylpyrocarbonat über Nacht in einem Liter Aqua bidest. schütteln und
anschließend durch Autoklavieren inaktivieren.
- 50xDenhardt's
1% Rinderserumalbumin, 1% Polyvinylpyrrolidon, 1% Ficoll
- Einbettungsmedium für Kryostatschnitte1
15% Gelatin (Kaltwasserfisch-Gelatine), 15% Saccharose
- Einbettungsmedium für Kryostatschnitte2
25% Gelatin (Kaltwasserfisch-Gelatine), 15% Saccharose
- Einbettungsmedium für Kryostatschnitte3
20% Gelatin (Kaltwasserfisch-Gelatine), 15% Saccharose
- Glycin-Lösung
2µg/µl Glycin in PBST
- Gelatine-Albumin-Mixtur
2,2g (0,5%) Gelatine in 450ml PBS erhitzen und lösen, 135g Rinderalbumin und
90g Saccharose zufügen, lagern bei -20°C

- Hybridisierungspuffer für *Xenopus laevis* und *Gallus domesticus*
50% Formamid deionisiert, 5x SSC, 2% Torula RNA Lösung, 0.1% Heparinlösung, 1x Denhardt's, 0.1% Tween 20, 0.1% CHAPS, 5 mM EDTA.
- 5x Ladepuffer für DNA-Auftrennung
0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 30 % Glycerin
- LB-Agar-Platten mit Antibiotika
1.5% Select Agar in LB-Medium lösen und autoklavieren; nach Abkühlen auf 55 °C 1 ml Antibiotika-Stammlösung pro Liter zugeben und in Petrischalen (Ø 9.4 cm) gießen; die erkalteten Platten werden kopfüber bei 4 °C gelagert.
- LB-Medium mit Antibiotika
1ml Antibiotikalösung pro Liter LB-Medium.
- LB-Medium
10 g Baktotrypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 l Wasser, pH 7.5.
- MAB
0.5 M Maleinsäure, 0.75 M NaCl, pH 7.5.
- MBSH
880 mM NaCl, 24 mM NaHCO₃, 100 mM KCl, 4 mM CaCl₂, 3.3 mM Ca(NO₃)₂, 100 mM HEPES, 8 mM MgSO₄, pH 7.4.
- 1xMEM
100 mM MOPS pH 7.4, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, DEPC-H₂O.
- MEMFA
0.1% Tween 20, 3.7% Formaldehyd in MEM
- Nile-Blau-Färbelösung
0.01% Tween 20 über Nacht in 0.5 M Phosphatpuffer pH 7.8 lösen und filtrieren
- NBT/BCIP-Färbelösung
1,75µl/ml NBT und 3,5µl/ml BCIP (Roche) in AP-Puffer
- P1 Resuspensionspuffer
50mM Tris, 10mM EDTA, 100µg/ml RNase A, pH8.0
- P2 Lysepuffer
200mM NaOH, 1%SDS
- P3 Neutralisationspuffer
2,8M KAc, pH5.1
- Posthybridisierungslösung für Hühnchen-Ganzkeimfärbung
50% Formamid, 5xSSC, 1% SDS

- Posthybridisierung für Hühnchen-Ganzkeimfärbung2
50% Formamid, 2xSSC, 0,1% Tween 20
- 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% Tween 20.
- Proteinase K-Lösung
1% Proteinase K in TBST.
- 4% Paraformaldehyd
10g Paraformaldehyd und 0.5ml 1M NaOH in 150ml DEPC-Wasser auf 55 °C erhitzen, filtrieren und 25ml 10xPBS zugeben. Mit DEPC-Wasser auf 250ml auffüllen. pH auf 7.4 einstellen und bei –20 °C lagern
- 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
3M NaCl, 300 mM Na-Citrat pH 7.0.
- 0.2x SSC-T
0.2x SSC, 0.05% Tween 20.
- 2xSSC-T
2x SSC, 0,05% Tween 20
- TAE-Puffer
40 mM Tris/Acetat pH 8.3, 1 mM EDTA.
- 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% Tween 20.
- Triethanolamin-Lösung
0.1M 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.
- X-Gal Lösung, 50mg/ml in DMF

4 Methoden

4.1 Entwicklungsbiologische Methoden

4.1.1 Haltung von *Xenopus laevis*

Xenopus laevis, der afrikanische Krallenfrosch, benötigt eine Wassertemperatur zwischen 18° und 20° Celsius. Jeweils zirka zehn Tiere werden nach Geschlechtern getrennt in Becken von etwa 50 Litern Fassungsvermögen gehalten. Das Wasser wird mit Hilfe eines Bakterienfilters und durch UV-Strahlung keimfrei gehalten. Einmal in der Woche wird frisches Rinderherz als Beikost gegeben, sonst Fertigfutter in Form von Presslingen. Um die empfindliche Haut der Weibchen nach der künstlich herbeigeführten Eiablage zu beruhigen, werden sie über Nacht in ein Salzwasserbad (30g Meersalz auf 10l Anlagenwasser) gesetzt.

4.1.2 Eiablage

Um die Eireifung der Weibchen nach Bedarf zu stimulieren wird humanes Choriongonadotropin subkutan verabreicht. Für eine Eiablage nach 14-16 Stunden werden einmalig 600 Einheiten des Hormones injiziert. Soll die Eiablage nach 20-22 Stunden erfolgen, werden zunächst 50 Einheiten und 6-8 Stunden vor der gewünschten Eiablage nochmals 600 Einheiten verabreicht. Um die Eier zu erhalten werden die Weibchen mit der linken Hand so gehalten, dass die Hinterbeine fixiert sind. Die Eier können dann mit leichtem Druck der rechten Hand vorsichtig herausmassiert und in einer Petrischale aufgefangen werden. Zwischen den einzelnen Eiablagen sollte immer eine Stunde Pause liegen und nie mehr als vier Gelege an einem Tag gewonnen werden. Da die Haut von *Xenopus* sehr empfindlich ist, sollte sie stets feucht gehalten und wenn möglich auf Handschuhe verzichtet werden. Nachdem die Eiablage herbeigeführt wurde, sollten die Tiere mindestens drei Monate pausieren.

4.1.3 Testisextraktion

Zuerst wird das Männchen zur Betäubung für 30 Minuten in kalte 0.25% Aminobenzoessäure-Ethylester-Lösung umgesetzt. Das vollständig betäubte Tier wird getötet, indem die Halswirbelsäule mit einem schnellen Schnitt komplett durchtrennt wird. Die Bauchdecke wird durch einen paramedianen Schnitt geöffnet. Die Hoden befinden sich auf der dorsalen Seite, wo sie ventral der Nieren im Fettgewebe liegen.

Nach der Entnahme müssen sie meist noch von Fettgewebe befreit werden, bevor sie in 1xMBSH bei 4° C gelagert werden können. Der maximale Lagerungszeitraum beträgt zirka 4-5 Tage.

4.1.4 *In-vitro*-Fertilisation

Direkt nach der Eiablage müssen die Eier befruchtet werden. Durch *in-vitro*-Fertilisation wird dabei sichergestellt, dass eine möglichst vollständige, sowie gleichmäßige Befruchtung stattfindet, was wiederum zur synchronen Entwicklung der Embryonen führt. Die Spermiesuspension wird aus einem Drittel des Hodens hergestellt, der in zirka 1ml 1xMBSH mazeriert wird. Pro Gelege werden 100ml dieser Suspension zusammen mit 900ml sterilem Millipore-Wasser zugegeben und die Eier kräftig vermischt. Nach etwa 20min drehen sich die Eier mit der pigmentierten animalen Seite nach oben, sofern die Befruchtung erfolgreich war.

4.1.5 Entfernen der Gallerthülle und Färbung mit Nilblau

Um die Eier zu vereinzeln, muss die feste Gallerthülle entfernt werden. Dabei wird eine 2% Cysteinhydrochloridlösung (pH 8,2) für maximal 5min auf das Gelege gegeben. Es sollte zwischenzeitlich immer wieder kontrolliert werden, ob sich die Eier bereits getrennt haben. Um die Cysteinlösung zu entfernen wird dreimal mit 0,1xMBSH gespült. Dies ist auch das endgültige Kulturmedium. Handelt es sich um Eier der Albino Weibchen, folgt ein Färbeschritt. Die Eier werden 5min in Nilblau inkubiert und danach dreimal mit 0,1xMBSH gespült.

4.1.6 Pflege der Embryonen und Fixierung

Die Embryonen entwickeln sich temperaturabhängig, d.h. ihre Entwicklung kann durch eine entsprechende Umgebungstemperatur, die zwischen 14° und 25° Celsius liegen sollte, beeinflusst werden. Dabei ist es wichtig, dass das Kulturmedium täglich gewechselt und abgestorbene oder unbefruchtete Eier entfernt werden. Die Bestimmung der Entwicklungsstadien erfolgt nach Nieuwkoop und Faber (1967). Ist das gewünschte Stadium erreicht, werden die Embryonen gegebenenfalls mit Hilfe von Pinzetten von ihrer Eihülle befreit, mit 0,25% Aminobenzoessäure-Ethylester-Lösung betäubt und für eine Stunde in MEMFA fixiert. Über eine aufsteigende Ethanolreihe werden sie in 100% Ethanol überführt und bei -20° C gelagert.

4.1.7 Mikroinjektion

Zur Mikroinjektion der Embryonen müssen zunächst Hohlnadeln mit Hilfe des Micropipette Pullers hergestellt werden. Zur Injektion werden die Eier in eine 2% Agaroseschale platziert, in die kleine Vertiefungen eingelassen werden. So sind sie fixiert und bleiben mit der animalen Seite nach oben liegen. Injiziert wird im Rahmen dieser Arbeit entweder einseitig im 2-Zell Stadium oder im 16-Zell Stadium. Hier wird in jeweils eine dorsale und die angrenzende ventrale Zelle auf der animalen Seite injiziert. Das Flüssigkeitsvolumen von 4nl wird mit Hilfe eines Eichgitters bestimmt. Nach der Injektion werden die Eier in 0,1xMBSH überführt.

4.1.8 Brut- und Pflegebedingungen von *Gallus domesticus*

Die befruchteten Hühnereier wurden über Lohmann Tierzucht (Cuxhaven) bezogen. Sie können bis zu 12 Tage bei 5-6° C in feuchter Kälte gelagert werden. Bebrütet werden die Eier bei 37,8° C und 50-60% Luftfeuchtigkeit. Die Bestimmung der Entwicklungsstadien erfolgt nach Hamburger und Hamilton (1951). Dazu müssen die Eier mit einer spitzen Schere vorsichtig geöffnet werden. Die Embryonen können dann bestimmt und schließlich mit Hilfe von Pinzetten herauspräpariert werden. Dotterreste werden in 1xPBS entfernt und die Embryonen über Nacht bei 4° C in 4% Paraformaldehyd (pH7,4) fixiert. Über eine aufsteigende Ethanolreihe können sie dann in 100% Ethanol überführt und bei -20° C gelagert werden.

4.1.9 Gewebekultur

Ohrplakoden bzw. Vesikel können aus dem Embryo isoliert und weiterkultiviert werden (Kondo et al., 2002). Dabei muss auf Antibiotikazugaben verzichtet werden, da diese die Haarzellen schädigen. Die Vesikel/Plakoden werden zwischen Stadium HH10-13 entnommen und sofort in Kulturschälchen überführt. Damit die Vesikel nicht am Schalenboden anhaften, werden 1% Agarose in PBS gelöst, autoklaviert und in Schälchen gegossen. Es werden jeweils zwei Ohrvesikel pro Schale in folgendem Medium kultiviert: DMEM mit 4g/l Glucose, Na-Pyruvat und L-Glutamin, sowie 10% FCS. Auf die gleiche Art ist es ebenfalls möglich, größere Gewebeexplantate zu kultivieren. Dazu wird der Embryo aus dem Ei präpariert und der Bereich in dem sich die Ohrvesikel befinden großzügig mit einem Skalpell abgetrennt und in eine wie oben beschriebene vorbereitete Schale überführt. Der Mediumwechsel erfolgt alle 2-3 Tage. Die Schälchen werden bei 37°Celsius und 7% CO₂ inkubiert.

4.1.10 *In ovo* Elektroporation

Ein Vorteil des Modellorganismus *Xenopus* ist die leichte Manipulierbarkeit der Embryonen. Im Fall des Huhns ist diese Möglichkeit eingeschränkt. Um hier Morpholinos oder andere Konstrukte (siRNA, miRNA, etc.), die die Proteinsynthese hemmen, einzuschleusen bedient man sich der Elektroporation. Dabei werden zwei Elektroden angelegt, die innerhalb von 200ms durch drei aufeinanderfolgende Pulse von 20ms bei 20 Volt ein elektrisches Feld aufbauen. Es entstehen kleine Poren in der Zellmembran, die dadurch ihre Semipermeabilität einbüßt und DNA bzw. andere Konstrukte können in die Zelle eindringen (Zimmermann et al., 1974; Neumann et al., 1972). Die Elektroporation erfolgt am Besten ab HH12, wenn die Otocyste bereits geschlossen ist. Das Ei wird mit Tesafilm abgeklebt, so dass die Schale beim Öffnen mit der Schere nicht zerbricht. Um den durchsichtigen Embryo gut erkennen zu können, wird eine Mischung aus PBS und etwas schwarzer Tinte untergespritzt. Jetzt kann das Chorion vorsichtig mit zwei feinen Pinzetten aufgetrennt werden. Mit Hilfe einer Mundpipette wird das einzubringende Konstrukt in die Otocyste injiziert. Die Elektroden werden rechts und links davon platziert, so dass der Impuls so wenig umliegendes Gewebe wie möglich beeinträchtigt. Der ausgeschnittene Schalendeckel wird wieder aufgelegt und mit Klebeband fixiert, bevor die Embryonen für weitere 12 Stunden zurück in den Brutkasten gelegt werden.

4.1.11 Gen-Suppression durch *antisense* Morpholino Injektion

Um die Funktion eines bestimmten Proteins zu untersuchen, wird das dazugehörige Gen nach Möglichkeit funktionsunfähig gemacht („knockout“). Bei diploiden Organismen kann dies durch homologe Rekombination erfolgen. *Xenopus* ist jedoch tetraploid, was diese Technik extrem erschwert. Hier wird daher die Proteinsynthese durch *antisense* Morpholino Oligonukleotide gehemmt. Morpholinos sind künstlich synthetisierte Nukleinsäureanaloge, deren Zuckerrückgrat durch einen heterozyklischen Morpholinring ersetzt wird. Sie sind im Gegensatz zu Nukleinsäuren ungeladen und sehr stabil. Daher reagieren sie nicht mit intrazellulären Proteinen, so dass der Zellstoffwechsel durch die Injektion nicht beeinträchtigt wird. Das Morpholino wird komplementär zur endogenen mRNA, meist im Bereich des 5' UTR, synthetisiert, deren Translation gehemmt werden soll. Wird es injiziert, lagert es sich an die mRNA an und bildet einen stabilen Doppelstrang. Da Ribosomen nicht an doppelsträngige RNA binden können, unterbleibt die Proteintranslation. Morpholinos

werden nicht von endogenen Nukleasen erkannt, daher wird die doppelsträngige mRNA nicht abgebaut und kann mit verschiedenen RNA Detektionsmethoden nachgewiesen werden.

4.1.12 β -Galaktosidase Färbung

Um die injizierte Seite von der uninjizierten Seite zu unterscheiden, wird entweder Rhodamin gekoppeltes Dextran coinjiziert, das fluoresziert oder β -Galaktosidase RNA. Die Embryonen werden dann nur für 30 min in MEMFA fixiert und dreimal 5min in PBS gewaschen. Danach werden sie bei 4° C oder Raumtemperatur in der Färbelösung inkubiert. Nachdem die Färbung abgeschlossen ist, wird wieder dreimal 5min in PBS gewaschen und 30min in MEMFA fixiert. Die Lagerung erfolgt in 100% Ethanol bei 4° C.

4.1.13 Synthese von RNA-Sonden für Ganzkeim-ISH

Für die Ganzkeimfärbung mittels in-situ Hybridisierung müssen Digoxigenin markierte RNA-Sonden hergestellt werden, die komplementär zur gesuchten mRNA sind. Dazu wird ein Plasmid mit der entsprechenden spezifischen Sequenz linearisiert und die Sonde durch in-vitro-Transkription hergestellt. Dies geschieht mit Hilfe des „RNA-labelling Kits“ (Roche). 1 μ g linearisierte DNA-Matrize werden in 13 μ l RNase freiem Wasser gelöst und mit folgenden Lösungen auf 20 μ l Gesamtvolumen ergänzt:

2 μ l 10xNTP labeling Mixture

2 μ l 10x Transcription Buffer

1 μ l RNase Inhibitor

2 μ l RNA-Polymerase Sp6, T3 oder T7

Um RNase Kontamination zu verhindern, wird auf Eis und mit Handschuhen gearbeitet. Der Ansatz wird gründlich gemischt, kurz anzentrifugiert und für zwei Stunden bei 37° Celsius inkubiert. Um die DNA-Matrize zu verdauen werden 2 μ l DNaseI zugegeben und der Ansatz für weitere 15 Minuten bei 37° Celsius inkubiert. Anschließend kann die RNA mit Ethanol gefällt, in Wasser gelöst und bei 80° Celsius gelagert werden.

4.1.14 Ganzkeim-ISH von *Xenopus laevis*

Eine der Methoden zur Detektion von RNA in einzelnen Zellen, Geweben oder ganzen Organismen ist die Ganzkeimfärbung mittels *in-situ* Hybridisierung. Man synthetisiert eine mit Digoxigenin markierte RNA-Sonde (20-1000 Basen), die komplementär zur gesuchten mRNA ist (siehe 4.1.13). Diese wird in den Embryo eingeschleust und hybridisiert mit der endogenen mRNA. Die hybridisierte mRNA kann mit Hilfe eines Digoxigenin-spezifischen Antikörpers detektiert werden. An diesen Antikörper ist eine alkalische Phosphatase gebunden, die das Substrat NBT/BCIP (Tetrazolium-Salz/5-Brom-4-Chlor-3-idolyl-Phosphat) zu einem blauen schwer löslichen Präzipitat (Formazan) umsetzt. Es bildet sich nur in den Geweben/Zellen in denen die entsprechende mRNA synthetisiert wird eine blaue Färbung. So kann die räumliche und zeitliche Genexpression eines spezifischen Proteins dokumentiert werden. Die in MEMFA fixierten Embryonen werden in ein Schraubdeckelglas überführt und über eine absteigende Ethanol-Reihe (je 5min 75%, 50%, 25% Ethanol) rehydratisiert. Es folgen zwei 5minütige Waschschrte mit TBST. Damit die Sonde leichter in die Embryonen eindringen kann, wird ein Proteinase K Verdau vorgenommen. Dazu werden sie 30min in einer Proteinase K-Lösung (6U/ml) bei Raumtemperatur geschüttelt. Die enzymatische Reaktion wird durch zwei 5min Waschschrte mit frisch angesetztem 0,1M Triethanolamin (pH7,5) gestoppt. Um eine unspezifische Bindung durch die im Embryo vorhandenen basischen Proteine an die Sonde zu vermeiden, wird die Lösung durch Zugabe von 5µl Essigsäureanhydrid angesäuert. Nach 5min werden noch einmal 5µl Essigsäureanhydrid für weitere 5min zugegeben. Nach zwei 5minütigen Waschschrten mit TBST werden die Embryonen 30min lang in MEMFA nachfixiert. Die MEMFA Lösung wird gründlich durch fünfmaliges Waschen (je 5min) mit TBST entfernt. Es werden 500µl Hybridisierungspuffer zugegeben, die nach 5min durch frischen Hybridisierungspuffer ersetzt werden. Die Proben werden für mindestens vier Stunden bei 60° Celsius inkubiert, um alle unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen. Die Sonde wird vor Gebrauch in Hybridisierungspuffer gelöst und für 5min bei 85° C geschüttelt um eventuelle Sekundärstrukturen aufzutrennen. Der Hybridisierungspuffer wird durch 250µl Sonde ersetzt und über Nacht bei 60° C inkubiert. Die Sonde kann am nächsten Tag abgenommen und zur weiteren Verwendung bei -20° C aufbewahrt werden. Die folgenden Wasch- und Fixierungsschrte werden im Wasserbad bei 60° Celsius durchgeführt. Zunächst wird

einmal für 20min in 1ml Hybridisierungspuffer gewaschen, dann zweimal für 20min mit 2xSSC und zum Schluss zweimal 20min mit 0.2x SSC. Das SSC wird durch zweimaliges Waschen bei Raumtemperatur für je 10min mit TBST entfernt. In der nächsten Stunde werden die Embryonen in je 1ml Blockierungspuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Embryonen werden mindestens vier Stunden in der Antikörperlösung (1:2000) bei Raumtemperatur geschüttelt. Um die Antikörper zu entfernen, wird zweimal mit TBST für 5min gewaschen. Die Embryonen werden dann in 50ml Röhrchen mit TBST überführt, in denen sie über Nacht bei 4° C geschüttelt werden. Um sie auf den folgenden Färbeprozess vorzubereiten, werden sie zweimal im AP-Puffer gewaschen und in die Schraubdeckelgläser zurück überführt. Die Färbelösung mit NBT/BCIP ist lichtempfindlich, d.h. der Färbeprozess wird im Dunkeln mit je 1ml NBT/BCIP-Färbelösung durchgeführt. Um unspezifische Färbungen zu vermeiden, sollte die Reaktion zudem auf Eis stattfinden. Ist die gewünschte Farbtintensität erreicht, wird zweimal mit TBST gewaschen, eventuell mit Methanol entfärbt und dann mit MEMFA eine Stunde bei Raumtemperatur fixiert. Die Embryonen können mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe in 100% Ethanol überführt und bei -20° Celsius gelagert werden.

4.1.15 Gelatine-Albumin-Einbettung

Um Schnitte von Embryonen anzufertigen, die mittels Ganzkeim-ISH gefärbt wurden, müssen sie in einen Gelatine-Albumin-Mix eingebettet werden. Im Gegensatz zur einfachen Agaroseeinbettung ist er etwas härter, was dünnere Schnitte (zwischen 20-30µm) ermöglicht. Zur Einbettung wird zunächst ein Boden vorgegossen. Dazu werden zwei Aluminiumwinkel auf eine Aluminiumplatte aufgelegt, so dass sie ein Quadrat bilden. 1ml Gelatine-Albumin-Mix wird mit 70µl 25% Glutaraldehyd vermischt und in diese Form gegossen. Nachdem die Lösung auspolymerisiert ist, wird der Embryo, der zunächst 30min im Gelatine-Albumin-Mix äquilibriert wurde, auf diesem Boden ausgerichtet. Ein Milliliter Gelatine-Albumin-Mix wird mit 70µl 25% Glutaraldehyd vermischt und der Embryo damit überschichtet. Wenn die Masse erstarrt ist, wird der Würfel in Form getrimmt und mit Sekundenkleber auf dem Schneidetisch festgeklebt. Um gute Schnitte zu erhalten, sollte für jeden Embryo eine neue Rasierklinge ins Vibratom eingespannt werden. Die Schnitte werden auf einen Objektträger gezogen und glattgezogen. Nachdem die Schnitte etwas angetrocknet sind, können sie mit Mowiol oder Glycerin eingedeckelt werden.

4.1.16 Einbettung in Agarose und Anfertigung von Vibratomschnitten

Um Schnitte zu erhalten, die immungefärbt werden können, müssen die Embryonen in Agarose eingebettet werden. Die Embryonen werden, wenn nötig, zunächst durch eine absteigende Ethanolreihe rehydratisiert. Dann werden sie in 3%ige Agarose in TBST eingebettet. Ist die Agarose erstarrt, verfährt man wie in 4.1.15. Die Schnittdicke beträgt zwischen 30 und 40µm. Für eine Immunfärbung werden sie in 24-Well Platten überführt.

4.1.17 Immunfärbung auf Agarose- und Kryostatschnitten

Dabei ist zu beachten, dass die Kryostatschnitte zunächst getrocknet werden müssen. Dazu werden sie für eine Stunde bei Raumtemperatur gelagert, 10min in Aceton getaucht und anschließend wieder für eine Stunde bei Raumtemperatur vollständig getrocknet. Die Schnitte werden mit APBST für fünf Minuten gewaschen. Das APBST wird vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und die Schnitte zum Blockieren mit 1% BSA und 1% FCS in APBS für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Alle längeren Inkubationsschritte erfolgen für die Kryostatschnitte in einer feuchten Kammer. Der Primärantikörper wird in der angegebenen Verdünnung im Blockierungspuffer aufgebracht und über Nacht bei 4° Celsius inkubiert. Anschließend werden die Schnitte viermal 20 Minuten mit ABST gewaschen und für eine weitere Stunde blockiert, bevor der Zweitantikörper (1:400 im Blockierungspuffer) für eine Stunde bei 37° Celsius inkubiert. Die Schnitte werden wieder viermal 20 Minuten mit APBST gewaschen. Jetzt kann eine DAPI-Färbung oder eine weitere Immunfärbung erfolgen, indem die Schnitte erneut für zwei Stunden blockiert werden und wie oben verfahren wird. Ist die Färbeprozedur abgeschlossen werden die Schnitte auf einen Objektträger überführt und mit Mowiol oder Glycerin eingedeckelt.

4.1.18 Anfertigung von Gefrierschnitten am Kryostat

Um Schnitte anzufertigen, die zwischen 7 und 15µm dünn sind, eignet sich die Methode der Gefriertechnik. Dazu werden die fixierten Embryonen über eine absteigende Ethanolreihe rehydriert und zweimal mit TBS gewaschen. Dann werden sie für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit einer 100 mM NaCl/100 mM Tris-HCl-Lösung (pH 7.4) gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur in einem Gemisch aus 15% Gelatin und 15% Saccharose äquilibriert. Für eine weitere Nacht werden

die Embryonen in einem 25% Gelatin und 15% Saccharose-Gemisch inkubiert. In den Boden einer Silikonform wird ein Gemisch aus 20% Gelatin und 15% Saccharose gegossen. Die Embryonen werden in diese Lösung überführt und auf dem Boden der Form ausgerichtet. Für die nächste Stunde wird die Form auf Trockeneis gestellt, damit die Gelatine aushärten kann. Wenn der Gelatinewürfel gefroren ist, wird er zurechtgeschnitten und mittels eines speziellen Gewebeklebers bei -20° Celsius auf einen Träger geklebt. Die Schnitte werden im Kryotom mit Hilfe einer gekühlten Klinge bei -20° Celsius gemacht. Die Schnitte werden auf einen Superfrost- Objektträger übertragen und ihre Lagerung erfolgt bei -80° Celsius.

4.1.19 Immunfärbung mit DAPI

4'-6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) bildet mit doppelsträngiger DNA einen fluoreszierenden Komplex. Dabei lagert es sich in der kleinen Furche der DNA an, indem es durch Wasserstoffbrückenbindungen mit Adenosin-Thymidin-, Adenosin-Uridin- oder Inosin-Guanosin-Basenpaarungen stabilisiert. Die Stammlösung (1 mg/ml) wird 1:1000 in APBST verdünnt. Die Kryostat- bzw. Agaroseschnitte werden mit der DAPI-Lösung bedeckt und für ein bis zwei Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden die Schnitte zweimal für 5 Minuten mit APBST gewaschen.

