

# **Prohibitin1, ein neuer essentieller Faktor der Neuralleistenentwicklung**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften am  
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

vorgelegte

DISSERTATION

von

Martina Schneider

aus Bruchsal

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referent: Prof. Dr. Doris Wedlich

Koreferent: PD Dr. Véronique Orian-Rousseau

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Oktober 2010

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde im Zoologischen Institut, Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) in der Zeit von November 2007 bis August 2010 durchgeführt.

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

Martina Schneider, September 2010

## Verwendete Abkürzungen

Neben den verwendeten SI-Einheiten werden folgende Abkürzungen verwendet:

(v/v)	Volumen-Volumen-Verhältnis
(w/v)	Gewichts-Volumen-Verhältnis
A. bidest.	bidestilliertes Wasser
A. dest.	destilliertes Wasser
As	Aminosäure
bHLH	Basic Helix-Loop-Helix
AP	Alkalische Phosphatase
AP-2	Activating Enhancer Binding Protein 2 (= AP-2 $\alpha$ )
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
Bmp	Bone Morphogenetic Protein
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine, Rinderserumalbumin
cDNA	complementary DNA
C-myc	V-Myc Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog
Dig	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
EMT	Epithel-Mesenchym-Transformation
Fgf	Fibroblast Growth Factor
FoxD3	Forkhead Box D3
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
kb	Kilobasenpaare
Knockdown	Translationsunterdrückung
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MBSH	Modified Barth`s Solution mit HEPES
Meis3	Meis Homeobox 3
MEK	MAP/ERK Kinase

MO	Morpholino-Oligonukleotid
mRNA	messenger RNA
Msx1	MSH Homeobox 1
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
NES	Kern-Export-Sequenz (nuclear export signal)
NLZ	Neuralleistenzellen
ODC	Ornithin-Decarboxylase
Pax3	Paired-Box3
PBS	Phosphate Bufferes Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
phb	prohibitin (Protein)
phbs	prohibitin1 und prohibitin2
Ras	Rat Sarcoma Virus
Raf-1	V-Raf-1 Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1 (= C-Raf)
Rb	Retinoblastoma-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
Snail2	Snail Homolog 2 (= slug)
Sox	Sry (sex determining region Y) related HMG (High Mobility Group) Box
St.	Stadium
Trp2	Tyrosine-related Protein 2
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling
UTR	Nicht-Kodierungsbereich (untranslated region)
Wnt	Wingless/INT-related
Wt	Wildtyp
Xbra	<i>Xenopus</i> brachyury
Xk81A1	<i>Xenopus</i> cytokeratin
Xphb1	<i>Xenopus</i> prohibitin1
Zic	Zink Finger Protein of the Cerebellum
β-gal	β-Galaktosidase

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1.1	Prohibitin .....	1
1.1.1	Struktur und Lokalisation .....	2
1.1.2	Funktion .....	4
1.1.3	Prohibitin in der Embryonalentwicklung von <i>Xenopus laevis</i> .....	8
1.2	Neuralleisten .....	10
1.2.1	Einteilung von Neuralleistenzellen .....	10
1.2.2	Entwicklung von Neuralleisten .....	11
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	18
<b>3</b>	<b>Materialien</b> .....	19
<b>4</b>	<b>Methoden</b> .....	28
4.1	Entwicklungsbiologische Methoden .....	28
4.1.1	Tierhaltung .....	28
4.1.2	Eiablage und Testisextraktion .....	28
4.1.3	<i>In vitro</i> Fertilisation .....	28
4.1.4	Entfernen der Gallerthülle und Färbung mit Nile-Blau .....	29
4.1.5	Mikroinjektion .....	29
4.1.6	Embryonenpflege und Fixierung .....	29
4.1.7	Gensuppression mittels <i>antisense</i> Morpholino Injektion .....	30
4.1.8	$\beta$ -Galaktosidase Färbung .....	30
4.1.9	Ganzkeimfärbung - Whole mount <i>in situ</i> Hybridisierung .....	30
4.1.10	Knorpelfärbung .....	31
4.1.11	TUNEL Assay .....	32
4.1.12	Whole mount phosphoH3 Immunfärbung .....	33
4.1.13	Anfertigung von Vibratomschnitten .....	33
4.1.14	Präparation von Explantaten der cranialen Neuralleistenzellen .....	33
4.1.15	Immunfluoreszenzfärbung auf Explantaten .....	34
4.1.16	Luziferase Reporteranalyse .....	35
4.2	Proteinbiochemische Methoden .....	36
4.2.1	Proteinextraktion aus Embryonen durch nicht-ionisches Detergens .....	36