4.2 Molekularbiologische und biochemische Methoden

4.2.1 Analytische Flachbett-Gelelektrophorese

Um DNA nach ihrer Größe aufzutrennen, bedient man sich der analytischen Flachbett-Gelelektrophorese. Nukleinsäuren tragen an jeder Monomereinheit eine Ladungseinheit, daher ist ihre Ladung proportional zur Moleküllänge, so dass im elektrischen Feld kleine Fragmente schneller wandern als Grosse. Für Moleküle die größer als 500bp sind wird ein 1% Agarosegel verwendet. Die Agarose wird durch Kochen in 1x TAE-Puffer gelöst und nachdem sie abgekühlt ist, mit Ethidiumbromid (1:10000) versetzt. Das noch flüssige Gel wird in eine vorbereitete Form gegossen, in die ein Kamm mit Ladetaschen eingefügt wurde. Nach dem Erkalten wird der Kamm entfernt und das Gel wird mit 1xTAE Puffer überschichtet. Jetzt werden die Proben, die mit Ladepuffer versetzt wurden, in die Ladetaschen gefüllt. Das Gel wird an eine Gleichspannung von 80-100 Volt angeschlossen und die Proben wandern der Anode entgegen. Dabei interkaliert das Ethidiumbromid mit den Basenpaaren der DNA. So kann die DNA mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht werden, da sie bei

bestimmten Wellenlängen (312nm oder 254nm) fluoresziert. Die Größe der DNA-Fragmente kann mit Hilfe eines Molekularmarkers mit definierter Größe bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der 2-log DNA-Marker (New England Biolabs) verwendet.

4.2.2 Lösen von Plasmid-DNA aus Filterpapier

Um Plasmidkonstrukte innerhalb verschiedener Arbeitsgruppen auszutauschen, kann die DNA auf ein Filterpapier aufgetropft und versendet werden. Die zugeschickten Plasmid-DNA Proben werden dann aus dem Filterpapier ausgeschnitten und mit 50µl oder mehr 10mM Tris-HCl (pH 7.6) versetzt. Der Ansatz wird gevortext und für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Von der Lösung werden 0.5 bis 5µl für eine Transformation verwendet.

4.2.3 Restriktionsanalyse von DNA

Durch bakterielle Restriktionsendonukleasen kann doppelsträngige DNA auf verschiedene Arten geschnitten werden. Jede Endonuklease schneidet an einer spezifische Erkennungssequenz, die je nach Bedarf glatt oder überhängend gewählt werden kann. Ein Restriktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20µl sollte ca.0.5-1µg DNA, 1µl Restriktionsendonuklease, 2µl 10xBSA und 2µl 10xPuffer enthalten. Der Restriktionsverdau erfolgt bei 37°Celsius in mindestens einer Stunde oder über Nacht.

4.2.4 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren können mit Hilfe von Ethanol gefällt werden. Dazu wird ein Zehntel Volumen 3M Natriumacetat-Lösung (pH 5.2) und ein Zwanzigstel Volumen 0.5M EDTA Lösung (pH 8.0) zugegeben. Gefällt werden die Nukleinsäuren durch die Zugabe des doppelten Volumens absoluten Ethanol. Nach mehrmalige invertieren des Reaktionsgefäßes wird der Ansatz für fünfzehn Minuten bei -20° Celsius inkubiert. Die Nukleinsäuren werden durch fünfzehnminütige Zentrifugation bei 13000xg sedimentiert, der Überstand abgenommen. Der Niederschlag kann mit 70% Ethanol gewaschen werden. Die Nukleinsäuren werden bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich in einem möglichst geringen Volumen Aqua bidest. gelöst.

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

Alle Transformationen der vorliegenden Arbeit wurden mit chemisch-kompetenten *E.coli* Bakterien NEB 5-alpha (New England Biolabs) durchgeführt. Dazu wurden für Retransformationen 5µl, für Transformationen von Plasmid-DNA aus Filterpapier 10µl verwendet. Alle Schritte wurden auf Eis ausgeführt. Die Bakterien werden mit 0,5-5µl der Plasmidlösung versetzt und 30-45min auf Eis inkubiert. Es folgt ein Hitzeschock für genau 45 Sekunden bei 42° C im Wasserbad. Die Bakterien werden sofort zum Abkühlen auf Eis gesetzt und mit 400-900µl SOC-Medium versetzt. Die Kultur kann für eine Stunde bei 37° Celsius geschüttelt werden, bevor je 400µl auf eine vorgewärmte LB-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert wird. Die Platten werden bei 37° Celsius über Nacht inkubiert.

4.2.6 Isolierung bakterieller Plasmid-DNA im Kleinmaßstab

Um bakterielle Plasmid-DNA im Kleinmaßstab zu gewinnen, werden transformierte *E.coli* Bakterien über Nacht in 3-4ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotika 1:1000) bei 37° Celsius kultiviert. Diese Zellen werden durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 8900xg sedimentiert. Das Zellpellet wird in 400µl Resuspensions-Puffer (P1) resuspendiert und je 400µl vom Lysepuffer (P2) und Neutralisationspuffer (P3) zugegeben. Die Ansätze werden gut gemischt und dann bei 13000xg für 15min zentrifugiert. Jetzt können 900µl klarer Überstand abgenommen und mit 600µl Isopropanol vermischt werden. Das Isopropanol fällt die DNA, die dann für 20min bei 13000xg abzentrifugiert wird. Die Flüssigkeit wird abgenommen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und wieder für 5min zentrifugiert. Das Pellet kann dann getrocknet und in Wasser gelöst werden. Die Lagerung erfolgt bei -20° Celsius.

4.2.7 Isolierung bakterieller Plasmid-DNA im Mittelmaßstab

Um bakterielle Plasmid-DNA im Mittelmaßstab zu isolieren, wird das Nucleobond XtraMidi Kit von Macherey Nagel verwendet. Das Prinzip der Plasmid-DNA Gewinnung ist für den Mittelmaßstab das Gleiche wie beim Kleinmaßstab. Die transformierten *E.coli* werden über Nacht bei 37° Celsius in 50ml LB-Medium mit Antibiotika geschüttelt. Die Zellen werden bei 10000xg für 10 Minuten sedimentiert und in 8ml Zellresuspensions-Puffer resuspendiert. Um die Zellen zu öffnen, werden 8ml Zell-Lysis-Puffer zugegeben und die Suspension für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In die Säule wird ein Filter gesteckt, der mit 12ml

Äquilibriumspuffer äquilibriert wird. Zum Neutralisieren werden 8ml Neutralisationspuffer zum Ansatz zugegeben und zwei- bis dreimal invertiert. Das Lysat wird in den Filter gegeben. Wenn der Ansatz durchgelaufen ist, wird mit 8ml Äquilibriumspuffer gewaschen. Der Filter wird entfernt und es folgt ein zweiter Waschschrift mit 8ml Waschpuffer. Die Säule wird in ein neues Falcon-Reaktionsgefäß überführt und mit 5ml Elutionspuffer eluiert. Die DNA wird durch Zugabe von 3,5ml Isopropanol gefällt und für 30min bei 13000rpm und 4° C pelletiert. Es folgt ein Waschschrift mit 70% Ethanol. Die DNA kann dann in 600µl nukleasefreiem Wasser gelöst und bei -20° C gelagert werden.

4.2.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren durch das Photometer

Um die Nukleinsäurenkonzentration einer Lösung zu bestimmen, wird ihre Absorption bei 260nm gemessen. Zusätzlich kann man bei dieser Methode auch eine Aussage über die Reinheit der DNA/RNA machen. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz gilt für die Konzentration $C[\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times V \times F$ A_{260} steht für die Absorption bei 260 nm, V für den Verdünnungsfaktor und F für einen Multiplikationsfaktor, der für doppelsträngige DNA 50 und für RNA 40 ist. Die Messung erfolgt also bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm. Um die Reinheit der Probe zu ermitteln, wird die Proteinkonzentration anhand der Absorption ihrer aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm ermittelt. Der Quotient aus den beiden gemessenen Absorptionen (260/280) zeigt die Reinheit der Nukleinsäureprobe an. Er sollte zwischen 1.8 und 2.0 liegen.

4.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Die zu amplifizierende Sequenz wird durch die Wahl zweier geeigneter Primer begrenzt. Da der Ansatz höheren Temperaturen ausgesetzt wird, muss eine hitzestabile Polymerase gewählt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR Reaktion mit einer Taq Polymerase durchgeführt. Sie stammt aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*. Ein Reaktionsansatz mit dem Gesamtvolumen von 25µl enthält 50-100ng der DNA-Matrize. Die Endkonzentrationen der übrigen Komponenten sind 200µM dNTP, 0,02U/µl Taq-Polymerase und je 0,5µM der beiden Primer in 1x Reaktionspuffer. Diese Komponenten werden auf Eis zusammenpipettiert und durchlaufen dann 40 Zyklen im Thermocycler. Zunächst beginnt das Programm

einmalig mit einem zweiminütigen Denaturierungsschritt bei 95° Celsius. Der sich wiederholende Zyklus besteht aus je 30 Sekunden bei 95° Celsius zur Auftrennung der DNA. Es folgen 30 Sekunden bei 55° Celsius, damit sich die Primer spezifisch an die jetzt einsträngig vorliegende DNA anlagern und 90 Sekunden bei 72° Celsius. Der letzte Schritt dient der DNA-Neusynthese durch die Taq-Polymerase. Nach der Durchführung dieser Zyklen folgt eine fünfminütige Inkubation bei 72° C. Die Proben können bei –20° Celsius gelagert werden.

4.2.10 Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Um die vorhandene instabile mRNA in der Polymerase Kettenreaktion untersuchen zu können, muss sie zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Dazu wird eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die Reverse Transkriptase eingesetzt. Als Primer dient hier eine Oligo-dT Sequenz, die am Poly-A-Schwanz bindet. Es werden zwischen 200-800ng gesamt RNA als Matrize eingesetzt. Um die Bindung der Oligo dT's zu erleichtern, wird der Ansatz zunächst auf 6µl mit Wasser aufgefüllt. Dann werden 2µl OdT's zupipettiert und das Ganze bei 72° C für 5min inkubiert und sofort wieder auf Eis gestellt. Dieser Schritt muss separat erfolgen, da sonst die Reverse Transkriptase denaturiert wird. Jetzt werden 4µl 5xRT-Puffer, 1µl dNTP's, 0,5µl Reverse Transkriptase ergänzt und mit Wasser auf ein Endvolumen von 20µl aufgefüllt. Die eigentliche Reaktion findet zuerst für 5min bei 25° C, dann für eine Stunde bei 42° C statt. Die cDNA wird bei -80° Celsius gelagert.

4.2.11 Sequenzanalyse

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgt nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977) unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten dNTP's. In Auftrag gegeben wurden die Sequenzierungen bei GATC Biotech, Konstanz.

4.2.12 Gewinnung von RNA aus Gewebe

Um die vorhandene mRNA im Ohrgewebe des Hühnchens zu untersuchen, wurden 20-30 Ohrvesikel verschiedener Stadien freipräpariert und gesammelt. Die Aufreinigung erfolgte mit Trizol. Die Ohrvesikel werden mit 500µl Trizol versetzt und durch auf- und abpipettieren homogenisiert. Nach Zugabe von 100µl Chloroform wird invertiert und 2-3min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 30min Zentrifugation (4° C, 13000rpm) wird der klare Überstand weiterverwendet. Die Chloroformzugabe und

Zentrifugation wiederholen und wieder den klaren Überstand abnehmen. Er wird mit dem 0.7fachen Volumen Isopropanol gemischt und gevortext. Die RNA wird 15min bei Raumtemperatur gefällt und anschließend durch 30min Zentrifugation pelletiert (13000rpm, 4° C). Das Pellet mit 100µl 70% Ethanol waschen und erneut 30min zentrifugieren (13000rpm, 4° C). Das Pellet in DEPC Wasser resuspendieren und bei -80° C lagern.

4.2.13 *In-vitro*-Transkription

Um RNA zu synthetisieren, die später in die Embryonen injiziert und dort auch translatiert werden soll, bedient man sich dem mMACHINE Transkription Kit (Ambion). Vor jedem Gebrauch werden der 10xReaktionspuffer und die Ribonukleotide gut durchmischt, so dass sie vollständig gelöst vorliegen. Der RNA- Polymerase-Mix und die Ribonukleotide müssen auf Eis gekühlt werden, während der 10xReaktionspuffer bei Raumtemperatur aufgetaut werden kann. Um Fehler zu vermeiden werden alle Reagenzien vor Gebrauch kurz anzentrifugiert. Bei Raumtemperatur werden zusammenpipettiert: 10µl Ribonukleotide (NTP/CAP), 2µl RNA-Polymerase-Mix, 2µl 10xReaktionspuffer und 1µg linearisierte Plasmid-DNA . Das Endvolumen von 20µl wird mit Wasser aufgefüllt. Alle Lösungen müssen RNase frei sein. Der Ansatz inkubiert für zwei Stunden bei 37° Celsius. Um die Matrizen DNA zu entfernen wird noch einmal für 15 Minuten bei 37° C unter Zugabe von 1µl DNase I inkubiert. Jetzt kann die synthetisierte RNA gefällt und verwendet werden, sie sollte jedoch noch einmal mittels Flachbett Gelelektrophorese überprüft werden. Gelagert wird die RNA bei -80° Celsius.

5 Ergebnisse

5.1 Funktionelle Charakterisierung von PAPC während der Innenohrentwicklung

5.1.1 PAPC Expression während der Innenohrentwicklung

PAPC zeigt ein auffälliges lokal sehr eingeschränktes Expressionsmuster zu Beginn der Organogenese. PAPC Transkripte sind zu diesem Zeitpunkt nur im Ohrvesikel und im Schwanzorganisor zu finden. Um seine funktionelle Bedeutung während der Ototogenese zu ermitteln, wurde zunächst ein detailliertes Expressionsprofil über die Ohrvesikelbildung erstellt (Abb. 5-1).

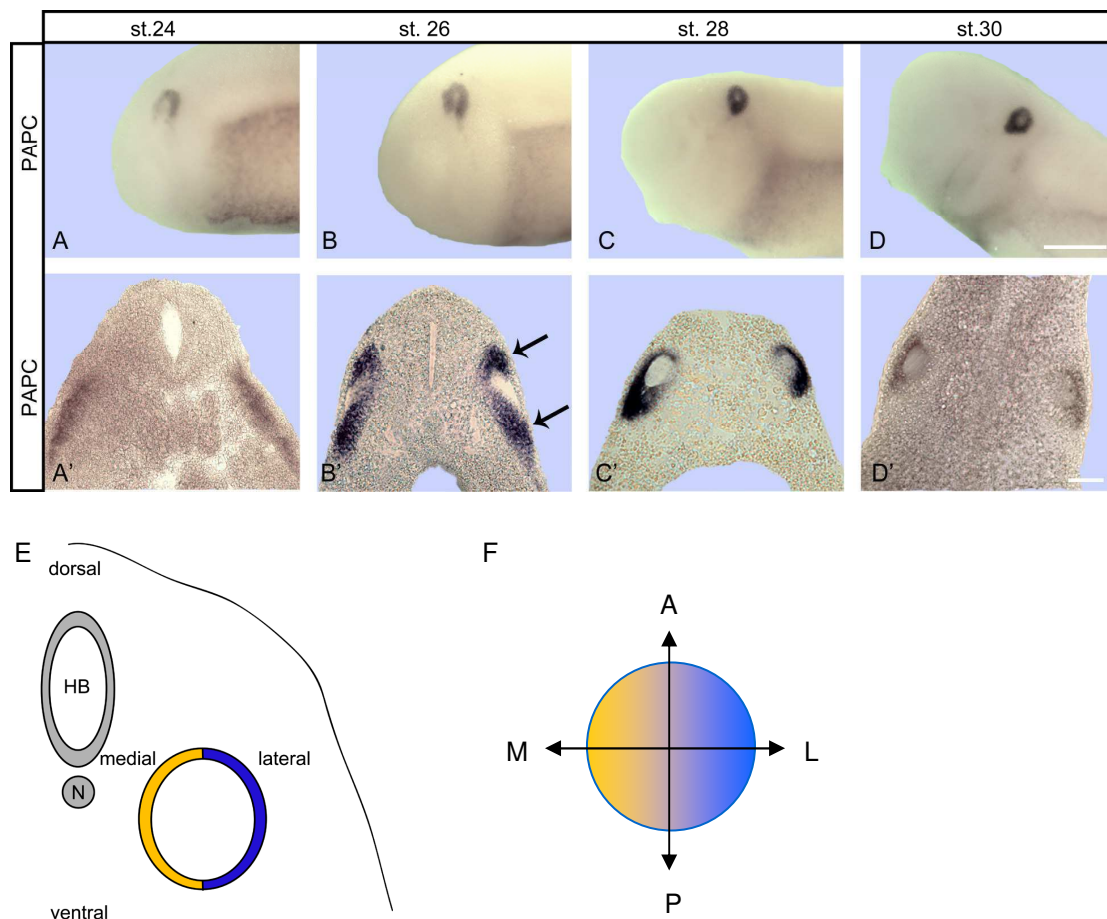


Abb. 5-1: Expressionsprofil von PAPC während der Innenohrentwicklung. Ganzkeim-ISH mit PAPC auf (A-D) Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien und (A'-D') den dazugehörigen Transversalschnitten. Pfeile zeigen laterale PAPC Expression im Ohrepithel. Stadieneinteilung nach Nieuwkoop und Faber (1967). Maßstab A-D 500µm. Maßstab A'-D' 100µm. (E, F) Schematische Darstellung eines Ohrvesikels. (E) Transversalschnitt durch *Xenopus* auf Höhe des Rhombomers 5. Laterale Bereiche der Otocyste sind blau dargestellt, mediale Bereiche gelb. HB, Rhombenzephalon; N, Notochord. (F) zeigt eine dreidimensionale Otocyste. A, Anterior; P, Posterior; L, lateral; M, Medial.

Die Innenohrentwicklung kann, wie bereits in der Einleitung beschrieben, in verschiedene Entwicklungsbereiche eingeteilt werden. Abbildung 5-1 zeigt den Prozess der Invagination (Stadium 24-28), der Neuroblastenauswanderung (Stadium 26), die Otocystenmusterung (ab Stadium 28) und den Beginn der späten Morphogenese (ab Stadium 30). Zu Beginn des Invaginationsprozesses (Abb.5-1 A, A') wird PAPC im gesamten Plakodenepithel exprimiert. Mit fortschreitender Entwicklung und beginnender Invagination konzentriert sich die Expression auf die sich aufeinander zu bewegenden Epithelseiten (Abb.5-1 B', Pfeile). Im weiteren Verlauf bewegen sich die beiden Epithelseiten aufeinander zu, fusionieren und bilden so die Otocyste. Ab diesem Zeitpunkt (Abb.5-1 C', D') konzentriert sich die PAPC Expression vollständig auf das laterale Gewebe, der mediale Teil der Otocyste exprimiert kein PAPC.

Die PAPC Expression im Ohrepithel wird mindestens bis Stadium 40 aufrechterhalten. Ab Stadium 37 wird sie jedoch insgesamt schwächer und wird dann im gesamten Ohrepithel exprimiert (Daten der Diplomarbeit).

5.1.2 Repression der PAPC Translation durch *antisense* Morpholino

Oligonukleotide führen zu morphologischen Defekten der Otocyste

Um die Funktion von PAPC in der Ohrentwicklung zu untersuchen, wurde seine Translation durch Injektion von *antisense* Morpholino Oligonukleotiden (kurz: Morpholino) unterdrückt. Da bisher zwei Pseudoallele von PAPC bekannt sind, wurden zur besseren Translationsrepression zwei verschiedene Morpholinos ko-injiziert. Die Funktionalität und Spezifität der Morpholinos wurde bereits in verschiedenen Veröffentlichungen gezeigt (Unterseher et al., 2004; Medina et al., 2004).

Um die Morpholinos in den Organismus einzubringen, wurden sie in eine Blastomere des Zwei-Zell Stadiums injiziert. Durch die einseitige Injektion ist entwicklungsbedingt nur eine Seite des Embryos von der Injektion betroffen, die andere Seite bleibt als Wildtyp erhalten und kann als direkter Vergleich dienen. Die Injektion erfolgt zudem möglichst animal, so dass die Organisatorregion nicht betroffen ist. In dieser Arbeit war es die Aufgabe gezielt die Region der Ohrentwicklung zu treffen und die Spezifität eines veränderten Phänotyps zu belegen.

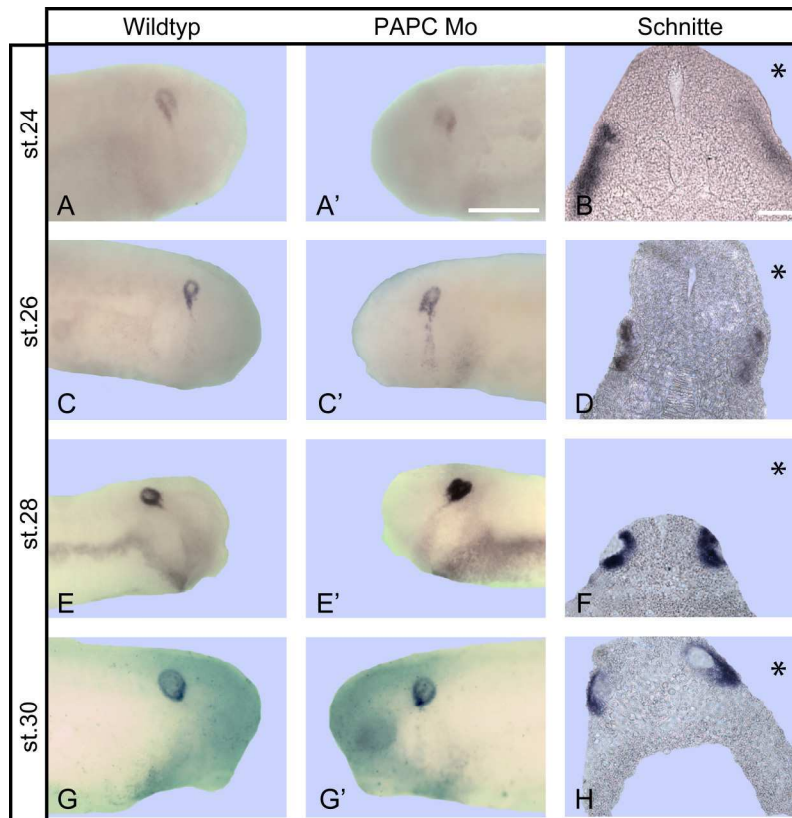


Abb. 5-2: PAPC Knockdown resultiert in morphologischen Veränderungen der Otocyste. PAPCMo (PAPC *antisense* Morpholino Oligonukleotid) wurde in eine Blastomere im 2-Zell Stadium injiziert. Ganzkeim ISH auf XPAPC Transkripte in Stadien 24, 26, 28 und 30. Maßstab 500µm. Dargestellt sind nicht injizierte (A, C, E, G) und injizierte (A', C', E', G') Seite eines Embryos und die dazugehörigen Transversalschnitte (B, D, F, H). Zu sehen ist eine deutliche Veränderung der Otocyste auf der injizierten Seite. Der Stern markiert die iniizierte Seite. Maßstab 100um.

Die Proteinsynthese wird durch die Morpholinos in ihrer Translation gehemmt, jedoch kann aufgrund der Stabilität des Morpholinos die mRNA nicht abgebaut werden. Somit ist eine mRNA Detektion mit Hilfe der Ganzkeimfärbung möglich (Abb.2). Die untersuchten Stadien zeigen eine Veränderung der Otocystenmorphologie, hauptsächlich in den frühen Stadien (Abb.2 A', C', D'), was besonders gut in den Transversalschnitten zu erkennen ist (Abb.2 B, D, F, H). Bis Stadium 30 haben sie die morphologischen Veränderungen jedoch wieder kompensiert und die Otocyste weist annähernd die Form des Wildtyps auf (Abb.2 G-H).

Alle weiteren Untersuchungen beschränkten sich daher auf den frühen Teil der Ohrentwicklung, der offensichtlich von der PAPC Expressionsunterdrückung betroffen ist.

5.1.3 Nachweis der Spezifität der durch die PAPC Depletion bedingten Defekte in der Otocyste

Morphologische Defekte können allein durch die mechanische Beeinträchtigung des Embryos wie Injektion bedingt sein. Um dies auszuschließen, wurden zwei Kontrollen durchgeführt. Zum einen wurde ein Kontroll Morpholino injiziert und zum anderen

sollten die durch Morpholinos verursachten Effekte durch Ko-Injektion der entsprechenden mRNA rekonstituiert werden. Kann die Wiederherstellung der Wildtypsituation erreicht werden, gilt dies als Nachweis für die Spezifität des Morpholinos.

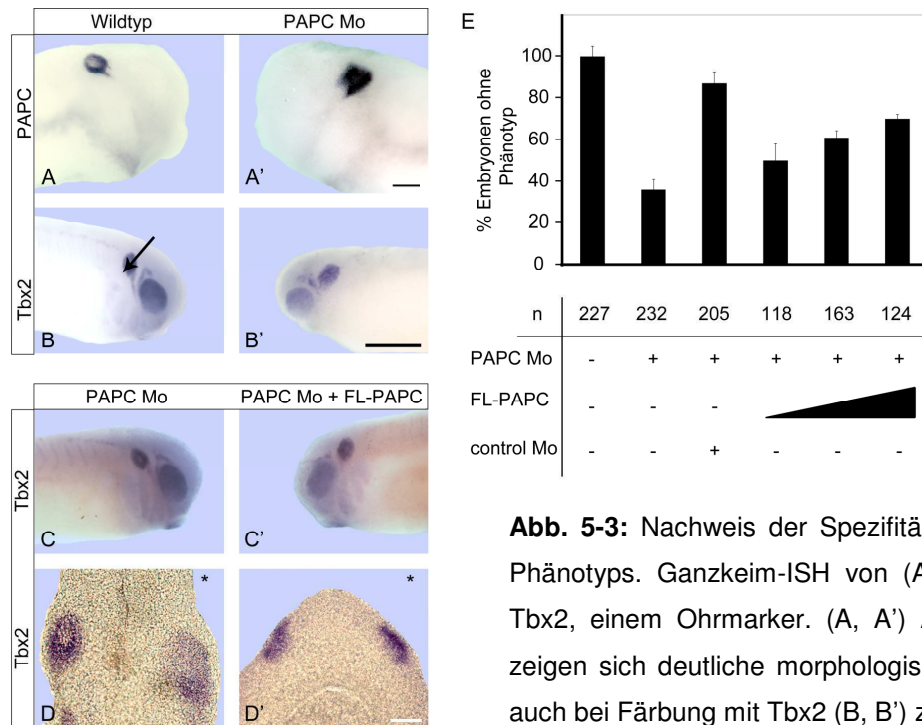


Abb. 5-3: Nachweis der Spezifität des PAPC Morpholino Phänotyps. Ganzkeim-ISH von (A, A') PAPC und (B-C') Tbx2, einem Ohrmarker. (A, A') Auf der injizierten Seite zeigen sich deutliche morphologische Veränderungen, die auch bei Färbung mit Tbx2 (B, B') zu erkennen sind. (C, C')

Rekonstitution durch Ko-Injektion mit PAPC RNA. (D, D') Transversalschnitte durch einen Embryo, der mit Tbx2 gefärbt wurde. (D) Mit PAPC mRNA ko-injizierter Embryo. (D') Auf der injizierten Seite ist das Ohrepithel und die Tbx2 Expression nicht mehr klar abgegrenzt. (E) Statistische Erfassung der morphologischen Veränderungen. Embryonen, die einseitig injiziert und mit Tbx2 ganzkeimgefärbt wurden, wurden auf Unterschiede zwischen injizierter und nicht injizierter Seite hin ausgezählt. Normalisiert wurde im Bezug auf uninjizierte Wildtyp-Embryonen. Die Sterne markieren die injizierte Seite, alle Embryonen wurden im Stadium 26 fixiert. PAPC Morpholino (PAPC Mo), PAPC mRNA (FL-PAPC), Kontroll Morpholino (Kontroll Mo). Die PAPC mRNA Konzentrationen betragen 100, 250 und 500pg. Die Injektion erfolgte einseitig im Zwei-Zell Stadium. Maßstab A, A' 250µm. Maßstab B-C' 500µm. Maßstab D, D' 100µm.

Da die Auswirkungen der PAPC Morpholinos auf die Otocyste im Stadium 26 am schwerwiegendsten sind (Abb. 5-3 A-B'; 5-2), wurde zunächst dieses Stadium für weitere Studien gewählt. Die PAPC Morpholinos wurden im Zwei-Zell Stadium in eine Blastomere injiziert und die Embryonen mittels Ganzkeim-ISH untersucht. Als Ohrmarker dient Tbx2, das zur Familie der T-box Transkriptionsfaktoren gehört und das ab Stadium 19 unter anderem in der Ohranlage exprimiert wird (Hayata et al., 1999). Die PAPC Depletion führt lediglich zu morphologischen Veränderungen, die

Tbx2 Expression selbst war nur in wenigen Fällen leicht reduziert und niemals vollständig unterdrückt. Da es zu allgemeinen Veränderungen der Epithelmorphologie kommt, zeigen sich diese Auswirkungen im Tbx2-Expressionsmuster. Abbildung 5-3 (B, B') stellt eine der am häufigsten auftretenden morphologischen Veränderungen dar. Sie zeigt eine diffuse Expression von Tbx2, die sich über den gesamten Ohrbereich ausdehnt und keinen Hohlraum mehr bildet, wie er auf der uninjizierten Seite gut zu erkennen ist (Abb. 5-3 B, Pfeil). In Transversalschnitten wird der Effekt der PAPC Depletion auf die Epithelformation besonders deutlich (Abb. 5-3 C').

Zur Rekonstitution dieser Effekte wurden steigende Mengen an PAPC mRNA ko-injiziert und die Embryonen mittels Ganzkeimfärbung auf Tbx2 Expression hin untersucht. Die injizierte Seite wurde dann mit der Wildtypseite verglichen und eventuelle Veränderungen der Morphologie dokumentiert. Um bereits beim Wildtyp vorhandene Unterschiede der Epithelformation auszuschließen, wurden die Daten im Bezug auf den Wildtyp normalisiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-3, E erfasst. Eine weitere Kontrolle des Morpholinos hinsichtlich spezifischer Effekte und zur Überprüfung eventueller Auswirkungen durch den künstlich eingeführten Fremdkörper ist die Injektion eines Kontroll Morpholinos, das jedoch keine Effekte hervorruft.

Die durch PAPC Depletion verursachten Veränderungen können dosisabhängig rekonstituiert werden, wobei mit 500pg PAPC mRNA die besten Ergebnisse erzielt werden. Die Resultate belegen deutlich, dass es sich um einen spezifischen Effekt der PAPC Morpholinos handelt und somit PAPC eine Rolle während der frühen Ohrentwicklung spielt.

5.1.4 PAPC ist nicht für die Innervierung der Otocyste erforderlich

Die Ohrplakode ist in der Lage jedes Ohrgewebe zu erzeugen, unter anderem auch die eigene Innervierung. Ab Stadium 25 beginnen einzelne Vorläufnernervenzellen, Neuroblasten genannt, nach anterior-ventral auszuwandern (siehe Einleitung, Kapitel 1.2.3). Diese Neuroblasten sind zu Beginn noch PAPC positiv (Abb. 5-4 A).

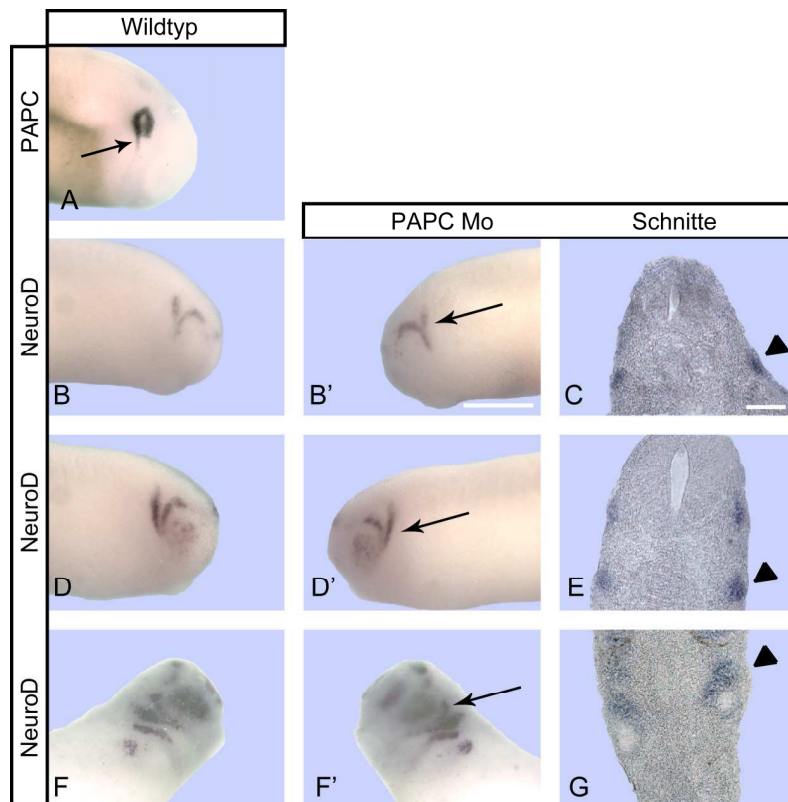


Abb. 5-4: PAPC hat keinen Einfluss auf die Induktion und Migration der Neuroblasten. (A) Ganzkeim-ISH eines Wildtypembryo Stadium 26 mit PAPC. Der Pfeil zeigt die PAPC positiven migrierenden Neuroblasten. (B, B', D, D', F, F') Ganzkeim-ISH mit NeuroD auf Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien. Maßstab 500µm. (C, E, G) zeigen die dazugehörigen Transversalschnitte. Pfeilköpfe markieren den kranialen Nerv VIII. Maßstab 100µm.

Um einen Einfluss der PAPC Depletion auf die Neuroblastenmigration zu untersuchen, wurde eine Ganzkeimfärbung an einseitig mit Morpholino injizierten Embryonen vorgenommen. Als Marker dient dabei NeuroD, ein *basic helix-loop-helix* Transkriptionsfaktor, der in proneuralen, sich ausdifferenzierenden Nervenzellen exprimiert wird, so unter anderem auch im kranialen Nerv VIII, der das Innenohr innerviert (Abb. 5-4 B-G) (Lee et al., 1995). Die Ganzkeim-ISH zeigen keine Veränderung der NeuroD Expression, die Innervierung der Otocyste scheint also von einem PAPC Verlust nicht betroffen zu sein.

5.1.5 PAPC hat keinen Einfluss auf die Induktion der Ohrplakode und die Musterung der Otocyste

Während der fortlaufenden Entwicklung der Otocyste kommt es zur differentiellen Expression verschiedener Markergene, die die verschiedenen Bereiche der Otocyste spezifizieren, was als Musterung der Otocyste bezeichnet wird. Um zu prüfen, ob dieser Musterungsprozeß durch Verlust von PAPC beeinträchtigt wird, wurde eine Ganzkeim-ISH auf verschiedene Marker durchgeführt.

Eine Ganzkeim-ISH an einseitig PAPC defizienten Embryonen verschiedener Markergene im Stadium 26 ist in Abbildung 5-5 dargestellt.

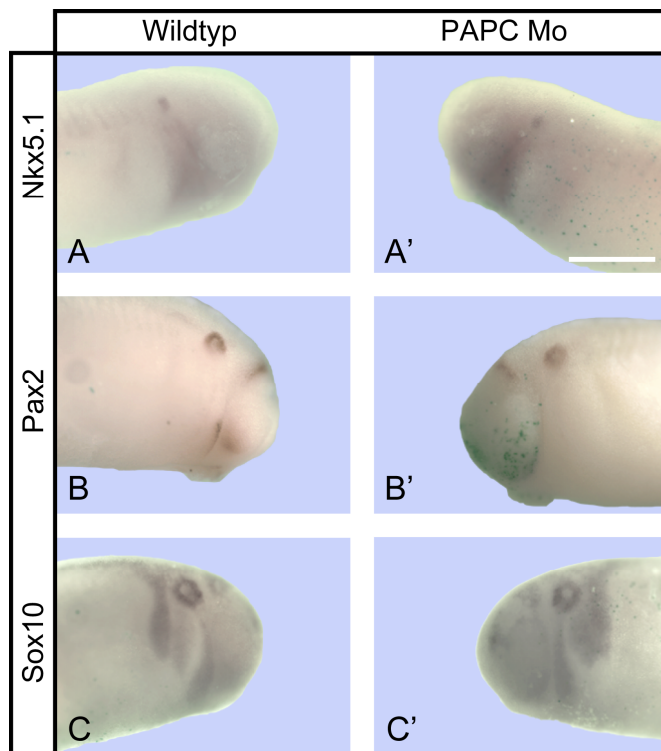


Abb. 5-5: PAPC spielt keine Rolle bei der Induktion und Musterung der Otocyste. Embryonen wurden einseitig im Zwei-Zell Stadium mit PAPC Morpholino injiziert und im Stadium 26 fixiert. Die Ganzkeim-ISH erfolgte mit (A, A') Nkx5.1, (B, B') Pax2, (C, C') Sox10. Maßstab 55µm.

Sox10 ist ein Homeobox-Transkriptionsfaktor, dessen Transkripte im gesamten Ohrepithel zu finden sind, der aber zusätzlich auch in den Neuralleistenzellen exprimiert wird (Aoki et al., 2003). Nkx5.1 hingegen wird lediglich im anterioren Epithel, also regional eingeschränkt exprimiert. Die Transkripte dieses Transkriptionsfaktors finden sich ab Stadium 22 in der Ohranlage, später auch im Pronephros (Bayramov et al., 2004). Pax2, ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, markiert unter anderem die dorsale Otocyste. Er wird zusätzlich im Auge und im Mes-, sowie Rhombenzephalon exprimiert (Heller und Brändli, 1997).

Alle Marker werden auch dann exprimiert, wenn die PAPC Translation herunterreguliert wurde (Abb.5-5, A-D). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl die Plakodeninduktion, als auch die spätere Musterung, also die Regionalisierung der Otocyste, nicht von einer PAPC Expression abhängig sind.

5.1.6 Die Bildung der Otlithen ist nicht von PAPC abhängig

Die unterstützenden Zellen der Cristae sind in der Lage die kalziumkarbonathaltigen Otolithen zu synthetisieren (Wang et al., 1998). Sie liegen im vestibulären Teil des Innenohres und sind in späteren Stadien relativ gut von außen einsehbar (Abb. 5-6). Sie sind essentiell für die Perzeption des Gleichgewichts und der Beschleunigung.

Vorangegangene Analysen hatten ergeben, dass ein großer Teil der einseitig PAPC defizienten Embryonen im Kreis um die eigene Achse schwammen (Daten der Diplomarbeit). Dies deutet darauf hin, dass der frühe Verlust von PAPC möglicherweise einen Effekt auf die späte Innenohrentwicklung hat, insbesondere den vestibulären Apparat, der für das Gleichgewicht zuständig ist. Um eine Veränderung der Otolithensynthese durch den Verlust von PAPC auszuschließen, wurden die Embryonen einseitig mit PAPC Morpholino injiziert und im Stadium 42 fixiert. Lediglich die im Kreis schwimmenden Embryonen wurden auf Unterschiede der Otolithen mittels optischer Kontrolle untersucht. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Otolithenanzahl oder Lage (100% der Embryonen zeigen korrekt ausgebildete Otolithen, n=21).

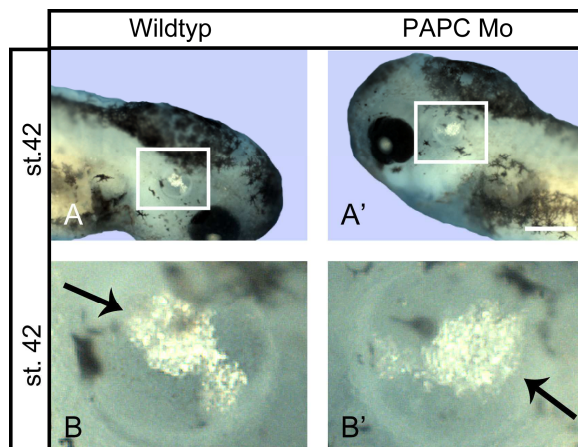


Abb. 5-6: PAPC ist nicht in die Bildung der Otolithen involviert. Embryonen wurden einseitig im Zwei-Zell Stadium mit PAPC Morpholino injiziert. Die Embryonen sind im Stadium 42. (A) zeigt die uninjizierte Seite, (A') die injizierte Seite. Die Pfeile markieren die Otolithen. Maßstab 1000 μ m.

Die Funktion von PAPC in der Innenohrentwicklung kann also zunächst stark eingeschränkt werden. Wie bereits gezeigt, spielt PAPC keine Rolle bei der Induktion, der Innervierung, der Musterung und der Otolithensynthese. Entsprechend beschränkten sich die weiteren Untersuchungen auf den Invaginationsprozess (Stadium 24-28).

5.1.7 Der Verlust von PAPC beeinflusst die Epithelstruktur der Otocyste

Die Funktion von PAPC ist mit dem Wnt/ PCP Signalweg assoziiert, der eine planare Polarität der Zellen vermittelt (Unterseher et al., 2004, Medina et al., 2004). Um eine mögliche Rolle von PAPC bei der Entwicklung des polaren Innenohrepithels zu untersuchen, wurden daher zunächst immunhistologische Analysen mit verschiedenen Markerproteinen durchgeführt, die die apikal-basale Polarität des Innenohrepithels dokumentieren (Abb. 5-7).

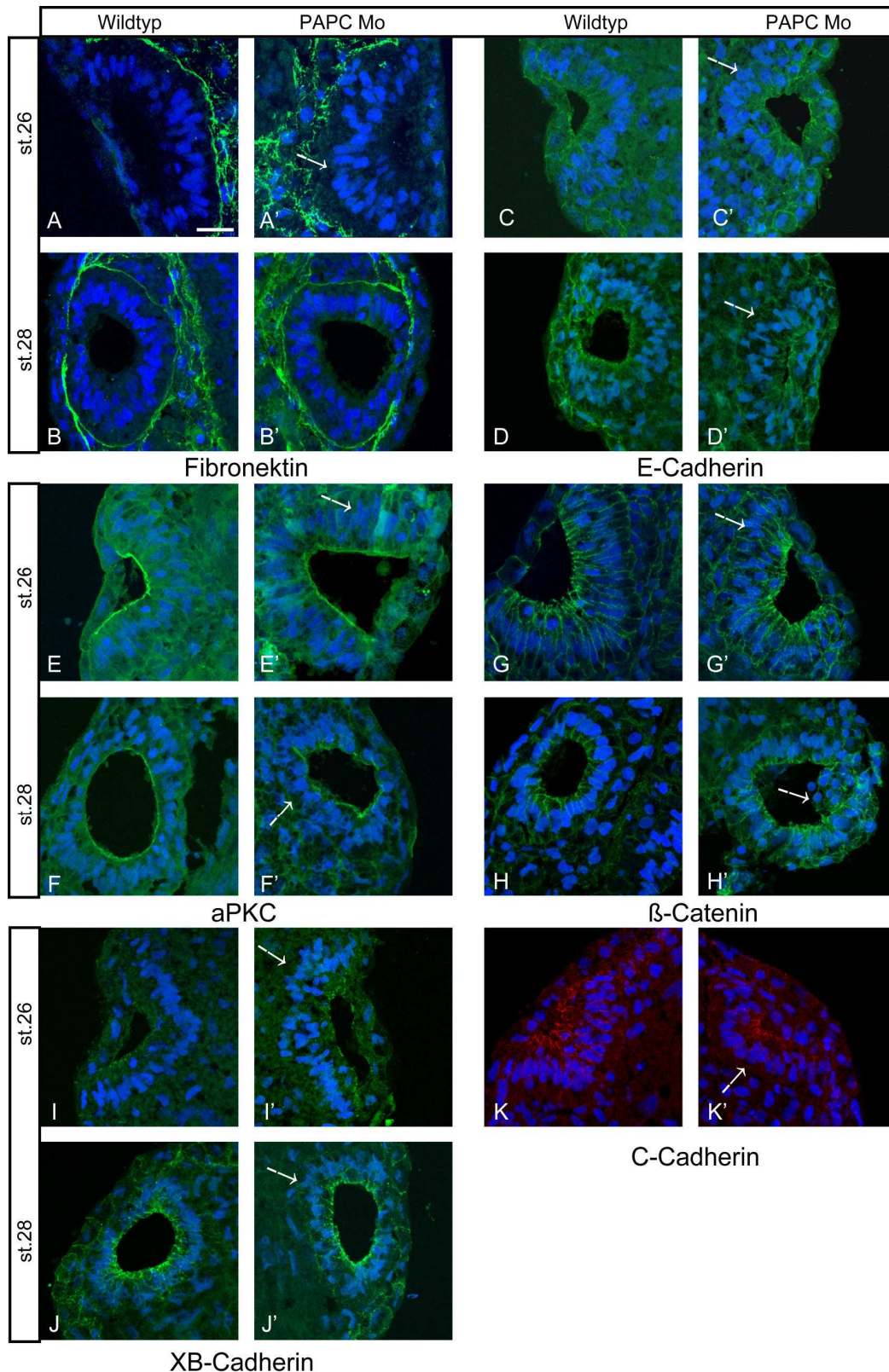


Abb. 5-7: PAPC beeinflusst die korrekte Organisation des Innenohreithels. Die PAPC Morpholinos wurden einseitig in eine Blastomere im Zwei-Zell Stadium injiziert. Die Abbildungen zeigen horizontale Gefrierschnitte der Embryonen im Stadium 26 und 28, Schnittdicke 10 μ m. Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Antikörper sind (A-B') α Fibronectin, (C-D') α E-Cadherin, (E-F') α PKC, (G-H') α β -Catenin, (I-J') α XB-Cadherin und (K, K') α C-Cadherin. Die Pfeile zeigen Kerne, die nicht epithelcharakteristisch lokalisiert sind. Der Maßstab beträgt 20 μ m.

Dabei handelte es sich zum einen um den basalen Marker Fibronectin. Es ist Bestandteil der extrazellulären Matrix und dient als Anker für die basale epitheliale Membran (Desimone et al., 1992). Als apikaler Marker wurde aPKC eingesetzt. Es gehört zu den atypischen Proteinkinasen und ist in die Aufrechterhaltung der apikobasalen Asymmetrie involviert (Karner et al., 2006). Des Weiteren wurden verschiedene Cadherine (C/XB-Cadherin, E-Cadherin) und β -Catenin detektiert. Sie sind apikal-lateral in den *Adherens Junctions* lokalisiert.

Alle getesteten Marker waren dabei vorhanden, es gibt keine massiven Unterschiede in der Proteinexpression, im Fall einer PAPC Depletion. Auffällig waren jedoch die Unregelmäßigkeiten der Epithelstruktur (Abb. 5-7, Pfeile). Dabei waren hauptsächlich die frühen Stadien (Stadium 26) betroffen, bei denen der Invaginationsprozess noch stattfindet. Die Kerne sind dabei häufig nicht parallel zueinander ausgerichtet oder sie befinden sich nicht im basalen Teil der Zellen, wie es für ein Epithel charakteristisch ist. Dabei sind die Effekte hauptsächlich auf die Bereiche konzentriert, in denen PAPC exprimiert wird.

Um diesen Effekt genauer zu untersuchen, wurde zunächst eine Ganzkeim-ISH auf PAPC vorgenommen. So konnten die Embryonen ausgewählt werden, die starke Phänotypen aufwiesen und für eine anschließende Immunfärbung geschnitten werden. Ein weiterer Vorteil war, dass anhand der Ganzkeim-ISH auch die Innenohrregion der injizierten Seite identifiziert werden konnte (Abb. 8 A, C).

In allen untersuchten Embryonen (n=19) zeigten sich starke morphologische Effekte auf das Epithel, wenn PAPC herunterreguliert war (Abb. 5-8 B', C'). In manchen Fällen war annähernd kein Epithel mehr zu erkennen, so dass die Innenohrregion lediglich durch die Ganzkeim-ISH zu identifizieren war (Abb. 5-8, B'). Bei diesen starken Epitheldeformationen, aber auch bei den etwas leichteren epithelialen Unregelmäßigkeiten, kam es zu einem partiellen Verlust (Abb. 5-8 D') der Proteinmarker. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Epithelorganisation durch den Verlust von PAPC betroffen ist.

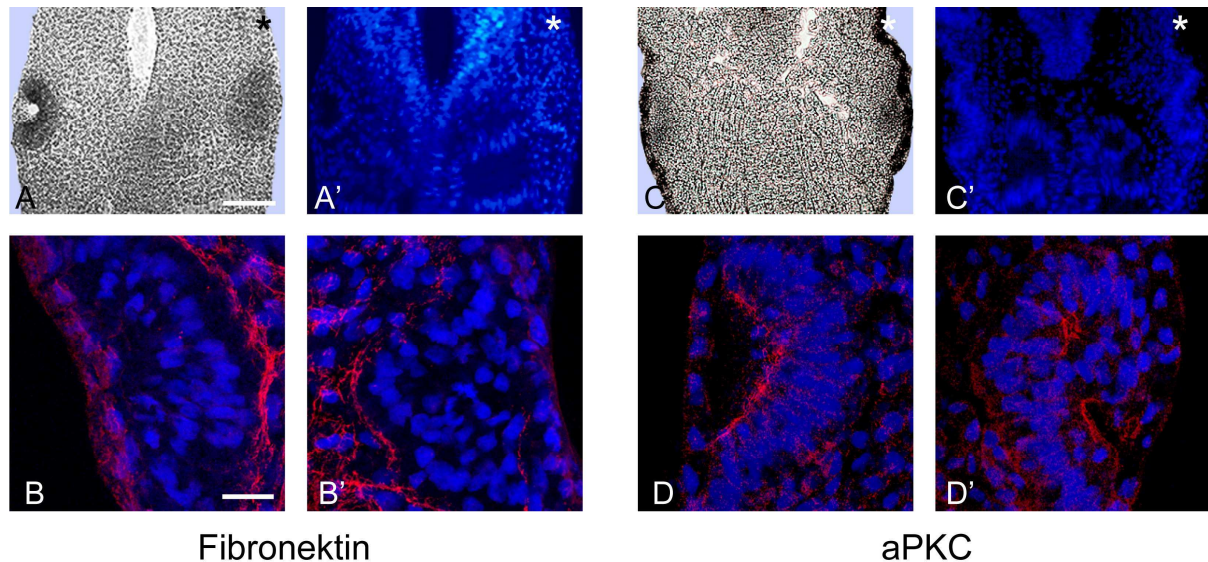


Abb. 5-8: PAPC hat einen Einfluss auf die apikal-basale Epithelorganisation. Die Embryonen wurden einseitig im Zwei-Zell Stadium mit PAPC Morpholino injiziert. Ganzkeim-ISH auf PAPC Transkripte. Horizontale Schnitte wurden angefertigt und immungefärbt. (A, C) Hellfeldaufnahme der PAPC Ganzkeim-ISH, (A', C') Dazugehörige DAPI Aufnahme. (B, B') Embryo aus (A) Immunfärbung mit Fibronektin der (B) uninjizierten und (B') injizierten Seite. Die Epithelorganisation ist kaum noch zu erkennen und die Fibronektinfärbung stark reduziert. (D, D') zeigen den Embryo aus (C). (D) Immunfärbung auf aPKC auf er uninjizierten (D) und der injizierten Seite (D'). Auch hier zeigt sich die Epithelorganisation, sowie die Proteinfärbung sehr unregelmäßig. Sterne zeigen die injizierte Seite, Maßstab in (A, A', C, C') 100 μ m, in (B, B', D, D') 20 μ m.

5.2 Eingrenzung der domänenspezifischen PAPC Funktion während der Innenohrentwicklung

5.2.1 Sowohl die extrazelluläre als auch die intrazelluläre PAPC Domäne ist essentiell für die Innenohrentwicklung

Um Aufschluss über die Funktion und den Signalweg zu erhalten, mit dem PAPC die Epithelorganisation reguliert, wurden verschiedene Rekonstitutionsexperimente durchgeführt.

Zunächst sollte festgestellt werden, ob sich die Funktion von PAPC auf eine seiner Hauptdomänen beschränkt. Dadurch kann eine Aussage getroffen werden, ob sich die Rolle von PAPC während der Ohrentwicklung auf die adhäsiven Eigenschaften, also die extrazelluläre Domäne oder die signalgebenden Eigenschaften, also die cytoplasmatische Domäne einschränken lässt.

Die verschiedenen Teilkonstrukte (Abb. 5-9 A) wurden einseitig mit PAPC Morpholino ko-injiziert. Die Embryonen wurden im Stadium 26 fixiert und mittels Ganzkeim-ISH auf ihre Tbx2 Expression hin untersucht.