4.2.2	Konzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Assay.....	36
4.2.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	36
4.2.4	Proteinanalyse mittels Western Blot .....	38
4.2.5	TNT® <i>in vitro</i> Translation .....	39
4.3	Molekularbiologische und biochemische Methoden .....	39
4.3.1	Restriktionsanalyse von DNA .....	40
4.3.2	Analytische und präparative Flachbett-Gelelektrophorese .....	40
4.3.3	Fällung und Reinigung von Nukleinsäuren .....	41
4.3.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	41
4.3.5	Ligation von DNA-Fragmenten .....	41
4.3.6	Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien .....	41
4.3.7	Blau-Weiß-Selektion .....	42
4.3.8	Isolierung bakterieller Plasmid-DNA .....	42
4.3.9	<i>In vitro</i> Transkription .....	43
4.3.10	RNA Isolierung aus Embryonen .....	43
4.3.11	cDNA Synthese .....	43
4.3.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	43
4.3.13	Real-time PCR.....	44
4.3.14	Sequenzanalyse .....	47
4.4	Zellbiologische Methoden.....	47
4.4.1	Kultivieren und Passagieren von HEK293 Zellen .....	47
4.4.2	Transfektion eukaryotischer Zellen.....	47
4.4.3	Immunfluoreszenzfärbung .....	48
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>49</b>
5.1	Xphb1 wird in cranialen NLZ exprimiert.....	49
5.2	Xphb1 hat eine essentielle Funktion in der Neuralleistenentwicklung.....	51
5.2.1	Das gegen Xphb1 gerichtete Morpholino-Oligonukleotid hat keinen Einfluss auf die Translation von Xphb2 .....	51
5.2.2	Die Überexpression von Xphb1 führt konzentrationsabhängig zu unterschiedlichen Phänotypen .....	52
5.2.3	Xphb1 wird für die Entwicklung der cranialen NLZ benötigt .....	53
5.2.4	Xphb1 reguliert weder Proliferation noch Apoptose.....	54
5.2.5	Einordnung von Xphb1 in die Hierarchie der Neuralleistengene .....	55

5.2.6	Xphb1 -abhängige und -unabhängige c-myc Zielgene.....	57
5.2.7	Der Einfluss von Xphb1 ist auf die Neuralleisten-Spezifikatoren beschränkt.....	61
5.2.8	Xphb1 ist für die Ausbildung von Neuralleistenderivaten erforderlich....	63
5.3	Aufklärung der Struktur-Funktionsbeziehung .....	67
5.3.1	Funktionelle Domänen von Xphb1 .....	67
5.3.2	Die E2F1-Interaktionsdomäne ist entscheidend für die Funktion von Xphb1 .....	69
5.3.3	Die Interaktion von Xphb1 und E2F1 in der Neuralleistenentwicklung ..	72
5.3.4	Die subzelluläre Lokalisation von Xphb1 im Zusammenhang mit seiner Funktion.....	76
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>82</b>
6.1	Der Einfluss von Xphb1 auf die Neuralleistenentwicklung .....	82
6.2	Xphb1 gehört zu der Gruppe der Neuralleisten-Spezifikatoren.....	83
6.3	Der Einfluss von Xphb1 auf c-myc Zielgene.....	86
6.4	Die Funktion von Xphb1 in der Neuralleistenentwicklung ist unabhängig von Proliferation und Apoptose.....	88
6.5	Der Einfluss von Xphb1 auf die Differenzierung von Neuralleistenzellen.....	89
6.6	Xphb1 interagiert mit E2F und reguliert die Entwicklung der NLZ.....	91
6.7	Die Lokalisation von Xphb1 korreliert nicht mit seiner Funktion in den NLZ	94
6.8	Molekulare Mechanismen der phb1-vermittelten transkriptionellen Repression von E2F1.....	96
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>99</b>
<b>8</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>100</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>111</b>
	Danksagung .....	111
	Publikationen.....	112
	Lebenslauf.....	113

# 1 Einleitung

## 1.1 Prohibitin

„The study of the PHB proteins already spans more than 10 years and tells us an unusual story” (Nijtmans et al., 2002).

Prohibitin1 (phb1) und prohibitin2 (phb2) sind ungewöhnliche und erstaunlich vielfältige Proteine. Homologe wurden bereits in vielen bekannten Modellorganismen, wie der Hefe, *C. elegans*, *Drosophila*, Maus, dem Mensch sowie Bakterien und Pflanzen untersucht (Mishra et al., 2006). Beide Proteine werden ubiquitinär exprimiert und die beschriebenen Funktionen variieren vom Tumorsupressor und Zellzyklusregulator über die Regulation der Lebensspanne von Hefe und den Entwicklungsarrest von *Drosophila* Larven bis hin zur transkriptionellen Regulation und zellulärem „*Signaling*“ (Berger and Yaffe, 1998; Coates et al., 1997; Eveleth and Marsh, 1986; Fusaro et al., 2002; Mishra et al., 2006; Terashima et al., 1994; Wang et al., 1999a). Die Rolle der phbs in diesen Prozessen ist jedoch noch unklar. Dagegen gibt es über ihre Funktion in den Mitochondrien, wo sie als eine Art Chaperon beschrieben werden, bereits weitreichende Analysen (Artal-Sanz et al. 2003; Artal-Sanz and Tavernarakis, 2009; Nijtmans et al., 2000; Osman et al., 2009). Ungewöhnlich ist auch, dass die phbs neben der Lokalisation in der inneren Mitochondrienmembran auch im Zellkern beschrieben werden und dort eine aktive Rolle in der Regulation der Genexpression spielen (Gamble et al., 2004; Kurtev et al., 2004).

Die phbs sind hoch konserviert und lassen sich strukturell in eine Superfamilie von Proteinen einordnen, denen die SPFH (von den Proteinen: stomatin, prohibitin, flotillin und HFIKC (High-Frequency Lysogenization of  $\lambda$  (HfIK + HfIC)) bzw. PHB Domäne eigen ist (Mishra et al., 2006; Morrow and Parton, 2005). Phb1 und phb2 werden, da sie an den IgM (Immunglobulin M)-Rezeptor in der Plasmamembran von B-Lymphozyten binden, auch als BAP32 bzw. BAP37 (B-cell receptor associated protein) bezeichnet (Terashima et al., 1994). Der Name prohibitin ist auf die Erstbeschreibung als Inhibitor der Zellproliferation zurück zu führen, wobei sich jedoch heraus stellte, dass diese Funktion nicht durch die kodierende Region der DNA vermittelt wird (Manjeshwar et al., 2003). Ihrer Funktion in den Mitochondrien



nach wurde auch die Bedeutung „proteins that hold badly folded subunits“ vorgeschlagen (Nijtmans et al., 2002).