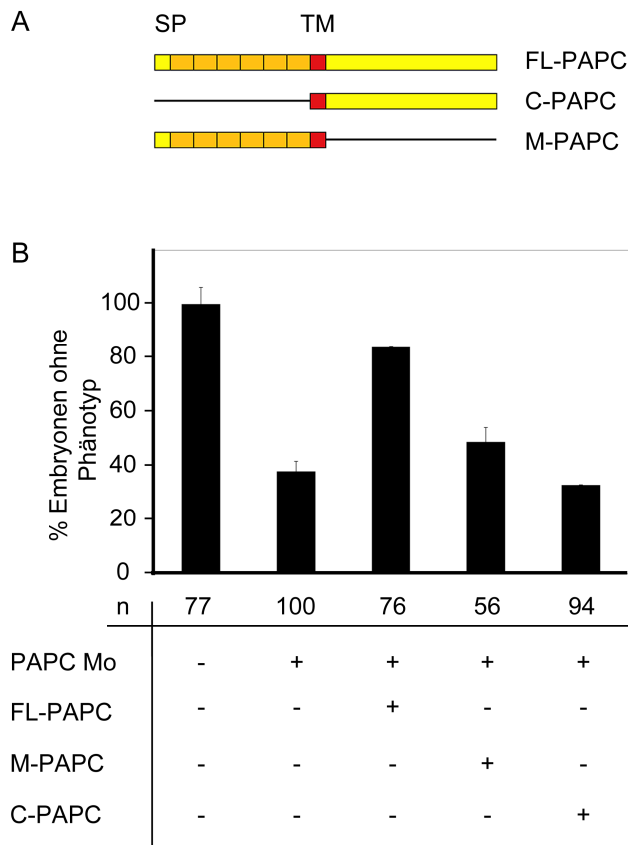


Abb. 5-9: Zur Epithelorganisation benötigt PAPC beide Domänen. Für die Rekonstitutionsexperimente lagen verschiedene Konstrukte vor. (A) zeigt das komplette PAPC Konstrukt (FL-PAPC), mit seinen sechs extrazellulären Cadherinmotiven (orange), einer Transmembrandomäne (TM, rot) und der cytoplasmatischen Domäne (gelb), SP bezeichnet das Signalpeptid. C-PAPC besteht aus der Transmembran- und der cytoplasmatischen Domäne. Das dritte Konstrukt setzt sich aus dem extrazellulären Teil und der Transmembrandomäne zusammen (M-PAPC). Zur Auswertung der Statistik (B) wurden Embryonen einseitig im Zwei-Zell Stadium mit PAPC Morpholino und den verschiedenen Konstrukten ko-injiziert und anschließend im Stadium 26 mittels Ganzkeim-

ISH auf Tbx2 hin untersucht. Gewertet wurden Ohrmorphologie. Normalisiert wurde im Bezug auf Wildtyp-Embryonen. PAPC Morpholino (PAPC Mo), PAPC mRNA (FL-PAPC). Ko-injiziert wurden jeweils 500pg mRNA.

Dann wurde die Morphologie der Otocyste der injizierten Seite mit der der uninjizierten Seite verglichen. Um bereits beim Wildtyp vorhandene Unterschiede auszuschließen, wurde die Statistik im Bezug auf die Wildtyp-Daten normalisiert. Mit keinem der beiden Teilkonstrukte konnte eine Rekonstitution der durch das PAPC Morpholino hervorgerufenen Effekte erzielt werden (Abb. 5-9). Lediglich die Injektion des vollständigen Konstrukts führte zu einer Wiederherstellung der Wildtypsituation. Um eventuelle zusätzliche Auswirkungen der einzelnen Teilkonstrukte ausschließen zu können, werden diese alleine und in hoher Dosierung injiziert.

Abbildung 5-10 zeigt, dass die Injektion von 500pg der Teilkonstrukte im Fall von M-PAPC, der extrazellulären Domäne, nur wenig Einfluss auf die Ohrentwicklung hat, wohingegen es bei der Injektion von 1ng zu massiven Veränderungen kommt. Der Einfluss des Teilkonstrukts ist sogar größer als beim Morpholino selbst.

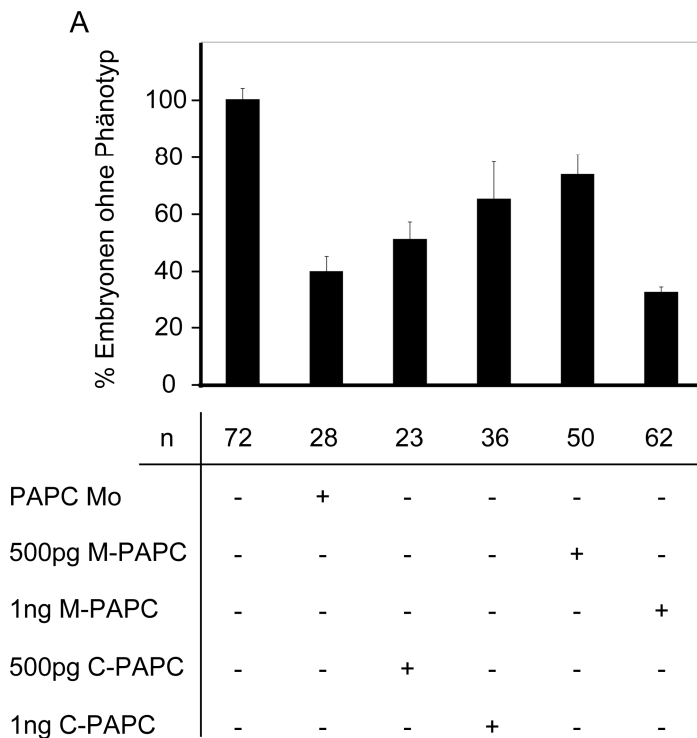


Abb. 5-10: Auswirkungen der Teilkonstrukte auf die Ohrmorphologie. Zur Erstellung der Statistik wurden Embryonen einseitig im Zwei-Zell Stadium mit PAPC Morpholino oder den Konstrukten in verschiedenen Konzentrationen injiziert und anschließend im Stadium 26 mittels Ganzkeim-ISH auf Tbx2 Expression hin untersucht. Gewertet wurden Unterschiede in der Ohrmorphologie. Normalisiert wurde im Bezug auf Wildtyp-Embryonen.

Bei C-PAPC, der cytoplasmatischen Domäne, hat eine hohe Dosierung dagegen weniger Auswirkungen als die niedrigere Injektion von 500pg.

Die Injektion der Teilkonstrukte alleine hat also bereits einen Einfluss auf die Ohrentwicklung, was bei der Interpretation der Ko-Injektionen zur Wiederherstellung der Wildtyp-Situation berücksichtigt werden muss.

5.2.2 PAPC interagiert nicht mit Dishevelled im PCP Signalweg

Von PAPC ist bekannt, dass es über einen, zum konservativen PCP alternativen, Signalweg die planare Zellpolarität beeinflusst. Der konservative PCP Signalweg wird über Dishevelled aktiviert, das dabei in der Lage ist, sowohl den kanonischen, als auch den nicht kanonischen Wnt-Signalweg zu aktivieren. Eine Interaktion von Dishevelled mit PAPC ist bis jetzt weder ausgeschlossen, noch bewiesen. Daher werden Teilkonstrukte von Dishevelled mit PAPC Morpholino einseitig ko-injiziert und zur Auswertung wie in Absatz 5.2.1 verfahren. Dies kann darüber Aufschluss geben, ob die Aktivierung des PCP oder des kanonischen Wnt-Signalwegs eine Rekonstitution des durch PAPC Morpholino hervorgerufenen Effektes herbeiführen kann.

Dishevelled besitzt drei Domänen, von denen bekannt ist, welchen Signalweg sie übermitteln. Die DIX-Domäne aktiviert den kanonischen Signalweg, die DEP-Domäne den nicht kanonischen/PCP Signalweg und die PDZ-Domäne unterstützt die

Aktivierung beider Signalwege (Abb. 5-11 A). Fehlt den Konstrukten eine Domäne, so kann der jeweilige Signalweg nicht aktiviert werden und es kommt zu einer Aktivierung des alternativen Signalwegs.

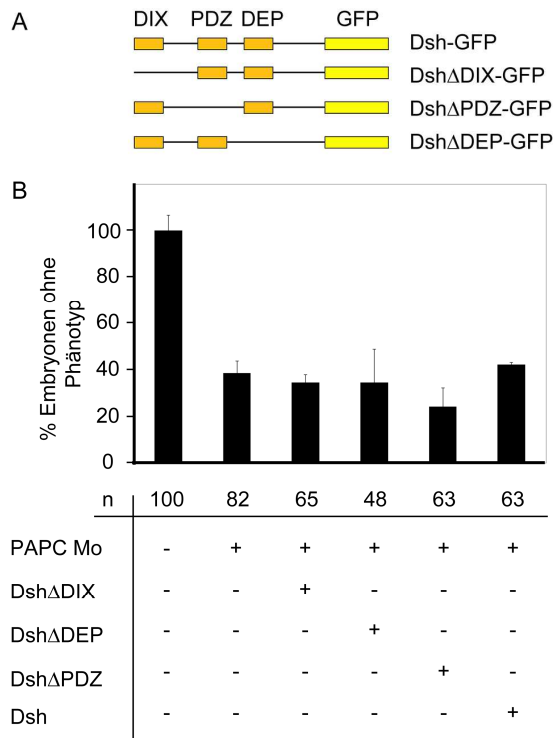


Abb. 5-11: Weder der kanonische noch der nicht-kanonische Signalweg ist in die PAPC-regulierte Epithelorganisation involviert. (A) Zeigt die verschiedenen Konstrukte, die zur Coinjektion eingesetzt wurden. (B) Zur Erstellung der Statistik wurden Embryonen einseitig zweimal im 16-Zell Stadium je in eine ventrale und eine angrenzende dorsale animale Zelle mit PAPC Morpholino und den Konstrukten coinjiziert und anschliessend mittels Ganzkeim-ISH auf ihre Tbx2 Expression hin untersucht. Gewertet wurden Unterschiede in der Ohrmorphologie. Normalisiert wurde im Bezug auf Wildtyp-Embryonen. Injiziert wurden 500pg RNA.

Da sowohl der kanonische, als auch der nicht kanonische Signalweg bereits in der frühen Embryonalentwicklung eine große Rolle spielen, wurde die RNA so spät wie möglich in den Embryo eingebracht. Die Injektion erfolgt im 16-Zell Stadium in je eine von zwei aneinandergrenzenden dorsalen und ventralen Zellen auf der animalen Seite. Keine der Ko-Injektionen zeigte eine Rettung der durch PAPC verursachten Effekte. Es kann also festgehalten werden, dass PAPC im Fall der Ohrentwicklung nicht über Dishevelled im PCP oder im kanonischen Signalweg agiert.

5.2.3 Die Aktivierung von RhoA durch PAPC wird während der Innenohrentwicklung benötigt

Während der Gastrula bindet PAPC an einen Frizzled Rezeptor, um die kleine GTPase RhoA zu aktivieren, und Rac1 zu hemmen. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung von JNK, was im weiteren Verlauf die Zytoskelettstruktur und Zellpolarität beeinflusst. Ist dieser Signalweg auch im Innenohr aktiv, müssten sich die durch PAPC Morpholino hervorgerufenen Effekte durch die Ko-Injektion von caRhoA retten lassen.

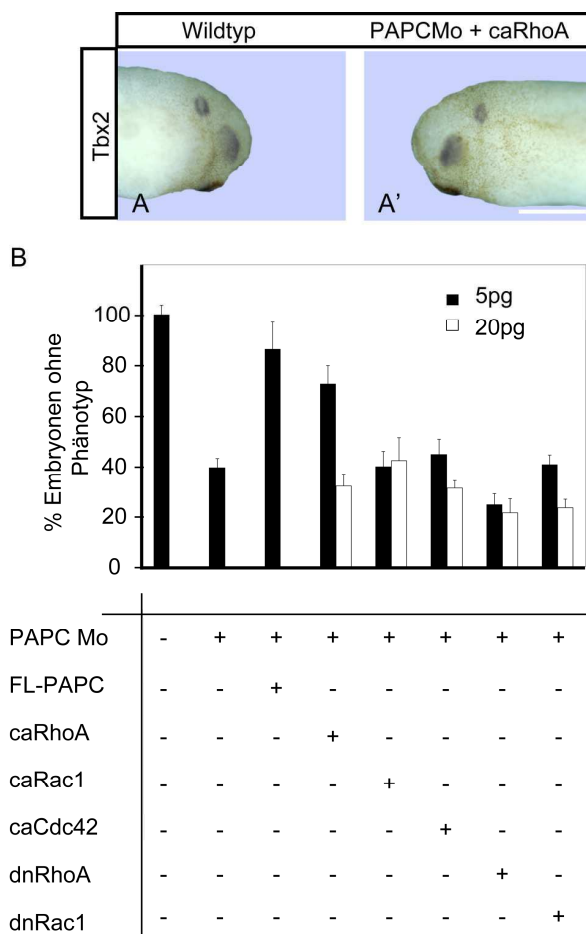


Abb. 5-12: PABC reguliert die Epithelorganisation über RhoA. (A, A') Ganzkeim-ISH mit Tbx2, Stadium 26. Der Phänotyp konnte durch die Ko-Injektion von 5pg RhoA DNA rekonstituiert werden. (B) Zur Erstellung der Statistik wurden Embryonen einseitig zweimal im 16-Zell Stadium je in eine ventrale und eine angrenzende dorsale animale Zelle mit PABC Morpholino und verschiedenen Konzentrationen der Konstrukte ko-injiziert und mittels Ganzkeim-ISH auf ihre Tbx2 Expression hin untersucht. Gewertet wurden Unterschiede in der Ohrmorphologie. Normalisiert wurde im Bezug auf Wildtyp-Embryonen. Die Anzahl der Embryonen von links nach rechts n=199, 176, 35, 111, 94, 99, 56, 53, 66, 109, 74, 93, 81. Zur Rekonstitution wurden 500pg PABC mRNA eingesetzt. Maßstab 500µm.

Da auch kleine GTPasen bereits sehr früh während der Embryonalentwicklung exprimiert werden und viele verschiedene Aufgaben haben, wurden wie in Abschnitt 5.2.2 verschiedene konstitutiv aktive bzw. dominant negative GTPasen in 16-Zell Stadien injiziert, um Sekundäreffekte zu minimieren. Um die Auswirkungen der Konstrukte weiterhin möglichst gering zu halten, wurde nicht mRNA, sondern Plasmid-DNA im pCS2 Vektor injiziert. Die dominant negative Wirkung der GTPasen wird durch den Austausch von Threonin zu Asparagin erzeugt. Dadurch wird zum einen die Affinität zu GTP aufgehoben und zum anderen die Affinität zu GDP reduziert. Sie liegen also entweder nukleotidfrei oder inaktiv, also GDP-gebunden vor. Die konstitutiv aktive Form der GTPasen kann durch den Austausch von Glutamin zu Valin bzw. im Fall von Cdc42 Glutamin durch Leucin erzeugt werden. Dadurch wird der endogene Austausch von GTP zu GDP verhindert, die GTPasen liegen GTP gebunden, also aktiv vor.

Wie in Abbildung 5-12 deutlich wird, ist eine Wiederherstellung der Wildtypsituation lediglich mit 5pg caRhoA möglich. Die Rettung erfolgt dabei in ähnlichem Maß wie

die Rettung mit PAPC mRNA. Die Ko-Injektion mit anderen konstitutiv aktiven GTPasen zeigte keinen Einfluss. Die Ko-Injektion von dominant negativem RhoA verstärkte den durch PAPC Knockdown hervorgerufenen Effekt, wohingegen niedrige Dosen ko-injiziertes dominant negatives Rac1 keinen Effekt auf die Otocyste hat. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass PAPC nicht nur während der Gastrulation, sondern auch während der Innenohrentwicklung über RhoA agiert.

5.2.4 Die Funktion von PAPC kann nicht durch andere klassische Cadherine ersetzt werden

Innerhalb der Familie der Cadherine kommt es häufig zu Redundanzen, wenn ein spezifisches Cadherin in seiner Expression gehemmt wird. Wie in Abbildung 5-7 erkennbar ist, werden im Ohrepithel die klassischen Cadherine E-Cadherin und C/XB-Cadherin exprimiert. Für N-Cadherin liegen keine Daten vor, da keine Antikörper verfügbar sind. Von einigen dieser Cadherine, wie zum Beispiel N- oder C/XB-Cadherin, ist bekannt, dass sie durch PAPC beeinflusst werden können (Yasuda et al., 2007; Gumbiner et al., 2006). Um zu testen, ob der PAPC Verlust durch andere Cadherine kompensierbar ist, wurden die mRNA's dieser klassischen Cadherine mit PAPC Morpholino ko-injiziert und die Otocystenmorphologie mittels Ganzkeim-ISH auf ihre Tbx2 Expression hin untersucht.

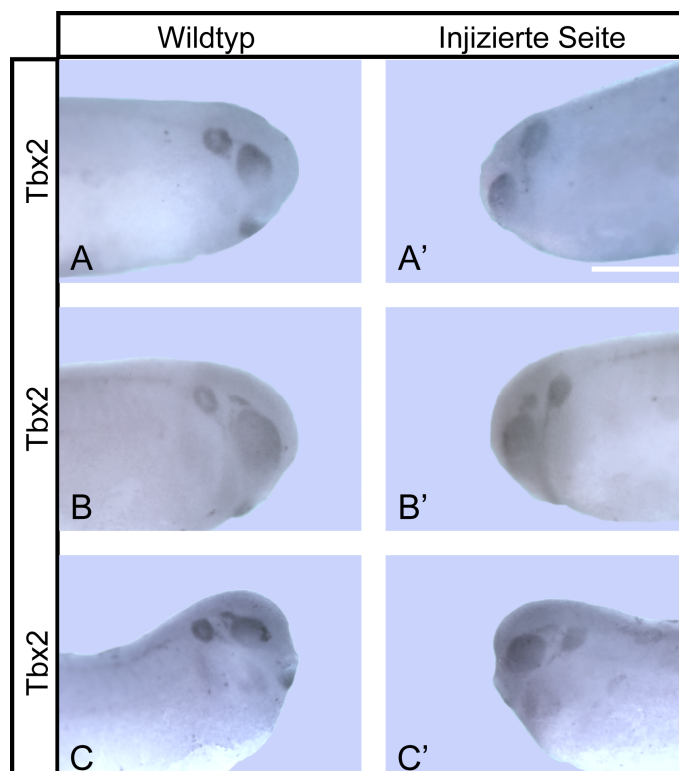


Abb. 5-13: Klassische Cadherine können PAPC nicht ersetzen. (A-C') Ganzkeim-ISH auf Tbx2. Ko-Injektion von (A, A') XB-Cadherin, (B,B') E-Cadherin und (C, C') N-Cadherin. In keinem der Fälle zeigt sich eine Rekonstitution. Maßstab 500µm.

Keines der klassischen Cadherine war in der Lage die Funktion von PAPC zu ersetzen und die Wildtyp-Situation wiederherzustellen (Abb. 5-13; 5-14). Auch die Ko-Injektion der beiden Cadherine (XB- und N-Cadherin) von denen ein Zusammenspiel mit PAPC bekannt ist, zeigte keine Rekonstitution.

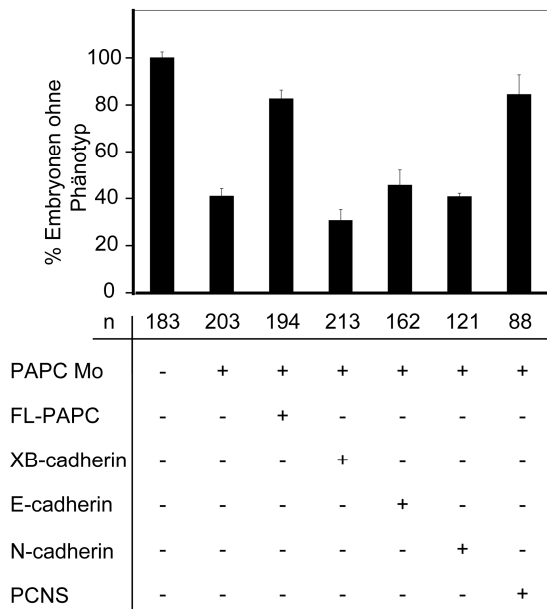


Abb. 5-14: PCNS ist in der Lage die Funktion von PAPC während der Innenohrentwicklung zu ersetzen. Zur Erstellung der Statistik wurden Embryonen einseitig im Zwei-Zell Stadium mit PAPC Morpholino und den verschiedenen Konstrukten injiziert und im Stadium 26 mittels Ganzkeim-ISH auf ihre Tbx2 Expression hin untersucht. Gewertet wurden Unterschiede in der Ohrmorphologie. Normalisiert wurde im Bezug auf Wildtyp-Embryonen. Nur bei Ko-Injektion mit PCNS und PAPC mRNA zeigte sich eine Rekonstitution. Es wurde jeweils 500pg mRNA eingesetzt.

5.2.5 Die Funktion von PAPC kann durch das Protocadherin PCNS ersetzt werden

Bisher sind noch nicht viele Protocadherine bekannt, die während der frühen Ohrentwicklung exprimiert werden. Nach PAPC ist PCNS, *Protocadherin of Neural Crest and Somites*, eines der am frühesten exprimierten Protocadherine. Es wird ab Stadium 29 in der Ohranlage exprimiert (Abb.5-15 A, A'). Sein Expressionsmuster ähnelt dem von PAPC, jedoch sind seine Transkripte zusätzlich im Auge und Neuralleisten zu finden. Zudem weist es sehr große Homologien (bis zu 65% Übereinstimmung mit PAPC DNA) mit PAPC auf (Rangarajan et al., 2006).

Die Ko-Injektion von PCNS mit PAPC Morpholino zeigte eine sehr deutliche Wiederherstellung der durch den PAPC Knockdown ausgelösten Effekte (Abb. 5-14; 5-15).

Das Protocadherin PCNS ist also in der Lage die Funktion von PAPC zu ersetzen, wohingegen klassische Cadherine die gleiche Aufgabe nicht erfüllen können.

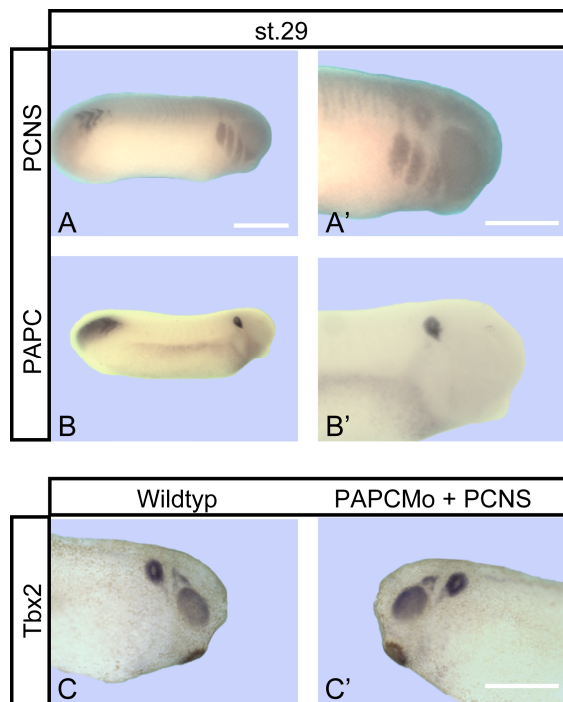


Abb. 5-15: PCNS und P APC zeigen ein ähnliches Expressionsprofil. Ganzkeim-ISH mit (A,A') PCNS, (B, B') P APC und (C,C') Tbx2. Sowohl P APC, als auch PCNS werden im Schwanzorganisor und im Ohrvesikel exprimiert. Transkripte von PCNS finden sich zusätzlich im Auge und den Neuralleisten. (C, C') Die Ko-Injektion von PCNS RNA führt zu einer vollständigen Rekonstitution. Maßstab 500µm.

5.3 Die Rolle von Wnt5a und Ror2 während der Innenohrentwicklung

5.3.1 Wnt5a, Ror2 und Frizzled7 werden in der Ohranlage exprimiert

Die P APC Expression wird während der Gastrula durch Wnt5a und die Rezeptortyrosinkinase Ror2 reguliert, wie bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben (Kapitel 1.4.4). Ein weiterer Rezeptor, der eventuell eine Rolle bei der Signalweiterleitung von P APC spielen könnte, ist Frizzled7.

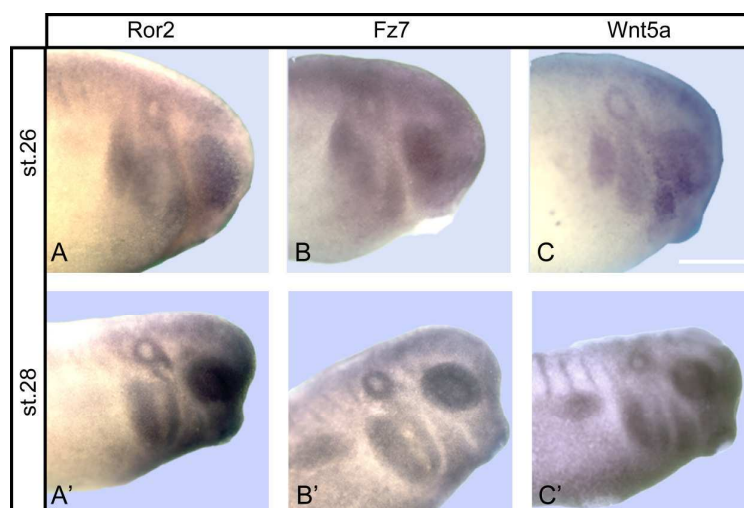


Abb. 5-16: Wnt5a, Ror2 und Fz7 werden im Ohr exprimiert. Ganzkeim-ISH auf verschiedene Stadien mit (A, A') Ror2, (B, B') Fz7 und (C, C') Wnt5a. Maßstab 500µm.

Da diese drei Proteine bereits während der Gastrula einen Einfluss auf P APC haben, stellte sich die Frage, ob sie auch in der frühen Ohrentwicklung auf P APC einwirken. Dies setzt eine Synexpression voraus. Daher wurde eine Ganzkeim-ISH mit Sonden

für Wnt5a, Ror2 und Fz7 durchgeführt. Alle drei Gene werden unter anderem sehr schwach ab Stadium 26 und später stärker, im Ohrepithel exprimiert (Abb.5-16). Es fanden sich außerdem alle drei Transkripte im Auge und in den Neuralleisten. Frizzled7 und Wnt5a werden außerdem zusätzlich im Pronephros exprimiert.

Da Wnt5a, Ror2 und Frizzled7 in der Ohranlage exprimiert werden, ist eine Interaktion mit PAPC während der Ohrentwicklung möglich und wurde im Folgenden untersucht.