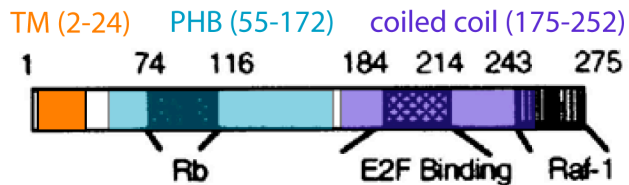
### 1.1.1 Struktur und Lokalisation

Das humane *phb1* Gen (*Hphb1*) ist auf Chromosom 17q21, das Gen *Hphb2* auf Chromosom 12p13 lokalisiert. Die genomische Struktur von *Hphb1* und *Hphb2* ist deutlich verschieden. *Hphb1* hat eine Länge von ~11 kb und ist aus 7 Exons aufgebaut, wobei das erste und ein Teil des zweiten Exons kein offenes Leseraster, sondern die Sequenz für den 5'-Nicht-Kodierungsbereich (5'UTR) und Exon 7 die Sequenz für den 3'-Nicht-Kodierungsbereich (3'UTR) der mRNA tragen (Mishra et al., 2006). Die Länge der Transkripte variiert in dem 3'UTR, welcher mit regulatorischen Funktionen in der Zellproliferation assoziiert wird (Jupe et al., 1996; Tanno et al., 1997; Manjeshwar et al., 2003). Die PHB Domäne wird von den Exons 3-5 kodiert und ist die höchst konservierte Region zwischen *Hphb1* und *Hphb2*. *Hphb2* ist aus 10 Exons aufgebaut, jedoch mit einer Länge von ~5,3 kb deutlich kleiner als *Hphb1*, da die Introns kürzer sind (Mishra et al., 2006).

Die Proteine *Hphb1* und *Hphb2* sind mit einem Molekulargewicht von ~30 bzw. ~37 kDa sehr klein und weisen ~53% Identität in ihrer Aminosäuresequenz auf. Die Homologie zu den entsprechenden Isoformen anderer Organismen ist mit bis zu 99% deutlich größer. Die Proteinsequenz von murinem und humanem *phb1* unterscheidet sich nur in einer konservierten Aminosäure.

Es sind mehrere funktionelle Domänen von *Hphb1* bekannt, die Literaturangaben zur exakten Lokalisation schwanken jedoch. Die PHB Domäne wird im Bereich von Aminosäure (As) 26-187 oder auch As 55-172 beschrieben (Mishra et al., 2006; Winter et al., 2007; Abb. 1-1). Die genaue Funktion der PHB Domäne ist nicht bekannt, durch die hohe Konservierung in Prokaryoten und Eukaryoten, kann jedoch eine wichtige zelluläre Funktion vermutet werden. Die *phbs*, sowie die anderen Proteine der Superfamilie wurden als Komponenten von „*Lipid rafts*“ identifiziert, weshalb die Vermutung aufgestellt wurde, dass die PHB Domäne ein Lipid-Erkennungsmotiv bilden könnte. (Foster et al., 2003; Garin et al., 2001; Morrow and Parton, 2005). Außerdem wird angenommen, dass die PHB Domäne Bindestellen für Melanogenin beinhaltet, welches die Melaninproduktion in Melanozyten verstärkt

(Snyder et al., 2005; Winter et al., 2007). N-terminal, von As 2-24 bzw. As 1-15, befindet sich eine hydrophobe Transmembran (TM) -Domäne, die  $\alpha$ -Helices bilden kann und für die Lokalisation der phbs in der inneren Mitochondrienmembran verantwortlich ist (Joshi et al. 2007; Winter et. al., 2007; Abb. 1-1).



**Abb. 1-1: Schema der Proteinstruktur von Hphb1.** N-terminal befindet sich eine hydrophobe Transmembran (TM) -Domäne (As 2-24). Die PHB Domäne ist im Bereich von As 55-172 lokalisiert und eine coiled coil Domäne von As 175-252. Drei weitere funktionelle Domänen sind markiert: die Rb-Bindedomäne (As 74-116); die E2F-Bindedomäne (As 184-214) und C-terminal eine Raf-1-Bindedomäne (As 243-275) (verändert nach Wang et al., 1999a; Winter et al., 2007).

Die phbs bilden große hetero-oligomere Ringkomplexe aus 12-14 phb1 und phb2 Einheiten, wobei die Bildung der phb1/phb2 Heterodimere durch eine coiled coil Domäne, bestehend aus  $\alpha$ -Helices, in der Region von As 175-252 bzw. As 177-211, vermittelt wird (Abb. 1-1) (Mishra et al., 2006; Tatsuta et al., 2005; Winter et al., 2007). C-terminal, anschließend an die coiled coil Domäne, befindet sich eine mutmaßliche Kern-Export-Sequenz (As 257-270) (Mishra et al., 2006; Rastogi et al., 2006b). Eine Kern-Lokalisation-Sequenz wurde bislang nicht identifiziert. Die Proteinstruktur von phb2 weist viele Ähnlichkeiten zu phb1 auf. Die TM-Domäne befindet sich im Bereich von As 1-36, die PHB Domäne von As 68-185 bzw. As 39-201 und die coiled coil Domäne in der Region von As 190-264 (Mishra et al., 2006; Winter et al., 2007). Darüber hinaus ist eine Kern-Lokalisation-Sequenz (As 86-89) beschrieben (Mishra et al., 2006). Abgesehen von diesen Domänen, die vorrangig die Lokalisation bzw. Heterodimerbildung vermitteln, sind weitere funktionelle Domänen beschrieben, welche für die Regulation der Genexpression benötigt werden (Abb. 1-1). Die Rb (Retinoblastom)-Bindestelle (As 74-116) und die E2F-Bindedomäne (As 184-214) sind beide an der Regulation des Zellzyklusregulators E2F1 beteiligt, indem phb1 direkte Bindungen mit den Transkriptionsfaktoren eingeht. Die C-terminale Domäne von As 243-275 ist für die direkte Bindung der