5.3.2 Die Expression von PAPC in der Otocyste wird durch Wnt5a und Ror2 reguliert

Um einen Einfluss von Wnt5a oder Ror2 auf die PAPC Expression zu analysieren, wurden einseitig *antisense* Morpholino Oligonukleotide der beiden Proteine injiziert. Die Injektion erfolgte dabei im 16-Zell Stadium in zwei angrenzende ventrale und dorsale Blastomere auf der animalen Seite. Dies war nötig, da es sonst besonders im

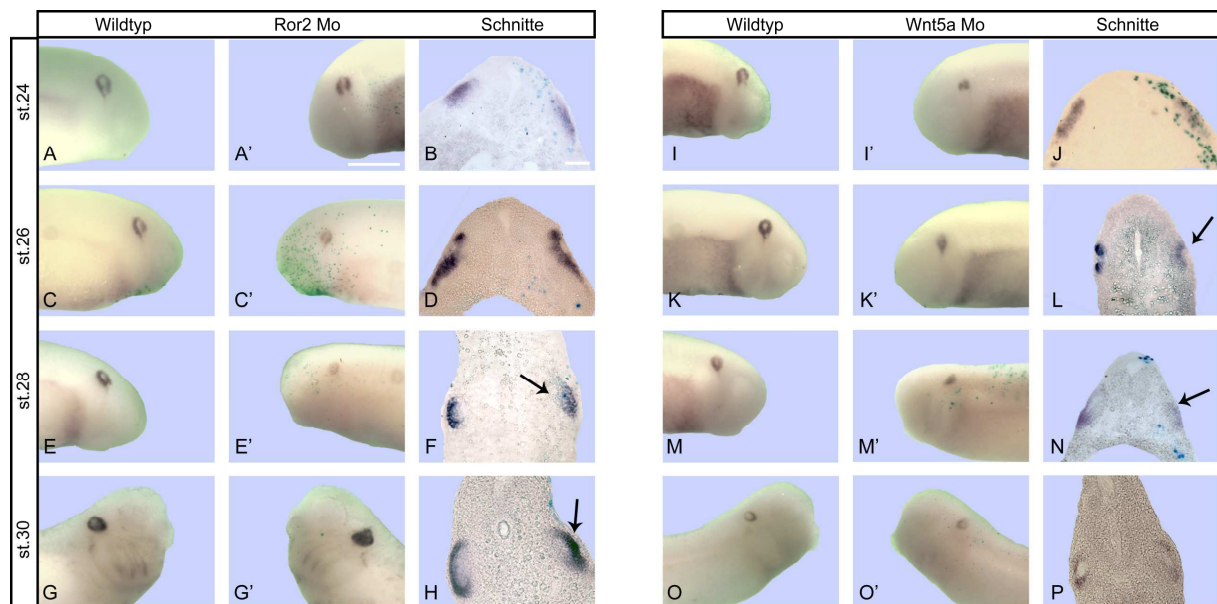


Abb. 5-17: Der Knockdown von Ror2 und Wnt5a führt zur Reduktion der PAPC Expression. Die Embryonen wurden im 16-Zell Stadium in je eine aneinandergrenzende ventrale und dorsale Blastomere im animalen Bereich injiziert, fixiert und mittels Ganzkeim-ISH auf ihre PAPC Expression hin untersucht. (A-H) Ror2 defiziente Embryonen, zeigen eine deutliche Reduktion der PAPC Expression. (I-P) Auch Wnt5a defiziente Embryonen weisen eine Reduktion der PAPC Expression auf. Die Transversalschnitte (B, D, F, H, J, L, N, P) zeigen zudem, dass beide Morpholinos auch einen Einfluss auf die Epithelmorphologie haben (Pfeil). Maßstab Ganzkeim-ISH 500µm. Maßstab Transversalschnitte 100µm.

Fall des Wnt5a Morpholinos, zu starken Gastrulationsdefekten kam, die es zu minimieren galt, um Sekundäreffekte auf die Ohrentwicklung auszuschließen. Eine anschließende Ganzkeimfärbung auf PAPC mRNA zeigte sehr deutlich, dass es bei dem Knockdown der beiden Proteine zu einer erheblichen Reduktion der PAPC Expression kam (Abb. 5-17). Wieder waren besonders die jüngeren Stadien betroffen (Abb. 2 A-F, I-N). Sowohl in den Transversalschnitten als auch bei der Ganzkeimfärbung wird zusätzlich eine Veränderung der Morphologie der Otocyste deutlich. Auch statistisch ist eine Reduktion der PAPC Expression durch die einzelnen Morpholinos zu belegen (Abb. 5-18).

Um eine Rolle von Wnt5a und Ror2 bei der PAPC Expression auch funktionell zu belegen, wurde versucht, die Effekte die durch Depletion von Wnt5a entstehen, durch Ko-Injektion von Ror2 mRNA zu rekonstituieren.

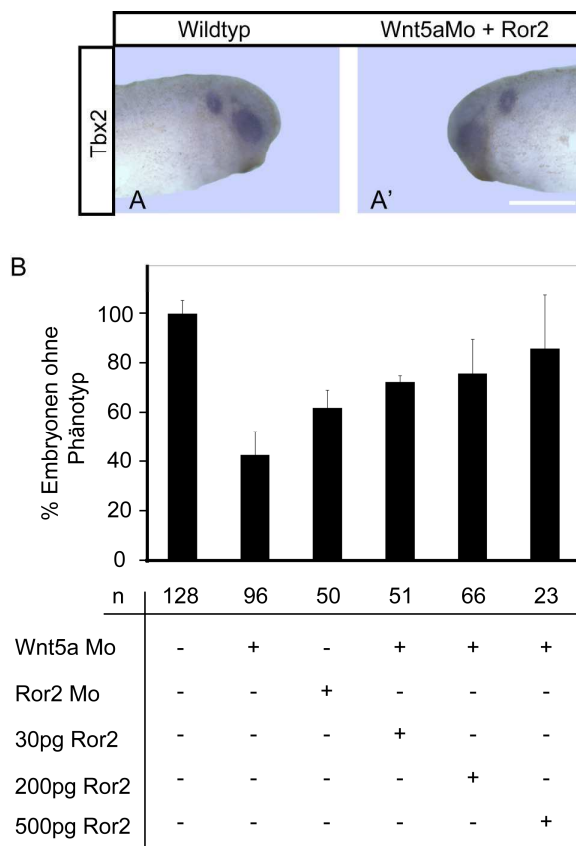


Abb. 5-18: Wnt5a und Ror2 beeinflussen die PAPC Expression. Die Injektionen erfolgten alle im 16-Zell Stadium in je eine aneinandergrenzende ventrale und dorsale Blastomere im animalen Bereich. Die Embryonen wurden im Stadium 26 fixiert und mittels Ganzkeim-ISH auf ihre PAPC Expression hin untersucht. Als Phänotyp gewertet wurde eine Reduktion der PAPC Expression und die Daten wurden im Bezug auf den Wildtyp normalisiert. Ko-injiziert wurden verschiedene Mengen an Ror2 mRNA. Maßstab 500µm.

Mit steigender Ror2 mRNA Menge werden auch die Effekte des Wnt5a Knockdowns ausgeglichen (Abb. 5-18). Es besteht hier also ein direkter Zusammenhang zwischen der PAPC Expression und Wnt5a/Ror2.

Wnt5a und Ror2 regulieren die PAPC Expression nicht nur während der Gastrulation, sondern auch während der Innenohrentwicklung.

5.3.3 Wnt5a/Ror2 spielen keine Rolle bei der Musterung der Otocyste

Um auch für Wnt5a und Ror2 einen Einfluss auf Induktion und Musterung der Otocyste auszuschließen, wurden einseitig mit Morpholino injizierte Embryonen auf die Expression verschiedener Markergene hin mittels Ganzkeim-ISH untersucht. Es zeigte sich kein Unterschied in der Expression der Markergene, die Ohrplakode wird induziert und die Otocyste zeigt eine differentielle Genexpression (Abb.5-19).

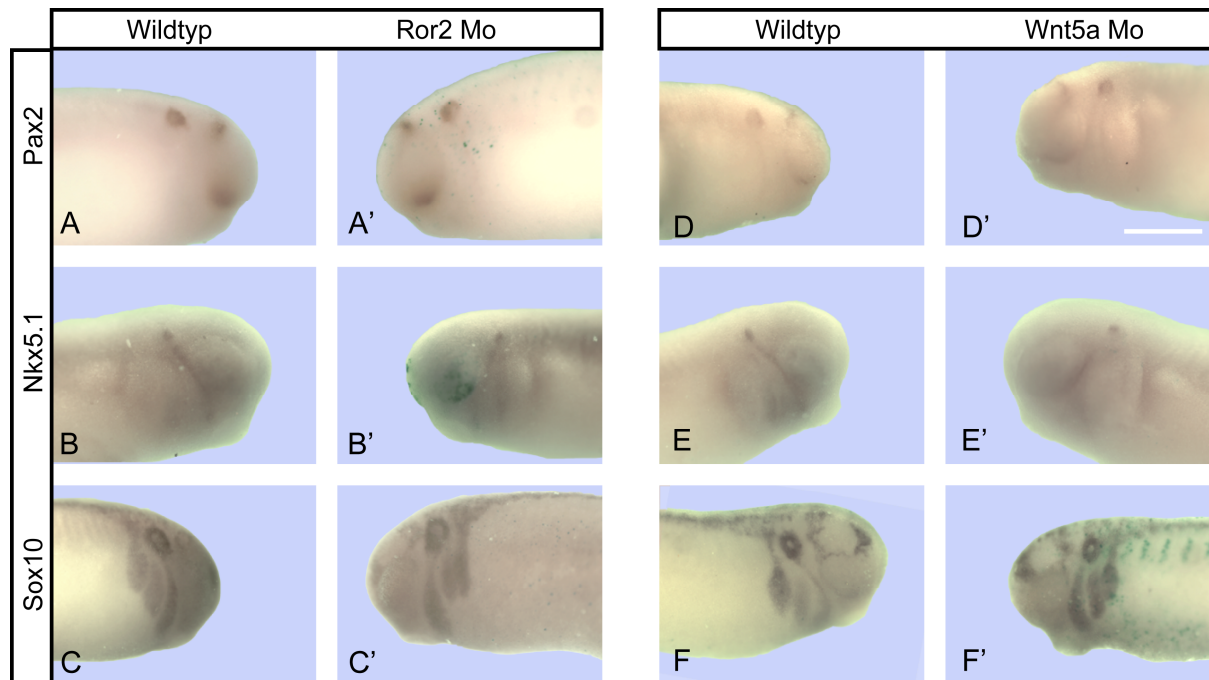


Abb. 5-19: Ror2 und Wnt5a haben keinen Einfluss auf die Induktion und Musterung der Otocyste. Die Embryonen wurden im 16-Zell Stadium in je eine aneinandergrenzende ventrale und dorsale Blastomere im animalen Bereich injiziert und im Stadium 26 fixiert. Die Ganzkeim-ISH erfolgte mit (A, A', D, D') Pax2, (B, B', E, E') Nkx5.1, (C, C', F, F') Sox10. Maßstab 500µm.

5.3.4 LRP6 während der Ohrentwicklung

Ein weiteres Protein, das sowohl im kanonischen, als auch im nicht kanonischen Signalweg agiert und im Innenohr exprimiert wird, ist LRP6 (Tamai et al., 2000; Tahinci et al., 2007). LRP6 interagiert unter anderem mit Wnt5a und inhibiert so den nicht kanonischen Signalweg. Erste Untersuchungen durch einseitige Injektion eines LRP6 Morpholinos im Zwei-Zell Stadium führten zu einem kompletten Verlust der Ohrmarker Tbx2 und PAPC auf der injizierten Seite (Abb. 5-20). Dabei waren 100% der auf Tbx2 Expression hin untersuchten Embryonen (n=23) vom Verlust betroffen. Wie aber in der Abbildung zu erkennen ist, sind die Embryonen durch die Morpholinoinjektion, sowohl auf der injizierten, als auch auf der nicht injizierten Seite

von starken Sekundäreffekten betroffen. In allen Fällen fehlen auf der LRP6 defizienten Seite Augenstrukturen, zudem weisen die Embryonen insgesamt starke Deformierungen auf. Zum größten Teil war davon auch die nicht injizierte Seite betroffen (Abb. 5-20, Pfeil). Auf der nicht injizierten Seite wurde Tbx2 bzw. PAPC immer exprimiert, jedoch war in den meisten Fällen die Ohrmorphologie betroffen (Abb. 5-20 A).

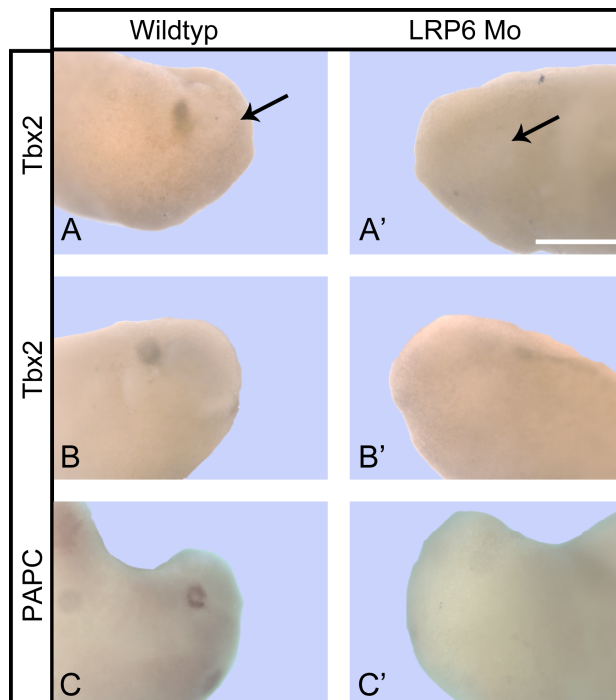


Abb. 5-20: LRP6 Morpholino führt zum Verlust der Ohrmarker Tbx2 und PAPC. Die Embryonen wurden einseitig im Zwei-Zell Stadium mit LRP6 Morpholino injiziert und im Stadium 26 fixiert. Die Ganzkeim-ISH erfolgte mit (A-B') Tbx2 und (C, C') PAPC. Die Embryonen wiesen insgesamt starke Deformationen auf, bis hin zum Verlust bestimmter Strukturen, wie zum Beispiel dem Auge (Pfeil) oder auch der Zementdrüse. Maßstab 500µm.

5.3.5 Die Rolle von Frizzled7 bei der Ohrentwicklung ist noch unklar

Als ein möglicher Kooperator für PAPC wird Frizzled7 diskutiert. Es wird im Ohr epithel exprimiert (siehe Abschnitt 5.3.1), so dass eine Interaktion mit PAPC prinzipiell möglich wäre. Der Knockdown des Proteins mit Hilfe von einseitigen Morpholino Mikroinjektionen zeigte jedoch in der Ganzkeim-ISH weder eine Veränderung der PAPC Expression, noch der Otocystenmorphologie (Abb.6 A-H). Auch eine Überprüfung der Induktion und Musterung der Otocyste durch verschiedene Ohrmarker in einseitig Frizzled7 defizienten Embryonen ließen keine Unterschiede erkennen (Abb.6 I-K).

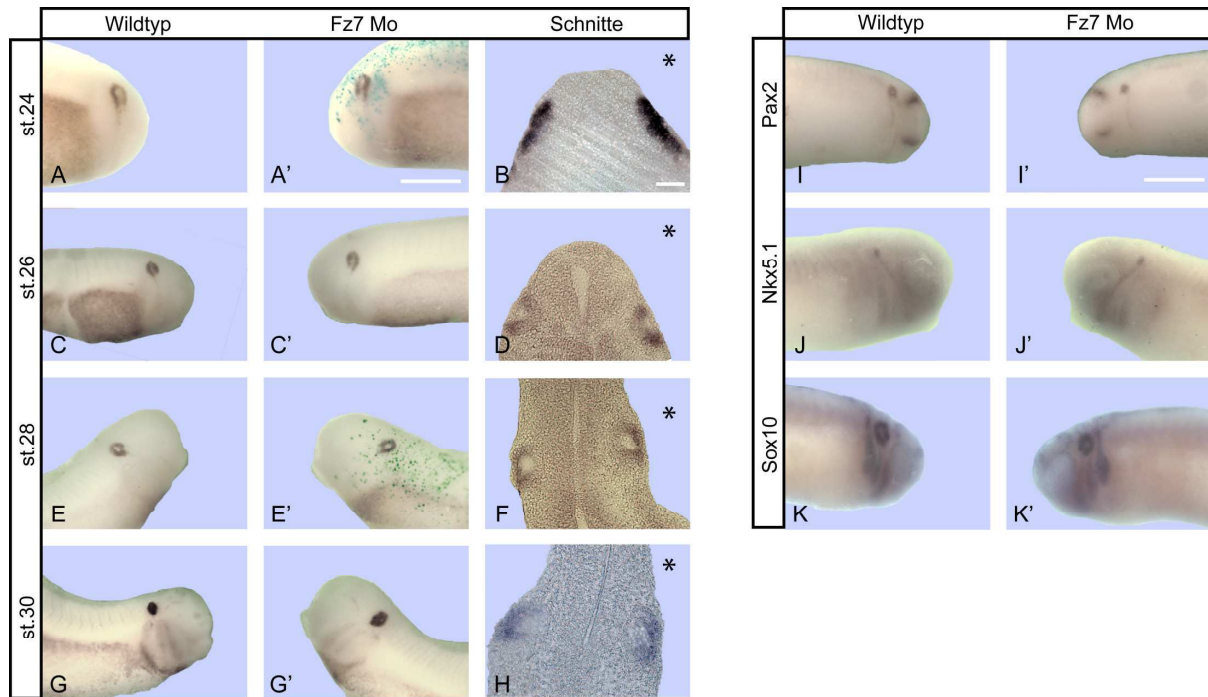


Abb. 5-21: Der Knockdown von Frizzled7 hat keinen Einfluss auf die Otocyste. Die Embryonen wurden alle einseitig im Zwei-Zell Stadium mit Frizzled7 Morpholino injiziert. In (A-H) wurden die Embryonen mit PAPC mittels Ganzkeim-ISH auf PAPC gefärbt und (B, D, F, H) Transversalschnitte angefertigt. Es zeigen sich keine Veränderungen in der PAPC Expression oder der Otocystenmorphologie. Ganzkeim-ISH mit (I, I') Pax2 (J, J') Nkx5.1 (K, K') zeigen keine Veränderungen der Otocystenmarker-Expression. Maßstab A', I' 500µm. Maßstab B 100µm.

5.4 Etablierung des Tiermodells Huhn

5.4.1 chPAPC Expressionsprofil der Otocyste

Bisher sind zwei Vertreter der Familie der Cadherine bekannt, die auch während der späten Ohrentwicklung, genauer der Haarzellbildung, eine wichtige Rolle spielen. PAPC wird während der gesamten Innenohrentwicklung exprimiert, das heißt, eine Funktion während der späteren Entwicklungsprozesse wäre durchaus möglich.

Einer der Nachteile der *antisense* Morpholino Oligonukleotide ist jedoch die Tatsache, dass sich die Konzentration im Laufe der embryonalen Entwicklung durch Zellteilungen und die irreversible Bindung an mRNA verringert, so dass ein erfolgreicher Knockdown des Proteins nur bis zu einem bestimmten Stadium gewährleistet ist. Um dennoch Untersuchungen während der späteren Otocystenstadien durchführen zu können, wird das Huhn als Tiermodell eingeführt. ChPAPC wird, wie bei *Xenopus*, ebenfalls in der Ohranlage exprimiert, hat jedoch auch noch zusätzliche Expressionsorte, zum Beispiel im Zentralen Nervensystem (Daten der Diplomarbeit). Eine der gebräuchlichsten Methoden, die Genexpression

im Huhn zu beeinflussen, ist das Einbringen von miRNA mittels Elektroporation. Damit kann partiell Einfluss auf ein bestimmtes Gewebe genommen werden, in diesem Fall, die Otocyste. Die gesamt chPAPC Expression ist so hoch, dass jedoch eine Hemmung der Translation im Otocystenepithel, auch wenn nur der Kopfbereich einbezogen wird, keine Auswirkungen bei der Messung der RNA mittels RT-PCR zeigen würde. Daher wurden in verschiedenen Stadien lediglich die Otocysten herauspräpariert und zur RT-PCR Analyse eingesetzt (Abb.5-22).

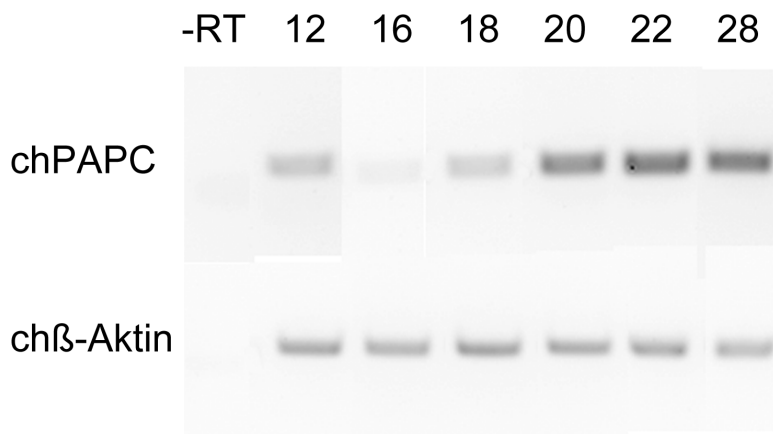


Abb. 5-22: ChPAPC wird in der Otocyste exprimiert. RT-PCR aus Otocystengewebe verschiedener Entwicklungsstadien. Je 20-30 Otocysten wurden freipräpariert und zur RT-PCR eingesetzt.

Die Elektroporation kann erst vorgenommen werden, wenn die Otocyste bereits stark invaginiert ist, da die einzuschleusende DNA in einen Hohlraum injiziert werden sollte, daher wurde mit der Sammlung der Otocysten ab HH12 begonnen. Zu Beginn des Invaginationsprozesses ist die PAPC Expression schwächer, sie steigt jedoch mit fortschreitender Entwicklung des Innenohres stetig an (Abb. 5-22). Besonders verstärkt wird sie ab Stadium 20, wenn sich die Otocyste vollständig geschlossen hat und die Morphogenese beginnt. Die Expression bleibt im weiteren Verlauf, während der Haarzellbildung und Differenzierung relativ konstant (HH 23-30).

5.4.2 Inkulturnahme des isolierten Ohrgewebes

Es ist möglich, die Ohrplakode aus dem Huhn zu präparieren und sie in Kultur zu nehmen, sie ist dabei in der Lage ein vollständiges Innenohr zu bilden (Kondo et al., 2002). Es gibt dabei zwei Arten der Gewebekultur, zum einen kann lediglich die Ohrplakode bzw. die Otocyste entnommen werden, zum anderen kann die Ohrregion zusammen mit Teilen des Rhombenzephalons in Kultur genommen werden. Beide Methoden dienen der Einschränkung eventuell auftretender Redundanzen aus dem umliegenden Gewebe.

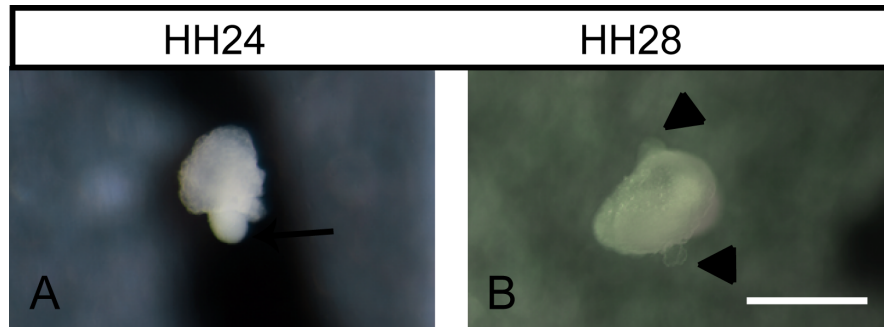


Abb. 5-24: Ohrplakoden lassen sich in Kultur nehmen. Die Ohrplakode wird ab Stadium HH12-13 entnommen und ohne Zugabe von Antibiotika in DMEM mit 4g/l Glucose, Na-Pyruvat und L-Glutamin, sowie 10% FCS kultiviert. Die Plakoden entwickeln sich normal weiter, sind jedoch zum Teil noch von Bindegewebe umgeben, das bei der Entnahme nicht vollständig entfernt werden konnte. (A) Ohrvesikel im Stadium HH24, der Pfeil zeigt die sich verlängernde Lagena. (B) Ohrvesikel Stadium HH28, der Pfeilkopf zeigt die entstehenden Bogengänge. Maßstab 250 μ m.

Die Entnahme erfolgte im Stadium HH12, möglichst rasch und unter möglichst sauberen Verhältnissen, da eine Zugabe von Antibiotika im Medium nicht möglich ist. Die Inkulturnahme, sowohl der Rhombenzephalon-Explantate, als auch der Otocysten alleine war erfolgreich (Abb. 5-24; Abb. 5-25). Bei den Otocystenexplantaten waren morphologische Strukturen, wie die Bogengänge und die Lagena erkennbar (Abb. 5-24, Pfeil). Die Rhombenzephalonexplantate zeigten ebenfalls keine auffälligen Veränderungen der Morphologie (Abb. 5-25).

5.4.3 Etablierung der Manipulation am Embryo und Explantaten

Die Manipulation des Huhns mittels Elektroporation erfordert einen Hohlraum, daher ist die Otocyste hervorragend dafür geeignet. Erste Tests, zur Etablierung der Methode, wurden mit einem GFP-Plasmid im Stadium HH12-13 durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt der otische Becher so weit invaginiert war, dass die injizierte DNA lange genug für eine erfolgreiche Elektroporation darin festgehalten wurde.

Eine erfolgreiche Elektroporation kann so nach 24 Stunden anhand der Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die Elektroporation am ganzen Embryo war in 25% der Fälle erfolgreich (n= 12) (Abb. 5-25 A), in den anderen Fällen wurde das Herz durch den Stromimpuls zum Stillstand gebracht. Dies lässt sich jedoch zukünftig durch eine Isolierung der Elektrodenaußenseiten vermeiden, was den elektrischen Impuls mehr auf die Region der Otocyste einschränkt. Die Transversalschnitte der elektroporierten Embryonen zeigen, dass hauptsächlich das Otocystenepithel die Plasmid-DNA aufgenommen hat (Abb. 5-25 C, C').

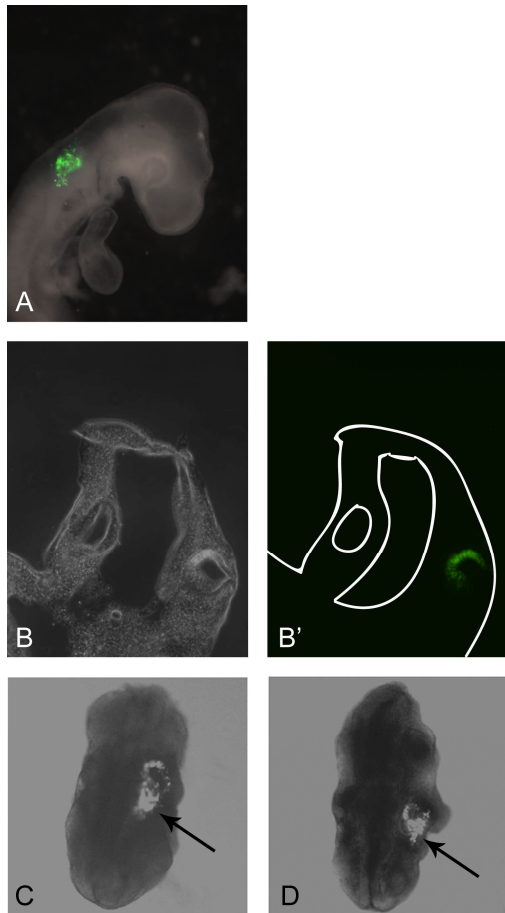


Abb. 5-25: Die Elektroporation an ganzen Embryonen und Rhombenzephalonexplantaten ist erfolgreich. Ganze Embryonen und Rhombenzephalonexplantate werden mit GFP im Stadium HH12-13 elektroporiert. Die Auswertung erfolgte nach 24 Stunden Inkubation. (A) Manipulierte Seite eines Embryos nach 24 Stunden. Die Ohrregion ist GFP-positiv. (B, B') Transversalschnitte des Embryos zeigen die GFP-positive Region im Otocystenepithel. (C, D) Rhombenzephalonexplantate 24 Stunden nach erfolgter Elektroporation mit GFP. Die Otocystenregion ist GFP-positiv, zum Teil wurde zusätzlich ektodermales Gewebe getroffen (Pfeil).