Serin/Threonin-Proteinkinase Raf-1 (C-Raf) und für die Umsetzung der von Raf-1 vermittelten „*Signaling*“ Prozesse verantwortlich (Abb. 1-1) (Wang et al., 1999a + b). Die Lokalisation der phbs ist wie deren Funktion zelltypspezifisch. Obwohl sie auch in der Plasmamembran und im humanen Zirkulationssystem identifiziert wurden, kann der Lokalisation in der Mitochondrienmembran und im Nukleus, verbunden mit den zugehörigen Funktionen, die größte Beachtung geschenkt werden.

Die Interaktion zwischen phb1 und phb2 ist weitgehend unklar. In der Mitochondrienmembran der Hefe treten Hetero-Oligomere auf und es konnte eine gegenseitige Abhängigkeit der Proteine gezeigt werden (Berger and Yaffe, 1998; Nijtmans et al., 2002). Von Säuger-Zelllinien wurde ebenfalls berichtet, dass phb1 und phb2 ausschließlich aneinander gebunden auftreten und keine freien Formen identifiziert werden konnten (Coates et al., 2001). Allerdings sind diese Untersuchungen auf die Lokalisation in Mitochondrien fixiert. In der Hefe konnten keine Homodimere identifiziert werden. Es ist jedoch unklar, ob dies auch in höheren Organismen der Fall ist (Back et al., 2002). In humanen Tumorzellen wurde ebenfalls eine Abhängigkeit der beiden Proteine gezeigt, indem sie sich gegenseitig stabilisieren. Es wird jedoch gleichzeitig vermutet, dass neben Heterodimeren auch freie Formen auftreten, die unterschiedliche Funktionen aufweisen (He et al., 2008).

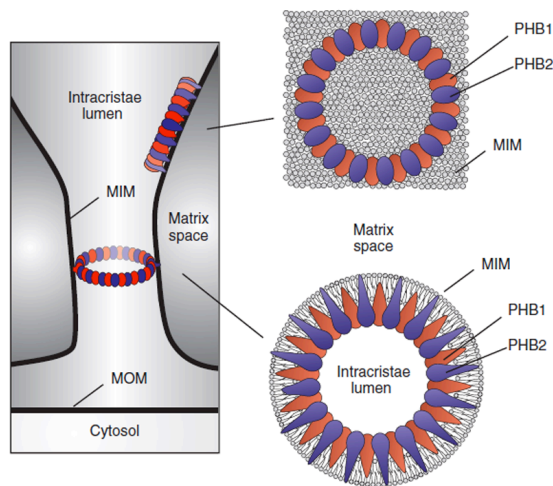
### 1.1.2 Funktion

Ebenso wie in der Lokalisation weisen die phbs eine erstaunliche Vielfalt an Funktionen auf. Die Funktion korreliert dabei mit der subzellulären Lokalisation und vermutlich ebenso mit dem Auftreten von Heterodimeren bzw. freien Formen von phb1 und phb2.

In Mitochondrien bilden phb1 und phb2 einen Ringkomplex in der inneren Membran und haben vermutlich die Aufgabe neu synthetisierte mitochondriale Proteine vor der Proteolyse durch die Protease *m*-AAA zu schützen (Nijtmans et al., 2002, Steglich et al., 1999). Es wird außerdem angenommen, dass sie als eine Art „*scaffold*“ Protein agieren. „*Scaffold*“ Proteine sind als Regulatoren von Signalwegen bekannt. Sie bringen verschiedene Faktoren eines Signalweges in einem Komplex zusammen, indem sie mit ihnen interagieren und die Signaltransduktion regulieren. In diesem Kontext könnte der phb-Komplex für die Organisation der inneren Membran, die

Regulation der Morphologie und auch für die Rekrutierung der *m*-AAA Protease verantwortlich sein (Osman et al., 2009).

Es gibt verschiedene Vorschläge für die exakte Lokalisation des phb-Komplex in der inneren Mitochondrienmembran (MIM). Entweder der Ringkomplex ist in die MIM integriert und bildet somit spezielle Membrandomänen, und/oder er ist senkrecht zur Achse der Christae Tubuli angeordnet und trägt somit zur Stabilisation bei (Abb. 1-2).



**Abb. 1-2: Der phb-Komplex in der inneren Mitochondrienmembran.** Der phb-Komplex kann in zwei Varianten in der inneren Mitochondrienmembran (MIM) integriert sein. Der Ringkomplex aus phb1 und phb2 liegt der MIM auf und bildet eine spezielle Membrandomäne (rechts oben) oder er ist senkrecht zur Achse der Christae Tubuli lokalisiert und trägt zur Stabilisation bei (rechts unten). MOM: äußere Mitochondrienmembran (verändert nach Osman et al., 2009).

In *phb*-defizienten Hefezellen wird eine Verkürzung der Lebensdauer im Zusammenhang mit einer altersabhängigen Degeneration der Mitochondrien beschrieben. Der Level an *phb1* mRNA verändert sich während der Lebensspanne von Hefe und ein Verlust des *phb1* Proteins wird in alternden Zellen beobachtet. Die Depletion von *phb1* führt also zu einem vorzeitigen Alterungsprozess. Interessanterweise ist das Expressionslevel von *phb1* in immortalisierten Zelllinien und Tumorzellen im Vergleich zu normalen Säugerzellen höher (Asamoto et al., 1994; Coates et al., 1997). Das bedeutet, ein höheres Expressionslevel an *phb1* könnte zu einer Verlängerung der Lebensdauer von Tumorzellen führen.

Darüber hinaus sind weitere Daten bekannt, die für eine Rolle von *phb1* in der Tumorigenese sprechen. Das Onkoprotein *c-myc* wird in vielen Tumoren permanent exprimiert, was durch eine Mutation des Gens hervorgerufen wird. *Hphb1* und *Hphb2* weisen in der Promoterregion beide eine konservierte Bindestelle für *c-myc* auf. Die Konsensusstellen befinden sich im *Hphb1* Promoter bei Nukleotid ~355 und im *Hphb2* Promoter bei Nukleotid ~95. In Fibroblasten aus dem Huhn, die mit einem

Retrovirus infiziert wurden, der für das Onkoprotein codiert, wurde eine Induktion der phbs gezeigt. Im Verlauf der zellulären Alterung nimmt der oxidative Stress zu, der mitochondriale Metabolismus wird vermindert, und der Level an reaktiven Sauerstoffspezies nimmt zu. C-myc kann die Lebensdauer von Zellen *in vitro* verlängern, was durch die Induktion der phbs vermittelt werden könnte (Coates et al., 2001). Dabei führt die Aktivierung der phbs zur Reduktion des oxidativen Stress' und gewährleistet somit, auch unter Sauerstoffmangel, ein kontinuierliches Wachstum der Tumorzellen (Dang and Semenza, 1999; Nijtmans et al., 2002). Apoptose wird eingeleitet wenn an einem Zellzyklus-Checkpoint eine Mutation oder Beschädigung der DNA festgestellt wird, die nicht repariert werden kann. Phb1 kann Zellen vor Apoptose schützen, wobei dies im Zusammenhang mit der Repression des proapoptotischen Faktors E2F diskutiert wird (Fusaro et al., 2002; Vander Heiden et al., 2002). Für die Tumorprogression bringt die Inhibierung der Apoptose entscheidende Vorteile, da die Tumorzellen sich ungestört ausbreiten können. Die Fähigkeit zur Migration ist für Tumorzellen ebenfalls von Bedeutung. Das G-Protein Ras trägt in Tumorzellen meist eine Mutation, die zu einer permanenten Aktivität des Raf/MEK/ERK Signalwegs führt. Die Aktivierung von Ras wird durch die Bindung eines Wachstumsfaktors an eine Rezeptor-Tyrosinkinase vermittelt, wobei ein GDP/GTP (Guanosindiphosphat/Guanosintriphosphat) Austausch stattfindet. Durch das aktive Ras-GTP wird Raf-1, gebunden an das 14-3-3 Protein, zur Zellmembran rekrutiert, von dem 14-3-3 Protein getrennt und durch Phosphorylierung aktiviert. Phb1 wird für die Lokalisation von Raf-1 an der Zellmembran und für die Abspaltung des 14-3-3 Proteins benötigt. Durch den Verlust von phb1 kann der Signalweg nicht aktiviert werden und Tumorzellen weisen eine verstärkte Zelladhäsion auf. Sie sind nicht länger fähig, auf Collagen zu wandern (Rajalingam et al., 2005). Phb1 wirkt also positiv auf Überleben, Metabolismus und Migration von Tumorzellen.

Andererseits wurde phb1 als Tumorsupressor beschrieben. Phb1 wurde zunächst aufgrund seiner Eigenschaft, die DNA-Synthese in Fibroblasten zu blockieren, kloniert. Dieser antiproliferative Effekt wird jedoch nicht durch die Proteinaktivität, sondern durch den 3'UTR vermittelt (Jupe et al., 1996; Nuell et al., 1991).

In humanen Tumorzellen ist phb1 zusammen mit den Zellzyklus-Regulatoren E2F1, Rb und p53 im Nukleus lokalisiert und kann die transkriptionelle Aktivität von E2F1 und p53 steuern. Der Transkriptionsfaktor p53 reguliert, nach einer Beschädigung

der DNA, die Einleitung eines Zellzyklusarrest oder der Apoptose und liegt in den meisten Tumoren mutiert vor. Phb1 bindet direkt an p53 und kann seine transkriptionelle Aktivität erhöhen, indem es die Bindung von p53 an dessen Zielpromotoren vermittelt (Fusaro et al., 2003).