Zusätzlich wurde getestet, ob auch eine Manipulation der Rhombenzephalonexplantate möglich ist. Sofort nach Entnahme der Explantate wurde mit diesen daher genauso verfahren wie mit den ganzen Embryonen. Abbildung 5-25 C und D belegen eine erfolgreiche Elektroporation mit GFP positivem Otocystenepithel. Ein Vorteil der Explantate war dabei, dass das Herz nicht geschädigt werden kann. Dies führte zu einer hohen Überlebens- und Erfolgsrate (83%, n=6).

5.4.4 Klonierung des gesamten chPAPC Konstruktes

Die vollständige chPAPC Sequenz wurde erst 2007 in die Datenbank eingefügt. Es ergaben sich aber bereits zuvor einige Probleme bei der Isolierung der gesamten chPAPC Gensequenz, die 2997bp umfasst. Da sich das Konstrukt nicht komplett aus der gesamt RNA isolieren ließ, wurden überlappende Teilsequenzen kloniert, die nach und nach mittels PCR zusammengefügt werden sollten (Abb. 5-26).

Dabei gelang es Teilkonstrukte zu isolieren, so dass die gesamte Sequenz kloniert werden konnte. Das bereits vorhandene Material reicht aus, um erste miRNA Konstrukte zu erstellen, so dass für einen Beginn der Arbeit am Huhn alle

Komponenten vorhanden sind. Aus Zeitgründen wurde aber auf eine zusätzliche funktionelle Charakterisierung von PAPC während der Ohrentwicklung des Hühnchens verzichtet.

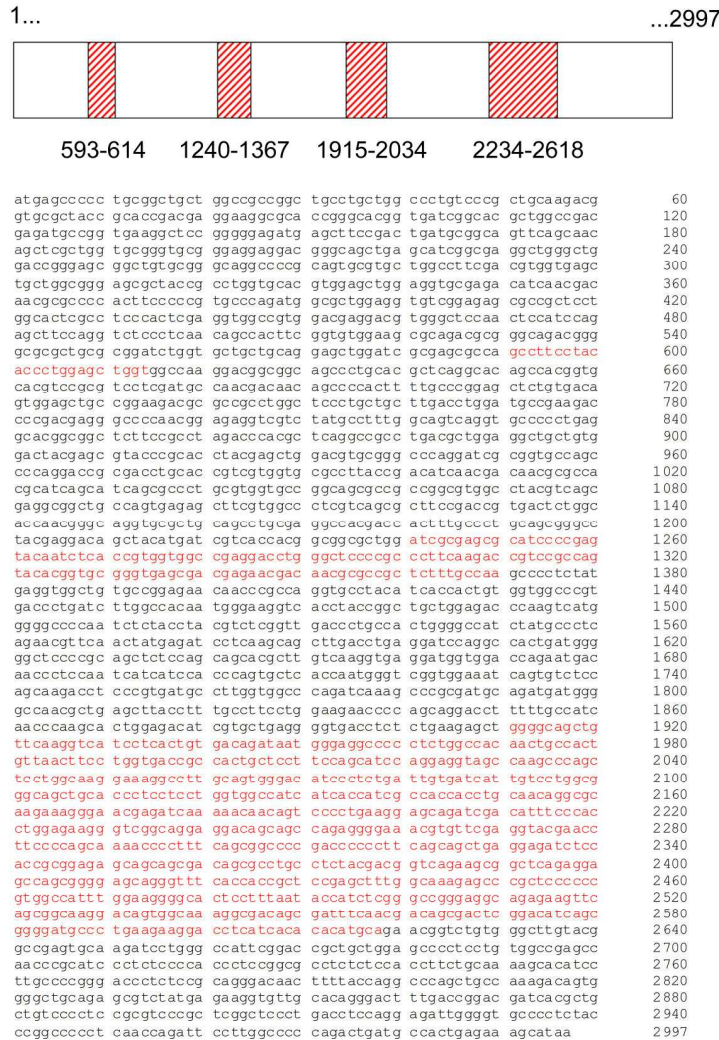


Abb. 5-26: Zusammensetzung der Klone zum kompletten Konstrukt von chPAPC. Bisher wurden 5 Teile des chPAPC in pGEMT Vektor kloniert. Die Konstrukte überlappen sich (rote Abschnitte) und können so falls nötig über PCR zusammengefügt werden.

6 Diskussion

6.1 Die Repression von PAPC führt zu spezifischen morphologischen Defekten

Die PAPC Expression ist mit beginnender Organogenese sehr strikt auf die Ohranlage und den Schwanzorganisator begrenzt. Die folgende Übersichtsabbildung zeigt das in dieser Arbeit detailliert erstellte Expressionsprofil der frühen Innenohrentwicklung. Aufgrund dieser differenzierten Expression kann von PAPC eine mögliche Funktion während der Induktion, Musterung, Innervierung oder Invagination erwartet werden.

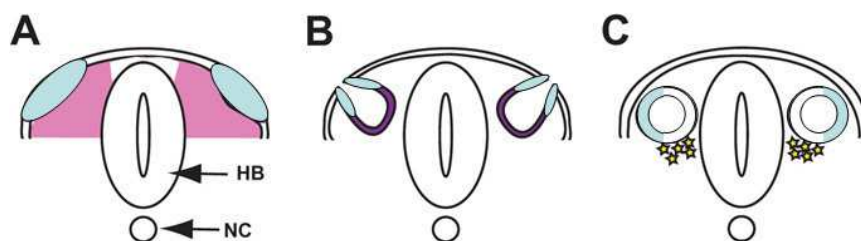


Abb 6-1: Expressionsprofil von PAPC. Transversaler Schnitt durch *Xenopus* auf der Höhe des Rhombomers 5. Die hellblauen Areale zeigen die Lokalisation der PAPC Expression während der frühen Entwicklungsstadien der Ohrentwicklung. (A) Plakode, (B) Invaginationsprozess und (C) Otocystenstadium. HB, Rhombenzephalon; NC, Notochord. [Modifiziert nach Barald und Kelley, 2004]

Aufgrund des frühen Expressionsbeginns wurde zunächst die Plakodeninduktion im Bezug auf PAPC untersucht. Während der frühen Plakodenstadien gibt es kaum plakodenspezifisch exprimierte Gene, die wie PAPC ausschließlich in einer Plakode exprimiert werden. Bisher konnten viele Moleküle nachgewiesen werden, die entweder in allen oder mehreren Plakoden exprimiert werden, wie zum Beispiel Pax2 oder Pax8 (Heller und Brändli, 1999). Welche Ereignisse genau zur Spezifizierung einer bestimmten Plakode führen, ist bisher aber noch unklar. PAPC könnte also der entscheidende Faktor sein, der das otische Schicksal induziert. Erste Hinweise gibt es bereits durch die Injektion von PAPC RNA im Zwei-Zell Stadium. Dies kann, wie bereits für XSmo gezeigt (Köbernick et al., 2003) zu ektopischen Ohren führen, was aber bei PAPC Injektion nicht der Fall war (Hu et al., 2006).

Bei Injektion eines dominant negativen Konstruktes kommt es jedoch zum völligen Verlust der Ohrvesikel, sowie der plakodenspezifischen Marker (Hu et al., 2006). Das dominant negative Konstrukt setzt sich aus der extrazellulären Domäne zusammen, die über die Transmembrandomäne mit der Membran verankert ist. Sie interagiert mit

dem Frizzled Rezeptor, ist dabei aber nicht in der Lage über die cytoplasmatische Domäne Signale weiterzugeben (Kim et al., 1998).

Der in dieser Arbeit mittels *antisense* Morpholino Oligonukleotid Injektion durchgeführte Knockdown von PAPC führte jedoch, im Gegensatz zu dem Knockdown durch dnPAPC (Hu et al., 2006), nicht zu einem vollständigen Verlust der otischen Strukturen. Auch die getesteten Marker Sox10, Nkx5.1, sowie Pax2 zeigten keine Veränderung in ihrer Expression, alle wurden korrekt exprimiert. Lediglich die Morphologie der invaginierenden Plakode war verändert. Diese Veränderungen zeigten sich sehr stark in den frühen Stadien. Die dazugehörigen Schnitte zeigten zudem deutlich eine epitheliale Disorganisation. In späteren Stadien konnten optisch keine Veränderungen mehr festgestellt werden. Dies kann mehrere Gründe haben. Eine Erklärung ist das Nachlassen der Morpholinowirkung. Da die Menge des Morpholinos begrenzt ist, wird es mit steigenden Mitosen und hoher Transkriptionsrate mehr und mehr verdünnt (Eisen und Smith, 2008). Andererseits könnte es zu einem Ausgleich der Defekte durch redundant wirkende Moleküle kommen, deren Expression erst später einsetzt, wie zum Beispiel das Protocadherin PCNS. Es besitzt eine hohe Aminosäureidentität mit PAPC (65%) und wird ab Stadium 29/30 im Ohr exprimiert, was sich zeitlich mit den zurückgehenden Veränderungen deckt (Rangarajan, 2006).

Die Wirksamkeit der beiden PAPC Morpholinos wurde bereits als sehr effizient getestet (Unterseher et al., 2004; Medina et al., 2004), der weichere Phänotyp im Vergleich zum dominant negativen Konstrukt hat also andere Ursachen. Um zusätzlich die Spezifität seiner Wirkung auf das Ohr nachzuweisen, wurde ein Rekonstitutionsexperiment durchgeführt. Steigende Mengen ko-injizierte PAPC RNA war in der Lage den durch das Morpholino hervorgerufenen morphologischen Effekt dosisabhängig zu rekonstituieren. Auch die Injektion eines Kontrollmorpholinos zeigte keinen Phänotyp. Die beobachteten Effekte sind also auf den Verlust von PAPC zurückzuführen. Dominant negative Konstrukte können hingegen oft zusätzliche Effekte auslösen, indem sie mit anderen Effektoren wechselwirken. Da sehr hohe Mengen ektopisch eingebracht werden, ist eine Interaktion mit anderen Molekülen sehr wahrscheinlich. Im Ohr werden unter anderem viele verschiedene Frizzled Rezeptoren exprimiert, wie zum Beispiel Frizzled 3, 6 oder 2, die oft eine hohe Redundanz aufweisen (Wang et al., 2006; Stark et al., 2000). Dadurch wäre es denkbar, dass ein dominant negatives Konstrukt, wenn es in hoher Konzentration

vorliegt, nicht nur mit Frizzled7, sondern auch mit anderen Frizzleds interagiert (Medina et al., 2004, persönliche Mitteilung Herbert Steinbeisser) und diese hemmt oder aktiviert. Da die frühe Ohrentwicklung von Wnt-Signalen abhängt (Ladher et al., 2000) ist der verstärkte Phänotyp durch dnPAPC sicherlich zu großen Anteilen auf Sekundäreffekte zurückzuführen. Dies erklärt auch die Diskrepanz in der Stärke der Phänotypen zwischen dem Einsatz der PAPC Morpholinos (diese Arbeit) und dem Einsatz des dnPAPC Konstrukts (Hu et al., 2006), bei dem es zum Verlust der Ohranlagen und anderer Kopfstrukturen, sowie zum völligen Verlust der Ohrmarker kommt (Hu et al., 2006). Im Fall der PAPC Depletion durch Morpholinos konnten keine Veränderungen der untersuchten Ohrmarker festgestellt werden, was einerseits ein Hinweis darauf ist, dass PAPC keinen entscheidenden Einfluss auf die Musterung der Otocyste hat. Die unveränderte Expression aller Marker ist andererseits auch ein Hinweis auf die erfolgreich abgeschlossene otische Induktion. Obwohl sich die morphologische Struktur ab Stadium 30 wieder normalisiert, zeigten sich bleibende Schäden an den PAPC reprimierten Embryonen. Sie schwimmen im Kreis (Daten der Diplomarbeit). Dies ist ein Hinweis darauf, dass entweder die frühen morphologischen Veränderungen oder das Fehlen von PAPC während der späteren Entwicklungsschritte (wie zum Beispiel Haarzellbildung) essentiell für die Ohrentwicklung sind. Das Fehlen von PAPC hat also vermutlich zumindest einen Einfluss auf das Vestibulärempfinden der Embryonen. Ein ähnliches Verhalten konnte auch bei Mäusen beobachtet werden, die kein *Celsr* exprimieren. Fehlt ihnen dieses Sieben-Transmembran Cadherin, werden die Stereozilienbündel nicht einheitlich ausgerichtet, da der PCP Signalweg gestört ist. Die Mäuse drehen sich um ihre eigene Achse oder zeigen ein anhaltendes Kopfschütteln und sie sind taub (Curtin et al., 2003). Vestibuläre Schaden können also ein solches Verhalten auslösen. Ein bei *Xenopus* leicht von außen einsehbares Merkmal der vestibulären Cristae in den Bogengängen sind die den Haarzellen aufliegenden Otolithen. Sie entstehen vermutlich durch Sekretion bestimmter Matrixproteine, die die Kalzifizierung einleiten (Ross et al., 1984; Wang et al., 1998). Eine Störung der Otolithensynthese würde zu den beobachteten Effekten führen, konnte jedoch bei PAPC Defizienz nicht festgestellt werden. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Curtin et al. (2003), deren *Celsr*^{-/-} Mäuse ebenfalls keine Defekte in der Morphologie der Bogengänge aufweisen.

Aus der otischen Plakode geht unter anderem auch die Innervierung des Innenohrs hervor. PACP Transkripte konnten in den delaminierenden Neuroblasten detektiert werden, die sich später zum statoakustischen Ganglion differenzieren. Eine mangelnde oder defekte Innervierung könnte ebenfalls zu starken Phänotypen führen, wie es bereits für Cadherin 2 (N-Cadherin Homolog) im Zebrafisch gezeigt werden konnte (Babb-Clendenon et al., 2006). Die Differenzierung und Bildung des statoakustischen Ganglions war in PACP defizienten Embryonen jedoch nicht beeinträchtigt.

In beiden Fällen, sowohl bei der *Celsr*^{-/-} Maus, als auch bei den Cadherin 2 reprimierten Zebrafischen konnte eine Störung der Haarzellorientierung gezeigt werden (Curtin et al., 2003; Babb-Clendenon et al., 2006). Auch Cadherin 23 und Protocadherin 15 defiziente Mäuse zeigen zu Beginn der Entwicklung eine Desorientierung der Stereozilien (Shin und Gillespie, 2005; Di Palma et al., 2001; Alagramam et al., 2001). Eine Untersuchung der Haarzellen von *Xenopus* wurde nicht durchgeführt, da die dauerhafte Wirksamkeit der Morpholinos bis zu diesen späten Entwicklungszeitpunkten nicht gesichert ist. Daher wurde das Huhn als weiterer Modellorganismus für Untersuchungen der Haarzellbildung eingeführt (siehe Kapitel 6.7).

6.2 PACP wird für die Ausbildung und Beibehaltung der Epithelstruktur benötigt

In früheren Studien ist PACP während der konvergenten Extensionsbewegungen hauptsächlich in den lateralen und medialen Zellmembranen zu finden, wo es akkumuliert. Die Zellen werden polarisiert, bekommen eine bipolare Form (Unterseher et al., 2004; Chung et al., 2007). Wie bei *Drosophila* beobachtet werden konnte, muss der Errichtung der planaren Zellpolarität immer die apikal-basale Polarität vorausgehen. Die Zelle muss sich zunächst zweidimensional polarisieren, um dann innerhalb der Ebene angeordnet zu werden (Djiane et al., 2005). So führt der Verlust von aPKC, ein wichtiger Faktor zur Errichtung der apikal-basalen Polarität, auch zu Defekten der planaren Zellpolarität. Da vom PCP Signalweg bisher angenommen wird, dass erst ab Stadium 31 im Ohr aktiv wird, wurde eine mögliche Funktion von PACP zunächst bei der Aufrechterhaltung/Errichtung der apikal-basalen Polarität untersucht.

Es zeigte sich, dass der Verlust von PAPC zunächst kaum einen Einfluss auf die direkte apikal-basale Polarität zu besitzen schien. Alle getesteten Marker, wie zum Beispiel aPKC oder Fibronectin waren vorhanden. Lediglich anhand der Zellkerne konnte eine leichte fehlerhafte Anordnung der Epithelzellen beobachtet werden. Die Zellen waren polarisiert, allerdings zeigten sie nicht die regelmässige säulenartige Anordnung eines typischen einschichtigen Epithels, in dem alle Kerne basal auf gleicher Höhe positioniert sind. In stark veränderten Ohranlagen waren die Epithelien derart disorganisiert, dass die Otocyste nur anhand der ISH-Ganzkeimfärbung zu identifizieren war. In diesen starken Fällen waren auch die apikal-basalen Marker betroffen. Sie wurden nur noch in Regionen exprimiert, die partiell Epithelstrukturen aufwiesen. Trotzdem wurden in allen Fällen immer noch die Otocysten-Markergene, wie zum Beispiel *Tbx2* exprimiert. PAPC scheint also während der frühen Ohrentwicklung die Bildung und Aufrechterhaltung, sowie die Polarität des Epithels zu regulieren.

Da PAPC in der Lage ist kleine GTPasen zu beeinflussen, wäre es möglich, dass es durch deren Aktivierung oder Inhibition zu Veränderungen des Zytoskeletts kommt. Gerade Mutationen der Rho GTPasen können zu Veränderungen des Zytoskeletts und zum Abbau der interzellulären Verbindungen führen. Besonders betroffen davon sind *Tight junctions* und *Adherens junctions*, die apikal lokalisiert sind (Abe und Takeichi, 2008). Der Abbau dieser Strukturen durch mangelnde Rho Aktivierung könnte den Verlust der *Adherens* und *Tight junctions* und somit den Verlust der apikal-basalen Polarität und die epithelialen Disorganisation erklären.

Da sich die Zellen aber immer noch in der otischen Region befinden, sind sie für Signalmolekülkombinationen, die ihr späteres Schicksal festlegen weiterhin empfänglich. Die Musterung kann trotzdem erfolgen, was die Aufrechterhaltung der Markergen-Expression erklärt.

6.3 PAPC Signale benötigen extrazelluläre und cytoplasmatische Domäne

Bis vor kurzem wurde angenommen, dass PAPC hauptsächlich ein Adhäsionsmolekül ist, das zusätzliche Signalfunktionen hat (Kim et al., 1998; Unterseher et al., 2004). Es zeigte sich jedoch, dass die Adhäsionseigenschaften von PAPC selbst äußerst gering sind. Es reguliert die Adhäsion indirekt, indem es über seine extrazelluläre Domäne mit C-Cadherin interagiert und dessen

Adhäsionsfähigkeit inhibiert (Chen und Gumbiner, 2006). C-Cadherin wird im otischen Epithel apikal in den Interzellulärverbindungen exprimiert.

Aufgrund dessen wurden Rekonstitutionsexperimente mit Konstrukten durchgeführt, die entweder aus der cytoplasmatischen signalvermittelnden Domäne (CPAPC) oder der Adhäsion beeinflussenden extrazellulären Domäne (MPAPC) bestehen. In keinem der beiden Fälle konnte eine Wiederherstellung der PAPC Funktion im Ohr erfolgen, im Fall der Ko-Injektion von MPAPC kam es sogar zu einer leichten Verstärkung des Effektes. Sowohl MPAPC, als auch FL-PAPC sind in der Lage die Adhäsionsfähigkeit von C-Cadherin herabzusetzen (Chen und Gumbiner, 2006). Dementsprechend müsste MPAPC in der Lage sein die Funktion von PAPC im Bezug auf die Zell-Zell-Adhäsion des C-Cadherins zu ersetzen, was nicht der Fall ist. Das spricht gegen eine Modulation der Zell-Zell-Adhäsion durch PAPC während der Innenohrentwicklung.

Bei den Einzelinjektionen der Konstrukte zeigte sich, dass schon niedrige Dosen des cytoplasmatischen Konstruktes einen ähnlichen Effekt aufwiesen wie PAPC Morpholino Injektion alleine, wohingegen sehr viel höhere Dosen MPAPC nötig waren, um einen ähnlichen Effekt zu erzeugen. Dieser war dann jedoch wesentlich stärker, als Injektion des Morpholinos alleine. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Hu et al., (2006), die die Selben und höhere Dosen des extrazellulären Konstruktes eingesetzt haben, um die PAPC Funktion zu inhibieren. Die verstärkten Effekte sind zum einen auf eine dominant negative Funktion des Konstruktes zurückzuführen, andererseits aber wahrscheinlich auch auf Interaktionen zwischen anderen Faktoren, wie Wnt-Rezeptoren oder C-Cadherin (siehe Kapitel 6.1).

Auch das cytoplasmatische Konstrukt alleine zeigt deutliche Effekte, daher muss es in irgendeiner Art die Ohrentwicklung beeinflussen. Möglicherweise wirkt es ebenfalls dominant negativ, indem der cytoplasmatische Teil die endogenen Adaptorproteine abfängt und die Signalwirkung des endogenen PAPCs blockiert. Bisher sind zwei intrazelluläre Adaptorproteine bekannt, ANR5 und Sprouty1 (Chung et al., 2007; Wang et al., 2008). Sprouty1 inhibiert den PCP Signalweg und wirkt antagonistisch zur PAPC Funktion, wohingegen ANR5 die JNK Aktivierung durch PAPC über RhoA verstärkt. ANR5 ist essentiell für die vollständige Aktivierung von RhoA über PAPC. Die ANR5 Expression wird durch Fgfs reguliert, die eine wichtige Rolle bei der Innenohrentwicklung spielen (Chung et al., 2007; Barald und Kelley, 2004). Werden diese Adaptoren, insbesondere ANR5, durch das CPAPC Konstrukt abgefangen,

könnte dies zu einer fehlerhaften Modulierung der PAPC Signalkaskade führen, so dass diese inhibiert wird. Das würde voraussetzen, dass die extrazelluläre Domäne zur Signalweiterleitung benötigt wird. Dafür sprechen auch die Resultate der Ko-Injektionen, da nur das vollständige Konstrukt in der Lage war, die durch den PAPC Verlust bedingten Otocysten-Defekte zu rekonstituieren.

6.4 PAPC Signale in der Innenohrentwicklung werden unabhängig von Dishevelled über RhoA vermittelt

Lrp6 ist ein Frizzled Ko-Faktor, von dem bis vor kurzem angenommen wurde, dass er lediglich im kanonischen Signalweg mitwirkt (Tamai et al., 2000). Tatsächlich spielt er aber auch bei der Übermittlung des PCP Signalwegs eine Rolle (Tahinci et al., 2007). Wird die Gentranslation durch ein spezifisches LRP6 Morpholino gehemmt, kommt es tatsächlich zum völligen Verlust otischer Strukturen und der otischen Marker Tbx2 und PAPC. Da Lrp6 aber bereits während der Gastrulation die zwei entscheidenden Signalwege reguliert, sind Sekundäreffekte bei dessen Hemmung nicht auszuschließen. Tatsächlich weisen die injizierten Embryonen erhebliche morphologische Defekte auf, wie zum Beispiel das Fehlen von Augenstrukturen. Dabei ist zum größten Teil sogar die nicht injizierte Seite mit betroffen. Da es Hinweise auf die Notwendigkeit, sowohl des kanonischen, als auch des PCP Signalwegs in der Innenohrentwicklung von Mäusen gibt (Karner et al., 2006a; Karner et al., 2006b), wurden weitere Komponenten dieser Signalwege, mit denen PAPC direkt oder indirekt interagieren kann, nämlich der Wnt-Rezeptor Frizzled7 (Wang et al., 2008; Stark et al., 1999) und das Adaptorprotein Dishevelled im Hinblick auf ihre Rekonstitutionsfähigkeit getestet. Zunächst konnte gezeigt werden, dass Frizzled7 in der Otocyste exprimiert wird, eine potentielle Interaktion ist also möglich. Frühere Studien zeigen, dass ein Knockdown von Frizzled7 den PAPC Morpholino Phänotyp imitiert (Unterseher et al., 2004). Der Knockdown von Frizzled7 im Innenohr führt jedoch zu keinerlei Veränderungen, weder in der Expressionsstärke von PAPC, noch in der Otocystenmorphologie oder der Expression der Induktions- und Musterungsmarker. Dies lässt mehrere Interpretationen zu. Einerseits könnte während der Innenohrentwicklung die Signalweiterleitung von PAPC nicht über Frizzled7 laufen. Da Frizzled7 Präferenzen für bestimmte Wnts besitzt, wäre es denkbar, dass hier ein anderes Wnt-Signal und damit auch ein anderes Frizzled benötigt wird (Medina und Steinbeisser, 2000; Yamanaka und Nishida, 2007).

Andererseits sind unterschiedliche Frizzleds im Innenohr exprimiert, die unter Umständen redundant wirken können. Eine Redundanz von Frizzled3 und Frizzled6 wird zum Beispiel während der Innenohrentwicklung der Maus beobachtet (Wang et al., 2006).

Dishevelled ist das Adaptormolekül, welches die Signale der Wnts über seine drei Domänen verschieden weiterleiten kann, einerseits als PCP oder andererseits als kanonisches Wnt-Signal (Nelson und Nusse, 2004). Eine Interaktion von P APC mit Dishevelled konnte im Hefe Zwei-Hybrid Ansatz nicht nachgewiesen werden (Wang et al., 2008), jedoch lassen Daten einer Ko-Immunopräzipitation Zweifel offen (Arbeitsgruppe Wedlich, unveröffentlichte Daten). Rekonstitutionsexperimente mit Dishevelled und den Teilkonstrukten von Dishevelled, die entweder den kanonischen oder den PCP Signalweg aktivieren zeigen keinen Effekt. Bei keinem der mit P APC Morpholino ko-injizierten Deletionskonstrukte kommt es zu einer Rekonstitution der Wildtyp-Situation in der Otocyste. Dies lässt zum einen schließen, dass der kanonische Signalweg keine Rolle bei der Innenohrentwicklung im Zusammenhang mit P APC spielt. Zum anderen zeigt es, dass P APC und Dishevelled nicht miteinander interagieren, also unabhängig voneinander Signale vermitteln.

Obwohl sich der Signalweg von P APC und der PCP Signalweg Effektoren teilen, bestehen bezüglich der Signalweiterleitung über die kleinen GTPasen besondere Unterschiede. Die Aktivierung des P APC Signalweges führt in der Gastrula zur Aktivierung von RhoA und zur Inhibierung von Rac1, wohingegen beim Dishevelled vermittelten PCP Signalweg die Aktivierung beider GTPasen, RhoA und Rac1 erforderlich ist (Unterseher et al., 2004; Habas et al., 2003). Die Rekonstitution der durch den Knockdown von P APC hervorgerufenen Effekte durch caRhoA, aber nicht durch caRac1 spricht zusätzlich für eine ausschließlich durch P APC vermittelte Signalwirkung, da Dishevelled vermittelte PCP Signale eine Rac1 Aktivierung erfordern würden (Habas et al., 2003). Wie bereits für die Gastrula gezeigt werden konnte (Unterseher et al., 2004), hat co-injiziertes dnRac1 auch während der Innenohrentwicklung keinen Einfluss auf die durch P APC Knockdown hervorgerufenen Effekte. Die Epithelorganisation ist also nur von RhoA, nicht von Rac1 abhängig. Auch die Injektion von Cdc42, welches ebenfalls eine Rolle bei der Zytoskelettorganisation spielt (Takai et al., 2001), führte zu keiner Rekonstitution, was die Spezifität der RhoA Funktion in diesem Kontext unterstreicht. Dies belegt, dass auch während der Innenohrentwicklung die P APC Signalkaskade benötigt wird,

da die Aktivierung der downstream Komponente RhoA ausreichend ist, um die Funktion von PAPC zu ersetzen.

6.5 PCNS und PAPC haben eine phylogenetische und funktionelle Beziehung

Die Aufrechterhaltung der Epithelorganisation hängt unter anderem von der Cadherin Expression ab. Für Cadherin 6 konnte zum Beispiel eine Rolle für die korrekte Entwicklung und Organisation des Neuroepitheliums nachgewiesen werden. Wird seine Translation mittels Morpholino reprimiert, kommt es zu Defekten in der Epithelorganisation (Ruan et al., 2006). Ein ähnlicher Effekt zeigt sich auch bei der Bildung der Retina-Epithelien des Auges bei den Zebrafisch Mutanten für N-Cadherin, *glass onion* und *parachute* (Erdmann et al., 2003; Malicki et al., 2003). Die hier durchgeführten Rekonstitutionsexperimente mit verschiedenen klassischen Cadherinen, die alle im Ohr exprimiert werden, zeigten jedoch, dass sie die PAPC Funktion nicht ersetzen können.

Lediglich die Ko-Injektion des Protocadherin PCNS, das ab Stadium 29/30 unter anderem im Innenohr exprimiert wird (Rangarajan et al., 2006), führte zu einer Rekonstitution der durch PAPC Morpholino hervorgerufenen Effekte. Über die Funktion dieses Protocadherins ist bisher wenig bekannt, da PCNS erst ab Stadium 30 exprimiert wird, wäre eine mögliche Rolle während der Haarzellbildung zu vermuten, die zu diesem Zeitpunkt einsetzt. Es hat 65% Aminosäureidentität mit PAPC und beide besitzen die konservierte 25 Aminosäuren große Region im cytoplasmatischen Bereich, die bei vielen Protocadherinen gefunden wurde (Rangarajan et al., 2006; Chen et al., 2007). Die Überexpression von PCNS führt zu Gastrulationsdefekten, die Repression der PCNS Translation nur zu Defekten der Neuralleisten. Ein Ohrphänotyp wurde nicht berichtet. Ihre hohe Ähnlichkeit und die Überlappung der Expressionsorte in Somiten und später im Ohr, lässt eine phylogenetische und funktionelle Beziehung zwischen den beiden vermuten (Rangarajan et al., 2006). Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen diese These, da PCNS die PAPC Funktion im Ohr fast vollständig ersetzen konnte. Da Adhäsion dabei nur zu einem geringen Teil eine Rolle zu spielen scheint, müssen die Parallelen hauptsächlich zwischen dem Signalweg liegen, was wiederum ein guter Anhaltspunkt für weitere funktionelle Studien an PCNS und PAPC ist.

6.6 Expressionsregulation von PAPC im Innenohr

Im Stadium der Gastrula konnte eine Regulationssignalkaskade aufgedeckt werden, die die Expression von PAPC über Wnt5a und Ror2 direkt steuert (Schambony und Wedlich, 2007). Beide Faktoren, Wnt5a und Ror2, werden auch im Innenohr exprimiert. Auch in der Innenohrentwicklung scheint die PAPC Expression über Wnt5a und Ror2 reguliert zu werden, da der Einsatz von Morpholinos in beiden Fällen zu einer Reduktion der PAPC Expression führte, wobei die Auswirkungen des Wnt5a Morpholinos stärker waren.

Ferner zeigen die Depletionsexperimente, dass ein Fehlen von Wnt5a oder Ror2 zu den gleichen morphologischen Veränderungen der Otocyste bei Erhalt der Markerexpression führen, wie es nach dem Knockdown von PAPC beobachtet wird. Hier zeigt sich eine Parallelität zu den Migrationsprozessen in der Gastrulation, wo ein Verlust von Wnt5a oder Ror2 den PAPC Phänotyp imitiert und zu einer Fehlorientierung der Zellen führt (Unterseher et al., 2004). Die Spezifität dieser Effekte wurde durch die Ko-Injektion von steigenden Ror2 RNA Mengen mit Wnt5a Morpholino. Ror2 war in der Lage dosisabhängig die Wildtypsituation zu rekonstituieren. Ror2 und Wnt5a interagieren also auch im Innenohr, um die Expression von PAPC zu regulieren.

6.7 Etablierung des Tiermodells Huhn- *Gallus gallus*

Bisher konnten einige wesentliche Funktionen, sowie Teile des Signalwegs von PAPC während der frühen Ohrentwicklung untersucht und bestätigt werden. Jedoch bleiben Fragen offen, die die spätere Ohrentwicklung betreffen. Bisherige Beobachtungen deuten verstärkt auf eine mögliche Rolle während der Haarzellbildung und/oder der Mechanotransduktion hin. Der PCP Signalweg spielt eine wichtige Rolle während der Errichtung einer uniform gerichteten Haarzellebene (Yoshida und Liberman, 1999). Protocadherine und Cadherine spielen als Komponenten transienter Stereozilienverbindungen eine Rolle bei deren Integritätserhaltung und später sind sie Schlüsselkomponenten der *Tip links*, die die Mechanotransduktion vermitteln (Kazmierczak et al., 2007; Beurg et al., 2009; Shin und Gillespie, 2005).

Weitere Studien dieser Art an *Xenopus* durchzuführen wäre jedoch wenig sinnvoll, da wie bereits erwähnt, der Wirkungsradius des Morpholinos begrenzt ist. Als Tiermodell bietet sich daher das Huhn an. Es ist leicht zu manipulieren und erfordert keinen

Haltungsaufwand. Zudem ist es im Bereich der Innenohr-, insbesondere der Haarzellentwicklung bereits sehr gut untersucht. Viele der bereits erwähnten Komponenten wurden bereits im Innenohr des Huhns gefunden, wie zum Beispiel Frizzled7, Ror2 oder Flamingo (Stark et al., 2000; Stricker et al., 2006; Davies et al., 2005). Auch die Expression von chPAPC konnte im Innenohr nachgewiesen werden (Daten der Diplomarbeit). Es existieren zudem bereits mehrere Antikörper, die die Haarzellen spezifisch markieren, wie zum Beispiel das HCA (Kondo et al., 2002).

Seit 2007 ist auch die vollständige chPAPC DNA Sequenz in die Datenbank eingefügt worden (Chal und Pourquie; Accession Nummer A5Y5L6). Die chPAPC Sequenz konnte vollständig kloniert werden, leider liegt sie bisher nur in fünf Teilkonstrukten vor, was aber bei der Synthese der RNAi kein Problem darstellt.

Zunächst konnte die erfolgreiche Bebrütung und die Bestimmung der Stadien nach Hamilton und Hamburger (1951) etabliert werden. Die Manipulation der Embryonen erfolgt mittels Elektroporation. Dabei wird das einzuführende Konstrukt in den Embryo injiziert woraufhin sofort ein elektrischer Impuls erfolgen muss. Die Genstilllegung erfolgt also immer nur partiell. Dazu eignet sich das Innenohr sehr gut, da es sich bei der Otocyste um ein abgeschlossenes Kompartiment handelt (Mainguy et al., 2000; Inoue und Krumlauf, 2001). Da chPAPC nicht nur im Innenohr, sondern auch in den Extremitäten, und sehr stark in verschiedenen Regionen des zentralen Nervensystems exprimiert wird, musste eine Möglichkeit gefunden werden, die erfolgreiche Repression von chPAPC durch RNAi nachweisen zu können. Dazu wurden die Plakoden/Otocyten separat aus dem Embryo präpariert und mittels RT-PCR erfolgreich auf ihre chPAPC Expression hin untersucht. Die Expression ist zu Beginn der Invagination noch recht stark, flacht dann aber ab, bis HH18, wo sie sehr prominent wiederkehrt. Der Invaginationsprozess (von der Plakode bis zur Otocyste) dauert von HH11 bis HH17 (Alvarez und Navascues, 1990). ChPAPC scheint also im Huhn nur bedingt in den Prozess der Invagination involviert zu sein.

Da es wie bereits für *Xenopus* erwähnt häufig zu Redundanzen kommen kann, soll diese Eventualität minimiert werden. Eine Möglichkeit sind Explantate. Isolierte Otocysten enthalten eine selbstorganisierende Kapazität *in vitro* (Sokolowski et al., 1993; Kondo et al., 2002). Zwei Explantattypen konnten in dieser Arbeit erfolgreich etabliert werden. Die Entnahme und Inkulturnahme der Plakode bzw. des otischen Bechers alleine nach Kondo et al. (2002) und die Inkulturnahme von Teilexplantaten des Rhombenzephalons (nach Neubüsser, persönliche Kommunikation).

Die Manipulation der Embryonen mit Hilfe der Elektroporation war sowohl *in ovo*, als auch in den Rhombenzephalonexplantaten erfolgreich. Die erfolgreiche Elektroporation konnte mittels eines fluoreszierenden GFP Konstruktes nachgewiesen werden. Schnitte zeigen, dass fast ausschließlich das Ohrepithel getroffen worden ist. Ein Vorteil der Rhombenzephalonexplantate ist das Fehlen des sich entwickelnden Herzens, da es hier *in ovo* Interferenzen mit der angelegten Spannung gab, die zum Teil zum Aussetzen des Herzschlags geführt hatten. Die Elektroporation bietet unter anderem noch einen weiteren Vorteil. Da der Strom nur in eine Richtung fließt ist es möglich nur Teile des Epithels zu behandeln, so dass die RNAi nur in bestimmten Regionen angewandt werden könnte, von denen bekannt ist, welches Schicksal diese Zellen haben. So würde man Informationen zur Funktion des Genes erhalten, da bestimmte Ohrareale zum Teil späteren Kompartimenten zugeordnet werden können.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion des Protocadherins PAPC während der frühen Innenohrentwicklung untersucht. Die Expression beginnt in der ganzen Plakode und verlagert sich während des Invaginationsprozesses in die laterale Hälfte der Otocyste. Wird die PAPC Translation durch Morpholinos supprimiert, kommt es zu spezifischen morphologischen Veränderungen, die sich durch die Ko-Injektion von PAPC RNA rekonstituieren lassen. Die Beteiligung von PAPC an Plakodeninduktion, Neuroblastenmigration und Otocystenmusterung konnte ausgeschlossen werden. Der Fokus der weiteren Untersuchungen lag auf dem bisher wenig bekannten Prozess der Invagination. Eine genauere Analyse der Epithelstruktur zeigte eine Rolle von PAPC als essentieller Faktor für die Erhaltung der Epithelstruktur und dessen apikal-basaler Polarität. Mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit spielt bei diesem Prozess hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, die signalvermittelnde Funktion des Protocadherins eine Rolle. Keines der klassischen Cadherine, die vor allem für ihre adhäsiven Fähigkeiten bekannt sind, war in der Lage die Funktion von PAPC zu ersetzen. PCNS, ein Protocadherin, das erst spät im Ohr exprimiert wird, konnte jedoch den Verlust von PAPC beinahe vollständig ersetzen, was auf eine konservierte für Protocadherin spezifische Funktion schließen lässt.

Die Repression von LRP6 führt zum vollständigen Verlust otischer Marker, was auf eine Beteiligung zumindest eines oder beider, dem kanonischen und dem PCP Signalweg, hindeutet. Allerdings erfolgt dies unabhängig von PAPC, da mögliche Interaktionspartner dieses Protocadherins, wie Dishevelled die Defekte der PAPC Depletion nicht aufhoben. Stattdessen wird, wie bereits für die Gastrula beschrieben, die Signalweiterleitung über Aktivierung von RhoA und Hemmung von Rac1 gewährleistet. Andere getestete kleine GTPasen wie Cdc42 spielen dabei keine Rolle. Die Beteiligung von Frizzled7 als Rezeptor konnte bei der Innenohrentwicklung nicht nachgewiesen werden, da die Injektion eines Frizzled7 Morpholinos anders als während der Gastrula, keine Effekte aufwies. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte aber auch das Auftreten von Redundanzen sein, wie es bereits für andere Frizzleds im Innenohr beobachtet wurde.

Die Expression von PAPC wird während der Innenohrentwicklung, wie während der Gastrula, durch Wnt5a und Ror2 reguliert. Die Repression dieser Faktoren führt einerseits zur Reduktion der PAPC Expression, andererseits zu demselben

morphologischen Phänotyp, der für den Verlust von PAPC gezeigt werden konnte. Die durch Wnt5a Morpholino hervorgerufenen Effekte lassen sich durch Ror2 RNA rekonstituieren.

Da bisher Protocadherine und der PCP Signalweg eine starke Beteiligung an der Generierung der Haarzellen und der korrekten Ausrichtung der Stereozilienbündel zeigen, soll die späte Rolle von PAPC im Innenohr ebenfalls untersucht werden. Der einseitige Verlust von PAPC führt bei *Xenopus* zu Störungen des Gleichgewichts. Der Vergleich der Otolithen zeigte keine Unterschiede zwischen PAPC supprimierten und Wildtyp Innenohren. Zur Untersuchung der späten Auswirkungen wurde, aufgrund der begrenzten Wirksamkeit der Morpholinos, für weitere Experimente das Huhn als Tiermodell etabliert. Bisher konnten Brutbedingungen und Stadienbestimmung erfolgreich durchgeführt werden. Durch RT-PCR auf die isolierte Otocyste konnten chPAPC Transkripte nachgewiesen werden, die zeigen, dass die chPAPC Expression verstärkt zum Zeitpunkt der Haarzellgeneration einsetzt. Um Redundanzen zu vermeiden, konnten sowohl Explantate der Otocysten alleine, als auch größere Explantate, mit Teilen des Rhombenzephalons etabliert werden. Sowohl an den Rhombenzephalon-Explantaten, als auch *in vivo* konnte die Elektroporation zur Manipulation erfolgreich eingesetzt werden. Anhand der bisher klonierten Teile der Hühnchen PAPC Sequenz können für die folgenden Experimente RNAi Konstrukte generiert und eingesetzt werden.

8 Literaturverzeichnis

- **Abe, K. and Takeichi, M.** (2008). EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13-9.
- **Abello, G. and Alsina, B.** (2007). Establishment of a proneural field in the inner ear. *Int J Dev Biol* **51**, 483-93.
- **Adam, J., Myat, A., Le Roux, I., Eddison, M., Henrique, D., Ish-Horowicz, D. and Lewis, J.** (1998). Cell fate choices and the expression of Notch, Delta and Serrate homologues in the chick inner ear: parallels with *Drosophila* sense-organ development. *Development* **125**, 4645-54.
- **Alagramam, K. N., Yuan, H., Kuehn, M. H., Murcia, C. L., Wayne, S., Srisailpathy, C. R., Lowry, R. B., Knaus, R., Van Laer, L., Bernier, F. P. et al.** (2001). Mutations in the novel protocadherin PCDH15 cause Usher syndrome type 1F. *Hum Mol Genet* **10**, 1709-18.
- **Alsina, B., Abello, G., Ulloa, E., Henrique, D., Pujades, C. and Giraldez, F.** (2004). FGF signaling is required for determination of otic neuroblasts in the chick embryo. *Dev Biol* **267**, 119-34.
- **Alvarez, I. S. and Navascues, J.** (1990). Shaping, invagination, and closure of the chick embryo otic vesicle: scanning electron microscopic and quantitative study. *Anat Rec* **228**, 315-26.
- **Aoki, Y., Saint-Germain, N., Gyda, M., Magner-Fink, E., Lee, Y. H., Credidio, C. and Saint-Jeannet, J. P.** (2003). Sox10 regulates the development of neural crest-derived melanocytes in *Xenopus*. *Dev Biol* **259**, 19-33.
- **Babb-Clendenon, S., Shen, Y. C., Liu, Q., Turner, K. E., Mills, M. S., Cook, G. W., Miller, C. A., Gattone, V. H., 2nd, Barald, K. F. and Marrs, J. A.** (2006). Cadherin-2 participates in the morphogenesis of the zebrafish inner ear. *J Cell Sci* **119**, 5169-77.
- **Bailey, A. P. and Streit, A.** (2006). Sensory organs: making and breaking the pre-placodal region. *Curr Top Dev Biol* **72**, 167-204.

- **Baker, C. V. and Bronner-Fraser, M.** (2001). Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction. *Dev Biol* **232**, 1-61.
- **Barald, K. F. and Kelley, M. W.** (2004). From placode to polarization: new tunes in inner ear development. *Development* **131**, 4119-30.
- **Barenbaum, M. and Bronner-Fraser, M.** (2007). Spalt4 mediates invagination and otic placode gene expression in cranial ectoderm. *Development* **134**, 3805-14.
- **Barrionuevo, F., Naumann, A., Bagheri-Fam, S., Speth, V., Taketo, M. M., Scherer, G. and Neubuser, A.** (2008). Sox9 is required for invagination of the otic placode in mice. *Dev Biol* **317**, 213-24.
- **Bayramov, A. V., Martynova, N. Y., Eroshkin, F. M., Ermakova, G. V. and Zاراisky, A. G.** (2004). The homeodomain-containing transcription factor X-nkx-5.1 inhibits expression of the homeobox gene Xanf-1 during the *Xenopus laevis* forebrain development. *Mech Dev* **121**, 1425-41.
- **Beurg, M., Fettiplace, R., Nam, J. H. and Ricci, A. J.** (2009). Localization of inner hair cell mechanotransducer channels using high-speed calcium imaging. *Nat Neurosci* **12**, 553-8.
- **Bever, M. M., Jean, Y. Y. and Fekete, D. M.** (2003). Three-dimensional morphology of inner ear development in *Xenopus laevis*. *Dev Dyn* **227**, 422-30.
- **Bever, M. M., Jean, Y. Y. and Fekete, D. M.** (2003). Three-dimensional morphology of inner ear development in *Xenopus laevis*. *Dev Dyn* **227**, 422-30.
- **Bok, J., Bronner-Fraser, M. and Wu, D. K.** (2005). Role of the hindbrain in dorsoventral but not anteroposterior axial specification of the inner ear. *Development* **132**, 2115-24.
- **Bok, J., Dolson, D. K., Hill, P., Ruther, U., Epstein, D. J. and Wu, D. K.** (2007). Opposing gradients of Gli repressor and activators mediate Shh signaling along the dorsoventral axis of the inner ear. *Development* **134**, 1713-22.
- **Bouwmeester, T., Kim, S., Sasai, Y., Lu, B. and De Robertis, E. M.** (1996). Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* **382**, 595-601.

- **Brieher, W. M. and Gumbiner, B. M.** (1994). Regulation of C-cadherin function during activin induced morphogenesis of *Xenopus* animal caps. *J Cell Biol* **126**, 519-27.
- **Brigande, J. V., Kiernan, A. E., Gao, X., Iten, L. E. and Fekete, D. M.** (2000). Molecular genetics of pattern formation in the inner ear: do compartment boundaries play a role? *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11700-6.
- **Brown, S. T., Wang, J. and Groves, A. K.** (2005). Dlx gene expression during chick inner ear development. *J Comp Neurol* **483**, 48-65.
- **Brown, S. T., Wang, J. and Groves, A. K.** (2005). Dlx gene expression during chick inner ear development. *J Comp Neurol* **483**, 48-65.
- **Brugmann, S. A. and Moody, S. A.** (2005). Induction and specification of the vertebrate ectodermal placodes: precursors of the cranial sensory organs. *Biol Cell* **97**, 303-19.
- **Brugmann, S. A., Pandur, P. D., Kenyon, K. L., Pignoni, F. and Moody, S. A.** (2004). Six1 promotes a placodal fate within the lateral neurogenic ectoderm by functioning as both a transcriptional activator and repressor. *Development* **131**, 5871-81.
- **Bryant, J., Goodyear, R. J. and Richardson, G. P.** (2002). Sensory organ development in the inner ear: molecular and cellular mechanisms. *Br Med Bull* **63**, 39-57.
- **Chen, C. P., Posy, S., Ben-Shaul, A., Shapiro, L. and Honig, B. H.** (2005). Specificity of cell-cell adhesion by classical cadherins: Critical role for low-affinity dimerization through beta-strand swapping. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8531-6.
- **Chen, X. and Gumbiner, B. M.** (2006). Paraxial protocadherin mediates cell sorting and tissue morphogenesis by regulating C-cadherin adhesion activity. *J Cell Biol* **174**, 301-13.
- **Chen, X. and Gumbiner, B. M.** (2006). Crosstalk between different adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 572-8.

- **Chen, X. and Gumbiner, B. M.** (2006). Paraxial protocadherin mediates cell sorting and tissue morphogenesis by regulating C-cadherin adhesion activity. *J Cell Biol* **174**, 301-13.
- **Chen, X., Molino, C., Liu, L. and Gumbiner, B. M.** (2007). Structural elements necessary for oligomerization, trafficking, and cell sorting function of paraxial protocadherin. *J Biol Chem* **282**, 32128-37.
- **Choi, Y. S., Sehgal, R., McCrea, P. and Gumbiner, B.** (1990). A cadherin-like protein in eggs and cleaving embryos of *Xenopus laevis* is expressed in oocytes in response to progesterone. *J Cell Biol* **110**, 1575-82.
- **Chung, H. A., Yamamoto, T. S. and Ueno, N.** (2007). ANR5, an FGF target gene product, regulates gastrulation in *Xenopus*. *Curr Biol* **17**, 932-9.
- **Cole, L. K., Le Roux, I., Nunes, F., Laufer, E., Lewis, J. and Wu, D. K.** (2000). Sensory organ generation in the chicken inner ear: contributions of bone morphogenetic protein 4, serrate1, and lunatic fringe. *J Comp Neurol* **424**, 509-20.
- **Curtin, J. A., Quint, E., Tsipouri, V., Arkell, R. M., Cattanach, B., Copp, A. J., Henderson, D. J., Spurr, N., Stanier, P., Fisher, E. M. et al.** (2003). Mutation of *Celsr1* disrupts planar polarity of inner ear hair cells and causes severe neural tube defects in the mouse. *Curr Biol* **13**, 1129-33.
- **Curtin, J. A., Quint, E., Tsipouri, V., Arkell, R. M., Cattanach, B., Copp, A. J., Henderson, D. J., Spurr, N., Stanier, P., Fisher, E. M. et al.** (2003). Mutation of *Celsr1* disrupts planar polarity of inner ear hair cells and causes severe neural tube defects in the mouse. *Curr Biol* **13**, 1129-33.
- **Dabdoub, A., Donohue, M. J., Brennan, A., Wolf, V., Montcouquiol, M., Sassoon, D. A., Hseih, J. C., Rubin, J. S., Salinas, P. C. and Kelley, M. W.** (2003). Wnt signaling mediates reorientation of outer hair cell stereociliary bundles in the mammalian cochlea. *Development* **130**, 2375-84.
- **Davies, A., Formstone, C., Mason, I. and Lewis, J.** (2005). Planar polarity of hair cells in the chick inner ear is correlated with polarized distribution of c-flamingo-1 protein. *Dev Dyn* **233**, 998-1005.

- **DeSimone, D. W., Norton, P. A. and Hynes, R. O.** (1992). Identification and characterization of alternatively spliced fibronectin mRNAs expressed in early *Xenopus* embryos. *Dev Biol* **149**, 357-69.
- **Di Palma, F., Holme, R. H., Bryda, E. C., Belyantseva, I. A., Pellegrino, R., Kachar, B., Steel, K. P. and Noben-Trauth, K.** (2001). Mutations in *Cdh23*, encoding a new type of cadherin, cause stereocilia disorganization in waltzer, the mouse model for Usher syndrome type 1D. *Nat Genet* **27**, 103-7.
- **Djiane, A., Yogev, S. and Mlodzik, M.** (2005). The apical determinants aPKC and dPatj regulate Frizzled-dependent planar cell polarity in the *Drosophila* eye. *Cell* **121**, 621-31.
- **Eisen, J. S. and Smith, J. C.** (2008). Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development* **135**, 1735-43.
- **El-Amraoui, A. and Petit, C.** (2005). Usher I syndrome: unravelling the mechanisms that underlie the cohesion of the growing hair bundle in inner ear sensory cells. *J Cell Sci* **118**, 4593-603.
- **Erdmann, B., Kirsch, F. P., Rathjen, F. G. and More, M. I.** (2003). N-cadherin is essential for retinal lamination in the zebrafish. *Dev Dyn* **226**, 570-7.
- **Fekete, D. M. and Wu, D. K.** (2002). Revisiting cell fate specification in the inner ear. *Curr Opin Neurobiol* **12**, 35-42.
- **Foty, R. A. and Steinberg, M. S.** (2005). The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation. *Dev Biol* **278**, 255-63.
- **Furthauer, M., Reifers, F., Brand, M., Thisse, B. and Thisse, C.** (2001). *sprouty4* acts in vivo as a feedback-induced antagonist of FGF signaling in zebrafish. *Development* **128**, 2175-86.
- **George, K. M., Leonard, M. W., Roth, M. E., Lieuw, K. H., Kioussis, D., Grosveld, F. and Engel, J. D.** (1994). Embryonic expression and cloning of the murine *GATA-3* gene. *Development* **120**, 2673-86.
- **Gerchman, E., Hilfer, S. R. and Brown, J. W.** (1995). Involvement of extracellular matrix in the formation of the inner ear. *Dev Dyn* **202**, 421-32.

- **Glavic, A., Maris Honore, S., Gloria Feijoo, C., Bastidas, F., Allende, M. L. and Mayor, R.** (2004). Role of BMP signaling and the homeoprotein Iroquois in the specification of the cranial placodal field. *Dev Biol* **272**, 89-103.
- **Groves, A. K. and Bronner-Fraser, M.** (2000). Competence, specification and commitment in otic placode induction. *Development* **127**, 3489-99.
- **Groves, A. K. and Bronner-Fraser, M.** (2000). Competence, specification and commitment in otic placode induction. *Development* **127**, 3489-99.
- **Gumbiner, B. M.** (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 622-34.
- **Habas, R., Dawid, I. B. and He, X.** (2003). Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev* **17**, 295-309.
- **Habas, R., Dawid, I. B. and He, X.** (2003). Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev* **17**, 295-309.
- **Haddon, C. and Lewis, J.** (1996). Early ear development in the embryo of the zebrafish, *Danio rerio*. *J Comp Neurol* **365**, 113-28.
- **Hayata, T., Kuroda, H., Eisaki, A. and Asashima, M.** (1999). Expression of Xenopus T-box transcription factor, *tbx2* in Xenopus embryo. *Dev Genes Evol* **209**, 625-8.
- **Heasman, J., Ginsberg, D., Geiger, B., Goldstone, K., Pratt, T., Yoshida-Noro, C. and Wylie, C.** (1994). A functional test for maternally inherited cadherin in Xenopus shows its importance in cell adhesion at the blastula stage. *Development* **120**, 49-57.
- **Heller, N. and Brandli, A. W.** (1997). Xenopus Pax-2 displays multiple splice forms during embryogenesis and pronephric kidney development. *Mech Dev* **69**, 83-104.
- **Heller, N. and Brandli, A. W.** (1999). Xenopus Pax-2/5/8 orthologues: novel insights into Pax gene evolution and identification of Pax-8 as the earliest marker for otic and pronephric cell lineages. *Dev Genet* **24**, 208-19.