Die Interaktion von phb1 mit E2F1 und Rb ist äußerst komplex. Sowohl Rb, als auch phb1 können durch eine direkte Bindung an E2F1 dessen transkriptionelle Aktivität reprimieren. E2F1 steuert den Zellzyklus, indem es den Übergang von der G1- zur S-Phase vermittelt. Der Tumorsuppressor Rb kann dies durch eine direkte Bindung an E2F1 blockieren, und wird selbst durch Cyclin-abhängige Kinasen phosphoryliert und somit inaktiviert (Choi et al., 2008; Wang et al., 1999b). Rb und phb1 binden an unterschiedliche Domänen von E2F1 und benötigen unterschiedliche Mediatoren für dessen Repression. Phb1 bindet an eine hoch konservierte Aminosäure-Sequenz (284-357) in der sogenannten „*marked box*“ Region von E2F1, während Rb C-terminal an die Aktivierungsdomäne bindet (Wang et al., 1999a). In Säugerzelllinien wurden mehrere Mechanismen zur Repression von E2F1 beschrieben, die Rb-abhängig oder -unabhängig verlaufen können. In Tumorzellen wurde gezeigt, dass eine phb1 Mutante, die nicht an Rb binden kann keine repressive Wirkung auf E2F1 hat (Wang et al., 1999b). Das würde bedeuten, dass phb1 indirekt über die Bindung an Rb die Aktivität von E2F1 hemmt. Andererseits wurde in humanen Epithelzellen, in denen die Rb Aktivität geblockt wurde nachgewiesen, dass die Repression von E2F1 durch eine direkte Bindung von phb1 vermittelt wird. Dabei bindet phb1 an RNF2 (ring finger protein 2), einem Mitglied der Proteinfamilie mit einer Polycomb-Gruppe, und rekrutiert es zu E2F1-abhängigen Promotern (Choi et al., 2008). Eine Gemeinsamkeit dieser Mechanismen besteht darin, dass sie alle mit einer Umgestaltung von Chromatin korrelieren. Rb und phb1 rekrutieren Korepressoren, wie die Histon-Deacetylase 1 (HDAC1) und Brg1/Brm in den E2F1 Komplex. Phb1 kann, im Gegensatz zu Rb, auch den Korepressor N-CoR (Nuclear Receptor Corepressor) für die E2F1 Repression rekrutieren (Wang et al., 2002a + b).

Die Aktivität von E2F1 und p53 wird durch phb1 reguliert; phb1 stellt somit eine Verbindung zwischen Signalwegen dar, die durch die Kontrolle des Zellzyklus Prozesse wie Proliferation und Apoptose steuern.

Die Regulation von Proliferation und Apoptose spielt in der Tumorigenese sowie in der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle. Die Funktion der phbs in der

Embryonalentwicklung wurde jedoch bisher hauptsächlich in Evertebraten untersucht. Der Verlust der phbs wurde in *C. elegans* und *Drosophila* mit einer Entwicklungsstörung der Larven in Zusammenhang gebracht.

In *C. elegans* sind die phbs nur in Form des Ringkomplexes in der inneren Mitochondrienmembran beschrieben. Der Verlust der phbs führt zu somatischen- und Keimzell-Defekten. Diese reichen von einer reduzierten Körpergröße und morphologischen Veränderungen der Gonaden bis zu einer erhöhten Sterberate der Nachkommen und Sterilität. Diese Defekte lassen sich direkt auf eine Funktionsstörung der Mitochondrien zurück führen (Artal-Sanz et al., 2003).

Das phb1 Homolog Cc (lethal (2) 37 Cc) in *Drosophila* wird während der gesamten Entwicklung, aber hauptsächlich während der späten Embryogenese exprimiert. Ein Verlust beider Allele ist lethal, wirkt sich jedoch erst im Larvenstadium aus. Das Cc Protein wird also nicht für die Entwicklung der Larve, sondern eher für deren Metabolismus bzw. den Übergang zur Puppe benötigt (Eveleth and Marsh, 1986).

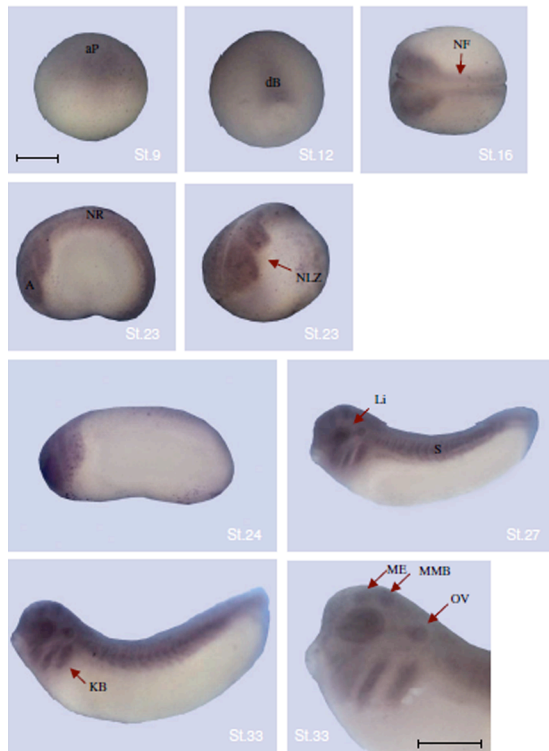
In höheren Vertebraten ist wenig bekannt über die Funktion der phbs in der Embryonalentwicklung. Snyder et al. (2005) konnten in murinen Zelllinien eine Rolle von phb1 in der Induktion der Pigmentierung identifizieren. Phb1 wird in der Epidermis von Mäusen exprimiert und die Bindung von phb1 an Melanogenin wird für die Induktion von Melanin benötigt (Huang et al., 2003).

Ein homozygoter knockout von phb1 und auch von phb2 ist lethal. Die Embryonen sterben bereits in einer sehr frühen Phase der Embryonalentwicklung vor der Gastrulation (Stadium E6.5 bzw. E9.0) (Park et al., 2005, He et al., 2008). Diese frühe lethale Wirkung deutet auf eine signifikante Funktion der phbs in der Regulation von entwicklungsbiologischen Prozessen in Vertebraten hin.