- **Hikasa, H., Shibata, M., Hiratani, I. and Taira, M.** (2002). The *Xenopus* receptor tyrosine kinase *Xror2* modulates morphogenetic movements of the axial mesoderm and neuroectoderm via Wnt signaling. *Development* **129**, 5227-39.
- **Hilfer, S. R., Esteves, R. A. and Sanzo, J. F.** (1989). Invagination of the otic placode: normal development and experimental manipulation. *J Exp Zool* **251**, 253-64.
- **Hu, R. Y., Xu, P., Chen, Y. L., Lou, X. and Ding, X.** (2006). The role of Paraxial Protocadherin in *Xenopus* otic placode development. *Biochem Biophys Res Commun*.
- **Inoue, T. and Krumlauf, R.** (2001). An impulse to the brain--using in vivo electroporation. *Nat Neurosci* **4 Suppl**, 1156-8.
- **Jones, C. and Chen, P.** (2007). Planar cell polarity signaling in vertebrates. *Bioessays* **29**, 120-32.
- **Karner, C., Wharton, K. A., Jr. and Carroll, T. J.** (2006). Planar cell polarity and vertebrate organogenesis. *Semin Cell Dev Biol* **17**, 194-203.
- **Karner, C., Wharton, K. A. and Carroll, T. J.** (2006). Apical-basal polarity, Wnt signaling and vertebrate organogenesis. *Semin Cell Dev Biol* **17**, 214-22.
- **Kazmierczak, P., Sakaguchi, H., Tokita, J., Wilson-Kubalek, E. M., Milligan, R. A., Muller, U. and Kachar, B.** (2007). Cadherin 23 and protocadherin 15 interact to form tip-link filaments in sensory hair cells. *Nature* **449**, 87-91.
- **Keeble, T. R. and Cooper, H. M.** (2006). Ryk: a novel Wnt receptor regulating axon pathfinding. *Int J Biochem Cell Biol* **38**, 2011-7.
- **Kim, S. H., Jen, W. C., De Robertis, E. M. and Kintner, C.** (2000). The protocadherin PAPC establishes segmental boundaries during somitogenesis in *xenopus* embryos. *Curr Biol* **10**, 821-30.
- **Kim, S. H., Yamamoto, A., Bouwmeester, T., Agius, E. and Robertis, E. M.** (1998). The role of paraxial protocadherin in selective adhesion and cell movements of the mesoderm during *Xenopus* gastrulation. *Development* **125**, 4681-90.

- **Knudsen, K. A., Soler, A. P., Johnson, K. R. and Wheelock, M. J.** (1995). Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J Cell Biol* **130**, 67-77.
- **Koch, A. W., Bozic, D., Pertz, O. and Engel, J.** (1999). Homophilic adhesion by cadherins. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 275-81.
- **Kondo, K., Sagara, H., Hirose, K., Kaga, K., Matsushima, S., Mabuchi, K., Uchimura, H. and Watanabe, T.** (2002). Hair cell development in vivo and in vitro: analysis by using a monoclonal antibody specific to hair cells in the chick inner ear. *J Comp Neurol* **445**, 176-98.
- **Ladher, R. K., Anakwe, K. U., Gurney, A. L., Schoenwolf, G. C. and Francis-West, P. H.** (2000). Identification of synergistic signals initiating inner ear development. *Science* **290**, 1965-7.
- **Ladher, R. K., Anakwe, K. U., Gurney, A. L., Schoenwolf, G. C. and Francis-West, P. H.** (2000). Identification of synergistic signals initiating inner ear development. *Science* **290**, 1965-7.
- **Ladher, R. K., Wright, T. J., Moon, A. M., Mansour, S. L. and Schoenwolf, G. C.** (2005). FGF8 initiates inner ear induction in chick and mouse. *Genes Dev* **19**, 603-13.
- **Lee, J. E., Hollenberg, S. M., Snider, L., Turner, D. L., Lipnick, N. and Weintraub, H.** (1995). Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* **268**, 836-44.
- **Lee, K. J. and Jessell, T. M.** (1999). The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu Rev Neurosci* **22**, 261-94.
- **Liem, K. F., Jr., Tremml, G., Roelink, H. and Jessell, T. M.** (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* **82**, 969-79.
- **Lillevali, K., Haugas, M., Matilainen, T., Pussinen, C., Karis, A. and Salminen, M.** (2006). Gata3 is required for early morphogenesis and Fgf10 expression during otic development. *Mech Dev* **123**, 415-29.

- **Litsiou, A., Hanson, S. and Streit, A.** (2005). A balance of FGF, BMP and WNT signalling positions the future placode territory in the head. *Development* **132**, 4051-62.
- **Liu, A. and Joyner, A. L.** (2001). EN and GBX2 play essential roles downstream of FGF8 in patterning the mouse mid/hindbrain region. *Development* **128**, 181-91.
- **Liu, D., Chu, H., Maves, L., Yan, Y. L., Morcos, P. A., Postlethwait, J. H. and Westerfield, M.** (2003). Fgf3 and Fgf8 dependent and independent transcription factors are required for otic placode specification. *Development* **130**, 2213-24.
- **Liu, W., Li, G., Chien, J. S., Raft, S., Zhang, H., Chiang, C. and Frenz, D. A.** (2002). Sonic hedgehog regulates otic capsule chondrogenesis and inner ear development in the mouse embryo. *Dev Biol* **248**, 240-50.
- **Mahmood, R., Kiefer, P., Guthrie, S., Dickson, C. and Mason, I.** (1995). Multiple roles for FGF-3 during cranial neural development in the chicken. *Development* **121**, 1399-410.
- **Mainguy, G., Montesinos, M. L., Lesaffre, B., Zevnik, B., Karasawa, M., Kothary, R., Wurst, W., Prochiantz, A. and Volovitch, M.** (2000). An induction gene trap for identifying a homeoprotein-regulated locus. *Nat Biotechnol* **18**, 746-9.
- **Maklad, A. and Fritsch, B.** (2003). Partial segregation of posterior crista and saccular fibers to the nodulus and uvula of the cerebellum in mice, and its development. *Brain Res Dev Brain Res* **140**, 223-36.
- **Malicki, J., Jo, H. and Pujic, Z.** (2003). Zebrafish N-cadherin, encoded by the glass onion locus, plays an essential role in retinal patterning. *Dev Biol* **259**, 95-108.
- **Mason, J. M., Morrison, D. J., Basson, M. A. and Licht, J. D.** (2006). Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. *Trends Cell Biol* **16**, 45-54.
- **McKay, I. J., Lewis, J. and Lumsden, A.** (1996). The role of FGF-3 in early inner ear development: an analysis in normal and kreisler mutant mice. *Dev Biol* **174**, 370-8.

- **Medina, A. and Steinbeisser, H.** (2000). Interaction of Frizzled 7 and Dishevelled in *Xenopus*. *Dev Dyn* **218**, 671-80.
- **Medina, A., Swain, R. K., Kuerner, K. M. and Steinbeisser, H.** (2004). *Xenopus* paraxial protocadherin has signaling functions and is involved in tissue separation. *Embo J* **23**, 3249-58.
- **Miller, J. R.** (2002). The Wnts. *Genome Biol* **3**, REVIEWS3001.
- **Mlodzik, M.** (2002). Planar cell polarization: do the same mechanisms regulate *Drosophila* tissue polarity and vertebrate gastrulation? *Trends Genet* **18**, 564-71.
- **Montcouquiol, M., Rachel, R. A., Lanford, P. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Kelley, M. W.** (2003). Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals. *Nature* **423**, 173-7.
- **Moore, B. C.** (2002). Interference effects and phase sensitivity in hearing. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* **360**, 833-58.
- **Morishita, H., Umitsu, M., Murata, Y., Shibata, N., Udaka, K., Higuchi, Y., Akutsu, H., Yamaguchi, T., Yagi, T. and Ikegami, T.** (2006). Structure of the cadherin-related neuronal receptor/protocadherin-alpha first extracellular cadherin domain reveals diversity across cadherin families. *J Biol Chem* **281**, 33650-63.
- **Morishita, H. and Yagi, T.** (2007). Protocadherin family: diversity, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 584-92.
- **Moro-Balbas, J. A., Gato, A., Alonso, M. I., Martin, P. and de la Mano, A.** (2000). Basal lamina heparan sulphate proteoglycan is involved in otic placode invagination in chick embryos. *Anat Embryol (Berl)* **202**, 333-43.
- **Morsli, H., Choo, D., Ryan, A., Johnson, R. and Wu, D. K.** (1998). Development of the mouse inner ear and origin of its sensory organs. *J Neurosci* **18**, 3327-35.
- **Nelson, W. J. and Nusse, R.** (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* **303**, 1483-7.
- **Neumann, E. and Rosenheck, K.** (1972). Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J Membr Biol* **10**, 279-90.

- **Ogata, S., Morokuma, J., Hayata, T., Kollé, G., Niehrs, C., Ueno, N. and Cho, K. W.** (2007). TGF-beta signaling-mediated morphogenesis: modulation of cell adhesion via cadherin endocytosis. *Genes Dev* **21**, 1817-31.
- **Ohyama, T. and Groves, A. K.** (2004). Expression of mouse Foxi class genes in early craniofacial development. *Dev Dyn* **231**, 640-6.
- **Ohyama, T. and Groves, A. K.** (2004). Generation of Pax2-Cre mice by modification of a Pax2 bacterial artificial chromosome. *Genesis* **38**, 195-9.
- **Ohyama, T., Groves, A. K. and Martin, K.** (2007). The first steps towards hearing: mechanisms of otic placode induction. *Int J Dev Biol* **51**, 463-72.
- **Ohyama, T., Mohamed, O. A., Taketo, M. M., Dufort, D. and Groves, A. K.** (2006). Wnt signals mediate a fate decision between otic placode and epidermis. *Development* **133**, 865-75.
- **Oishi, I., Suzuki, H., Onishi, N., Takada, R., Kani, S., Ohkawara, B., Koshida, I., Suzuki, K., Yamada, G., Schwabe, G. C. et al.** (2003). The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells* **8**, 645-54.
- **Overduin, M., Harvey, T. S., Bagby, S., Tong, K. I., Yau, P., Takeichi, M. and Ikura, M.** (1995). Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science* **267**, 386-9.
- **Ozawa, M. and Kemler, R.** (1998). The membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain prevents dimerization and negatively regulates adhesion activity. *J Cell Biol* **142**, 1605-13.
- **Penzel, R., Oswald, R., Chen, Y., Tacke, L. and Grunz, H.** (1997). Characterization and early embryonic expression of a neural specific transcription factor xSOX3 in *Xenopus laevis*. *Int J Dev Biol* **41**, 667-77.
- **Penzo-Mendez, A., Umbhauer, M., Djiane, A., Boucaut, J. C. and Riou, J. F.** (2003). Activation of Gbetagamma signaling downstream of Wnt-11/Xfz7 regulates Cdc42 activity during *Xenopus* gastrulation. *Dev Biol* **257**, 302-14.

- **Pfeffer, P. L., Gerster, T., Lun, K., Brand, M. and Busslinger, M.** (1998). Characterization of three novel members of the zebrafish Pax2/5/8 family: dependency of Pax5 and Pax8 expression on the Pax2.1 (noi) function. *Development* **125**, 3063-74.
- **Pilot, F. and Lecuit, T.** (2005). Compartmentalized morphogenesis in epithelia: from cell to tissue shape. *Dev Dyn* **232**, 685-94.
- **Pirvola, U., Spencer-Dene, B., Xing-Qun, L., Kettunen, P., Thesleff, I., Fritsch, B., Dickson, C. and Ylikoski, J.** (2000). FGF/FGFR-2(IIIb) signaling is essential for inner ear morphogenesis. *J Neurosci* **20**, 6125-34.
- **Polakis, P.** (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* **14**, 1837-51.
- **Quick, Q. A. and Serrano, E. E.** (2005). Inner ear formation during the early larval development of *Xenopus laevis*. *Dev Dyn* **234**, 791-801.
- **Rangarajan, J., Luo, T. and Sargent, T. D.** (2006). PCNS: a novel protocadherin required for cranial neural crest migration and somite morphogenesis in *Xenopus*. *Dev Biol* **295**, 206-18.
- **Reifers, F., Bohli, H., Walsh, E. C., Crossley, P. H., Stainier, D. Y. and Brand, M.** (1998). Fgf8 is mutated in zebrafish acerebellar (ace) mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis. *Development* **125**, 2381-95.
- **Riccomagno, M. M., Martinu, L., Mulheisen, M., Wu, D. K. and Epstein, D. J.** (2002). Specification of the mammalian cochlea is dependent on Sonic hedgehog. *Genes Dev* **16**, 2365-78.
- **Riccomagno, M. M., Takada, S. and Epstein, D. J.** (2005). Wnt-dependent regulation of inner ear morphogenesis is balanced by the opposing and supporting roles of Shh. *Genes Dev* **19**, 1612-23.
- **Rinkwitz-Brandt, S., Justus, M., Oldenettel, I., Arnold, H. H. and Bober, E.** (1995). Distinct temporal expression of mouse Nkx-5.1 and Nkx-5.2 homeobox genes during brain and ear development. *Mech Dev* **52**, 371-81.
- **Ross, M. D. and Pote, K. G.** (1984). Some properties of otoconia. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **304**, 445-52.

- **Ruan, G., Wedlich, D. and Koehler, A.** (2006). *Xenopus* cadherin-6 regulates growth and epithelial development of the retina. *Mech Dev* **123**, 881-92.
- **Rubel, E. W. and Fritsch, B.** (2002). Auditory system development: primary auditory neurons and their targets. *Annu Rev Neurosci* **25**, 51-101.
- **Ruben, R. J.** (1967). Development of the inner ear of the mouse: a radioautographic study of terminal mitoses. *Acta Otolaryngol*, Suppl 220:1-44.
- **Sahly, I., Andermann, P. and Petit, C.** (1999). The zebrafish *eya1* gene and its expression pattern during embryogenesis. *Dev Genes Evol* **209**, 399-410.
- **Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
- **Sano, K., Tanihara, H., Heimark, R. L., Obata, S., Davidson, M., St John, T., Taketani, S. and Suzuki, S.** (1993). Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system. *Embo J* **12**, 2249-56.
- **Schambony, A. and Wedlich, D.** (2007). Wnt-5A/Ror2 regulate expression of XPAPC through an alternative noncanonical signaling pathway. *Dev Cell* **12**, 779-92.
- **Shamim, H. and Mason, I.** (1998). Expression of Gbx-2 during early development of the chick embryo. *Mech Dev* **76**, 157-9.
- **Shapiro, L., Fannon, A. M., Kwong, P. D., Thompson, A., Lehmann, M. S., Grubel, G., Legrand, J. F., Als-Nielsen, J., Colman, D. R. and Hendrickson, W. A.** (1995). Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* **374**, 327-37.
- **Sheng, G. and Stern, C. D.** (1999). Gata2 and Gata3: novel markers for early embryonic polarity and for non-neural ectoderm in the chick embryo. *Mech Dev* **87**, 213-6.
- **Shih, J. and Keller, R.** (1992). Cell motility driving mediolateral intercalation in explants of *Xenopus laevis*. *Development* **116**, 901-14.
- **Shin, J. B., Adams, D., Paukert, M., Siba, M., Sidi, S., Levin, M., Gillespie, P. G. and Grunder, S.** (2005). *Xenopus* TRPN1 (NOMPC) localizes to microtubule-based cilia in epithelial cells, including inner-ear hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12572-7.

- **Sivak, J. M., Petersen, L. F. and Amaya, E.** (2005). FGF signal interpretation is directed by Sprouty and Spred proteins during mesoderm formation. *Dev Cell* **8**, 689-701.
- **Sokolowski, B. H., Stahl, L. M. and Fuchs, P. A.** (1993). Morphological and physiological development of vestibular hair cells in the organ-cultured otocyst of the chick. *Dev Biol* **155**, 134-46.
- **Solloway, M. J. and Robertson, E. J.** (1999). Early embryonic lethality in Bmp5;Bmp7 double mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup. *Development* **126**, 1753-68.
- **Solomon, K. S., Kudoh, T., Dawid, I. B. and Fritz, A.** (2003). Zebrafish foxi1 mediates otic placode formation and jaw development. *Development* **130**, 929-40.
- **Stark, M. R., Biggs, J. J., Schoenwolf, G. C. and Rao, M. S.** (2000). Characterization of avian frizzled genes in cranial placode development. *Mech Dev* **93**, 195-200.
- **Stemmler, M. P.** (2008). Cadherins in development and cancer. *Mol Biosyst* **4**, 835-50.
- **Strehl, S., Glatt, K., Liu, Q. M., Glatt, H. and Lalande, M.** (1998). Characterization of two novel protocadherins (PCDH8 and PCDH9) localized on human chromosome 13 and mouse chromosome 14. *Genomics* **53**, 81-9.
- **Streit, A.** (2004). Early development of the cranial sensory nervous system: from a common field to individual placodes. *Dev Biol* **276**, 1-15.
- **Streit, A.** (2007). The preplacodal region: an ectodermal domain with multipotential progenitors that contribute to sense organs and cranial sensory ganglia. *Int J Dev Biol* **51**, 447-61.
- **Stricker, S., Verhey van Wijk, N., Witte, F., Brieske, N., Seidel, K. and Mundlos, S.** (2006). Cloning and expression pattern of chicken Ror2 and functional characterization of truncating mutations in Brachydactyly type B and Robinow syndrome. *Dev Dyn* **235**, 3456-65.
- **Suzuki, S. T.** (1996). Protocadherins and diversity of the cadherin superfamily. *J Cell Sci* **109 (Pt 11)**, 2609-11.

- **Tahinci, E., Thorne, C. A., Franklin, J. L., Salic, A., Christian, K. M., Lee, L. A., Coffey, R. J. and Lee, E.** (2007). Lrp6 is required for convergent extension during *Xenopus* gastrulation. *Development* **134**, 4095-106.
- **Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki, T.** (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**, 153-208.
- **Takeichi, M.** (1990). Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem* **59**, 237-52.
- **Takemoto, T., Uchikawa, M., Kamachi, Y. and Kondoh, H.** (2006). Convergence of Wnt and FGF signals in the genesis of posterior neural plate through activation of the Sox2 enhancer N-1. *Development* **133**, 297-306.
- **Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J. P. and He, X.** (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* **407**, 530-5.
- **Unterseher, F., Hefele, J. A., Giehl, K., De Robertis, E. M., Wedlich, D. and Schambony, A.** (2004). Paraxial protocadherin coordinates cell polarity during convergent extension via Rho A and JNK. *Embo J* **23**, 3259-69.
- **Visconti, R. P. and Hilfer, S. R.** (2002). Perturbation of extracellular matrix prevents association of the otic primordium with the posterior rhombencephalon and inhibits subsequent invagination. *Dev Dyn* **223**, 48-58.
- **Wang, J., Mark, S., Zhang, X., Qian, D., Yoo, S. J., Radde-Gallwitz, K., Zhang, Y., Lin, X., Collazo, A., Wynshaw-Boris, A. et al.** (2005). Regulation of polarized extension and planar cell polarity in the cochlea by the vertebrate PCP pathway. *Nat Genet* **37**, 980-5.
- **Wang, W., Van De Water, T. and Lufkin, T.** (1998). Inner ear and maternal reproductive defects in mice lacking the Hmx3 homeobox gene. *Development* **125**, 621-34.
- **Wang, Y., Guo, N. and Nathans, J.** (2006). The role of Frizzled3 and Frizzled6 in neural tube closure and in the planar polarity of inner-ear sensory hair cells. *J Neurosci* **26**, 2147-56.

- **Wang, Y., Janicki, P., Koster, I., Berger, C. D., Wenzl, C., Grosshans, J. and Steinbeisser, H.** (2008). Xenopus Paraxial Protocadherin regulates morphogenesis by antagonizing Sprouty. *Genes Dev* **22**, 878-83.
- **Watabe-Uchida, M., Uchida, N., Imamura, Y., Nagafuchi, A., Fujimoto, K., Uemura, T., Vermeulen, S., van Roy, F., Adamson, E. D. and Takeichi, M.** (1998). alpha-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *J Cell Biol* **142**, 847-57.
- **Wawersik, S. and Maas, R. L.** (2000). Vertebrate eye development as modeled in Drosophila. *Hum Mol Genet* **9**, 917-25.
- **Winklbauer, R., Medina, A., Swain, R. K. and Steinbeisser, H.** (2001). Frizzled-7 signalling controls tissue separation during Xenopus gastrulation. *Nature* **413**, 856-60.
- **Wolverton, T. and Lalande, M.** (2001). Identification and characterization of three members of a novel subclass of protocadherins. *Genomics* **76**, 66-72.
- **Wu, D. K., Nunes, F. D. and Choo, D.** (1998). Axial specification for sensory organs versus non-sensory structures of the chicken inner ear. *Development* **125**, 11-20.
- **Yamagata, K., Andreasson, K. I., Sugiura, H., Maru, E., Dominique, M., Irie, Y., Miki, N., Hayashi, Y., Yoshioka, M., Kaneko, K. et al.** (1999). Arcadlin is a neural activity-regulated cadherin involved in long term potentiation. *J Biol Chem* **274**, 19473-1979.
- **Yamamoto, A., Amacher, S. L., Kim, S. H., Geissert, D., Kimmel, C. B. and De Robertis, E. M.** (1998). Zebrafish paraxial protocadherin is a downstream target of spadetail involved in morphogenesis of gastrula mesoderm. *Development* **125**, 3389-97.
- **Yamamoto, A., Kemp, C., Bachiller, D., Geissert, D. and De Robertis, E. M.** (2000). Mouse paraxial protocadherin is expressed in trunk mesoderm and is not essential for mouse development. *Genesis* **27**, 49-57.

- **Yamanaka, H., Moriguchi, T., Masuyama, N., Kusakabe, M., Hanafusa, H., Takada, R., Takada, S. and Nishida, E.** (2002). JNK functions in the non-canonical Wnt pathway to regulate convergent extension movements in vertebrates. *EMBO Rep* **3**, 69-75.
- **Yamanaka, H. and Nishida, E.** (2007). Wnt11 stimulation induces polarized accumulation of Dishevelled at apical adherens junctions through Frizzled7. *Genes Cells* **12**, 961-7.
- **Yasuda, S., Tanaka, H., Sugiura, H., Okamura, K., Sakaguchi, T., Tran, U., Takemiya, T., Mizoguchi, A., Yagita, Y., Sakurai, T. et al.** (2007). Activity-induced protocadherin arcadlin regulates dendritic spine number by triggering N-cadherin endocytosis via TAO2beta and p38 MAP kinases. *Neuron* **56**, 456-71.
- **Yoshida, N. and Liberman, M. C.** (1999). Stereociliary anomaly in the guinea pig: effects of hair bundle rotation on cochlear sensitivity. *Hear Res* **131**, 29-38.
- **Yu, J. S., Koujak, S., Nagase, S., Li, C. M., Su, T., Wang, X., Keniry, M., Memeo, L., Rojzman, A., Mansukhani, M. et al.** (2008). PCDH8, the human homolog of PAPC, is a candidate tumor suppressor of breast cancer. *Oncogene* **27**, 4657-65.
- **Zhong, Y., Briehner, W. M. and Gumbiner, B. M.** (1999). Analysis of C-cadherin regulation during tissue morphogenesis with an activating antibody. *J Cell Biol* **144**, 351-9.
- **Zhou, X., Sasaki, H., Lowe, L., Hogan, B. L. and Kuehn, M. R.** (1993). Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* **361**, 543-7.
- **Zimmermann, U., Pilwat, G. and Riemann, F.** (1974). Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophys J* **14**, 881-99.

9 Anhang

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Doris Wedlich für die exzellente und intensive Unterstützung, Betreuung und Förderung während der letzten Jahre. Ihr Enthusiasmus und persönliches Engagement kannten keine Grenzen. Auch wenn Sie kopfüber in Arbeit steckte, hatte Sie immer ein offenes Ohr für mich und stand mir mit Rat und Tat zur Seite.

Frau Dr. Véronique Orian-Rousseau, Institut für Toxikologie und Genetik, Forschungszentrum Karlsruhe, danke ich für die Übernahme des Ko-Referates.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den Mitgliedern des Zoologischen Instituts II für das angenehme Arbeitsklima, die fachlichen Ratschläge und Diskussionen. Ganz besonders erwähnen möchte ich dabei Dagmar Fichtner, Christina Deichmann, Sinem Engin, Susanne Brentle, Christine van Lishout, sowie Bianca Kraft und Martina Schneider, die mir eine große Hilfe waren. Ohne Euch hätte mir die Arbeit nicht annähernd soviel Spaß gemacht.

Mein spezieller und besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich in allen meinen Vorhaben immer unterstützt haben.

Mirko Jung, Simone Dinsler, Verena Geuting und Sandra Tuschel möchte ich für die liebe Unterstützung und die oftmals dringend nötige Ablenkung danken. Meinem Freund Wolfgang danke ich für seine Unterstützung und die Aufmunterung, wenn ich mal wieder nicht weiterwusste. Ohne Euch hätte ich es nicht geschafft. Danke!

Publikationen

Veröffentlichungen

- **“XPAPC as target gene of the Wnt5a/Ror2 pathway controls epithelium formation of the otocyst”**

Barbara Jung, Alexandra Schambony, Doris Wedlich

In Bearbeitung

Poster

- **“Characterisation of *Paraxial Protocadherin* during otic development”**

Barbara Jung, Alexandra Schambony, Doris Wedlich

Sixth German-Italian Xenopus Meeting in Vigoni, Italy, 2007

- **“*Paraxial Protocadherin* is required for proper otic vesicle formation”**

Barbara Jung, Alexandra Schambony, Doris Wedlich

12th International Xenopus Conference in Leiwun, Germany, 2008

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Barbara Jung
Geburtsdatum: 04.05.1980
Geburtsort: Karlsruhe
Familienstand: ledig

Schulausbildung

1986-1990 Grund- und Hauptschule Pfinztal
1990-1999 Ludwig-Marum Gymnasium Pfinztal
Abschluss: Abitur (Allgemeine Hochschulreife)

Hochschulausbildung

10/1999 - 05/2005 Biologiestudium an der Universität Karlsruhe (TH)
Studienschwerpunkte: Genetik und Zoologie
Nebenfächer: Umwelt- und Strahlentoxikologie,
Bioverfahrenstechnik
05/2005 – 03/2006 Diplomarbeit: „Charakterisierung des paraxialen
Protocadherins während der Entwicklung des Innenohrs
von *Xenopus laevis*.“ (Gesamtnote „sehr gut“)

Promotion

Seit 05/2006 Zoologisches Institut II, Molekulare Entwicklungs-
und Zellphysiologie an der Universität Karlsruhe (TH)
05/2006 – 05/2008 gefördert durch das Landesgraduier-
stipendium