### **1.1.3 Prohibitin in der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis***

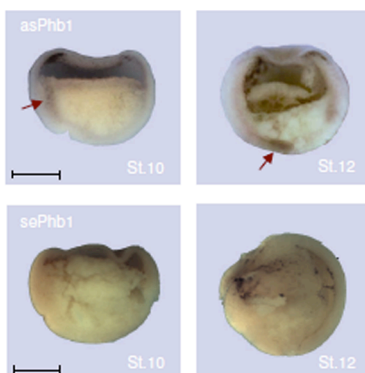
In der Entwicklung von *Xenopus laevis* wurde die Funktion der phbs bislang nicht untersucht. Während der Diplomarbeit „Funktionelle Charakterisierung von Prohibitin während der Embryonalentwicklung“ (M. Schneider, 2007) wurden sowohl *Xenopus* phb1 (Xphb1), als auch phb2 (Xphb2) erstmalig kloniert und für die Erstellung eines Expressionsprofils genutzt. Beide Proteine werden maternal und ubiquitinär exprimiert. Während *Xphb2* jedoch diffus exprimiert wird und nicht auf spezielle

Gewebe beschränkt ist, zeigt *Xphb1* eine lokal abgegrenzte Expression in den Neuralleisten, Linsen, Ohrvesikeln und im Gehirn (Abb. 1-3).



**Abb. 1-3: *Xphb1* wird in den Neuralleisten exprimiert.** Im St. 9 wird *Xphb1* im dorsalen animalen Ekotderm (aP: animaler Pol) exprimiert. In St. 12 sind *Xphb1* Transkripte in der posterioren dorsalen Region lokalisiert (dB: dorsale Balstoporuslippe) und im St. 16 zeigt sich die Expression in den Neuralleisten (NP; Neuralplatte). Im St. 23 wird *Xphb1* in migrierenden Neuralleistenzellen (NLZ) und im Neuralrohr (NR) exprimiert, während die Expression in den späteren Stadien (St. 24, 27, 33) auf die Linsen (Li), die Kiemenbögen (KB), die otischen Vesikel (OV) und das Gehirn (ME: Mesencephalon, MMB: Mesencephalon-Metencephalon-Grenze) beschränkt ist (Maßstab 400 µm; verändert nach M. Schneider, Diplomarbeit 2007)

*Xphb1* Transkripte konnten während der frühen Gastrulation im posterioren Mesendoderm (St.10) und in der späten Gastrula im Neuroektoderm und Mesoderm (St.12) identifiziert werden (Abb. 1-4).



**Abb. 1-4: *Xphb1* Expression während der Gastrulation.** Sagittalschnitt durch den Blastoporus. Im St. 10 wird *Xphb1* (asPhb1) im posterioren Mesendoderm, im St. 12 im Neuroektoderm und Mesoderm exprimiert (oben, Pfeile). In der sense Kontrolle (sePhb1) wurde kein Signal detektiert (unten). (Maßstab 400 µm; verändert nach M. Schneider, Diplomarbeit 2007).

Die Expression von *Xphb1* im Neuralleisten induzierenden Mesoderm und später in den Neuralleisten motivierte zu Funktionsverlust-Studien an Neurula Stadien (St. 20),



die einen ersten Hinweis auf die Funktion von Xphb1 in der Neuralleistenentwicklung lieferten. Die Morpholino-induzierte Depletion von Xphb1 führte in Ganzkeimfärbungen zu einem Verlust des Neuralleistenmarkers *twist*, was durch Koinjektion von mRNA, die für humanes phb1 (Hphb1) kodiert wieder hergestellt werden konnte (M. Schneider, Diplomarbeit 2007).

## 1.2 Neuralleisten

Neuralleistenzellen (NLZ) stellen eine einzigartige embryonale Zellpopulation dar, die nur in Vertebraten vorkommen und sich durch Pluripotenz und extreme Migrationsfähigkeit auszeichnen. NLZ bilden eine Vielfalt von differenzierten Zelltypen wie Neuronen, Melanozyten und Knorpel, wobei ihr Schicksal von einem hierarchisch gegliederten, regulatorischen Gennetzwerk und speziellen Migrationswegen bestimmt wird. Sie entstehen während der Neurulation in dem Bereich zwischen nicht-neuralem Ektoderm und Neuroektoderm, wo sie 1868 erstmals von dem Schweizer Embryologen Wilhelm His beschrieben wurden (Abb. 1-6) (Meulemans and Bronner-Fraser, 2004; Sauka-Spengler and Bronner-Fraser, 2008; His, 1868). NLZ teilen wichtige Charakteristika mit Tumorzellen, da sie eine Epithel-Mesenchym-Transformation (EMT) durchlaufen und aus dem Ursprungsgewebe auswandern (Acloque et al., 2009). Sie exprimieren Gene wie *c-myc*, *snail1* und *snail2 (slug)*, die auch in der Tumorigenese benötigt werden (Kuriyama and Mayor, 2008). Die Untersuchung des regulatorischen Netzwerks der Neuralleistenentwicklung hilft nicht nur Erkrankungen wie Piebaldismus oder das DiGeorge-Syndrom zu verstehen, sondern auch die Funktion von Genen in der Tumorigenese aufzuklären.

### 1.2.1 Einteilung von Neuralleistenzellen

NLZ werden ihrer Ursprungsposition und ihren Derivaten nach in vier Gruppen eingeteilt. Die cranialen NLZ wandern aus dem Bereich des Gehirns in die Kiemenbögen und bilden unter anderem die Knochen und Knorpel des Gesichts, den Thymus, die Schilddrüse und die Nebenschilddrüse. Dabei ist entscheidend, aus

welchem Rhombomer die Neuralleisten auswandern. NLZ aus Rhombomer 1 und 2 wandern über den optischen und olfaktorischen Vesikel in den Mandibularbogen, die aus Rhombomer 4 wandern in den Hyoidalbogen und NLZ aus Rhombomer 6 wandern in den dritten und vierten Kiemenbogen. Die NLZ aus Rhombomer 3 und 5 schließen sich den jeweils benachbarten Zellen an. Die trunkale Neuralleiste liegt im Hühnchen posterior von Somit 7 und die NLZ aus diesem Bereich können auf zwei Migrationswegen zu ihrem Bestimmungsort wandern und bilden dort sensorische und sympathische Neuronen, Schwannsche Zellen und Zellen des Nebennierenmarks sowie Melanozyten (Erickson et al., 1992; Le Douarin and Teillet, 1974; Mayer et al., 1973; Weston et al., 1963). Die kleinere Gruppe der vagalen und sacralen NLZ bilden die parasymphatischen Ganglienzellen des Darms (Le Douarin and Teillet, 1973; Pomeranz et al., 1991). Die kardialen Neuralleisten befinden sich im Bereich vom erstem bis zum dritten Somiten, überlappen also mit den vagalen Neuralleisten (Kirby et al., 1987; Kirby and Waldo, 1990). Sie können Melanozyten, Neurone und Knorpel bilden. Außerdem sind sie für die Bildung von herzspezifischen Geweben, wie dem Septum und den großen Arterien verantwortlich.

Die Eigenschaft der Pluripotenz ist nicht in allen Neuralleistenpopulationen gleich stark ausgeprägt. Die cranialen Neuralleisten können zum Beispiel dieselben Strukturen ausbilden wie die trunkalen, nur sie besitzen jedoch die Fähigkeit Knorpel und Knochen zu bilden.

### **1.2.2 Entwicklung von Neuralleisten**

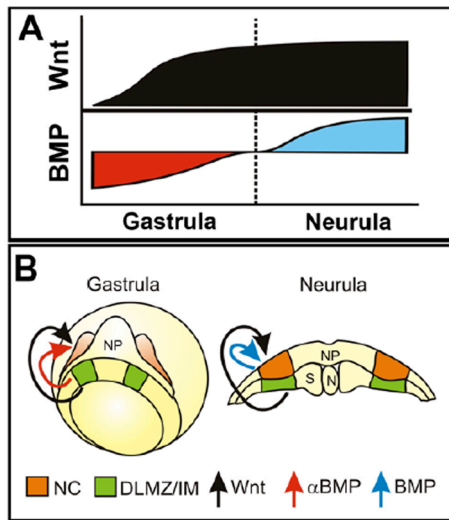
Die Neuralleistenentwicklung umfasst die Prozesse Induktion, Spezifikation, Aufrechterhaltung des Neuralleistencharakters, Migration und Differenzierung.

Die Induktion der Neuralleiste beginnt in der Gastrulation und wird über Signalgradienten entlang der medio-lateralen und antero-posterioren Achse des Embryo reguliert, wobei in Experimenten mit Hühnchen-, *Xenopus*- und Zebrafisch-Embryonen gezeigt wurde, dass die Wachstumsfaktoren Bmp (bone morphogenetic protein), Fgf (fibroblast growth factor), Wnt (Wingless/INT-related) und Retinsäure entscheidend mitwirken (Basch et al., 2004; Knecht and Bronner-Fraser, 2002; Steventon et al., 2005). Die Rolle von Wnt als induktiver Faktor wurde an verschiedenen Organismen ausführlich demonstriert. An der Induktion können

mehrere Wnts, wie Wnt1 und Wnt3 beteiligt sein, die im dorsalen Teil des Neuralrohrs exprimiert werden und zusammen mit chordin und noggin die Expression von *snail2* und *AP-2* aktivieren (Saint-Jeannet et al., 1997). *Wnt8* wird in der dorsolateralen Marginalzone exprimiert, die direkt an die Neuralleisten-bildenden Region anschließt und wird ebenfalls für die Induktion benötigt. In *Xenopus* Embryonen wurde gezeigt, dass die Expression von *Wnt8* im paraxialen Mesoderm durch Fgf8 aktiviert wird und somit die Neuralleisteninduktion im darüber liegenden, durch Bmp-Antagonisten spezifizierten, Ektoderm fördert (Hong et al., 2008). Die induktive Wirkung von Wnt wird über den kanonischen Signalweg vermittelt, da eine Überexpression von  $\beta$ -Catenin, sowie den Rezeptoren frizzled 3 und frizzled 7 die Expression von Neuralleistenmarkern, wie *snail2* induzieren kann (Abu-Elmagd et al., 2006; LaBonne and Bronner-Fraser, 1999; Deardorff et al., 2001). Der kanonische Wnt Signalweg wird im anterioren Teil der Neuralplatte durch Dickkopf (Dkk) Proteine inhibiert und trägt somit zur antero-posterioren Musterung des Neuroektoderms bei. Dkk bildet hierbei einen Komplex mit den Rezeptoren LRP5/6 (Density Lipoprotein Receptor 5/6) und Kremen (Kringel Containing Transmembrane Protein). Im posterioren Bereich der Neuralplatte, wo Dkk nicht exprimiert wird, wirkt sich Kremen aktivierend auf den Wnt Signalweg aus und fördert damit die Neuralleisteninduktion (Hassler et al., 2007).

Die Beteiligung von Bmp in der Neuralleisteninduktion erscheint komplexer. Als Konsequenz der Neural-Induktion wird das Ektoderm mittels eines Bmp Gradienten, aufgebaut durch Bmp-Signale aus dem Ektoderm und Bmp-Antagonisten aus dem Mesoderm, in drei Regionen aufgeteilt. Ein hoher Level an Bmp-Aktivität führt zur Bildung von Epidermis, wohingegen die Neuralplatte, die das zentrale Nervensystem bilden wird, durch Bmp-Antagonisten, wie noggin, chordin und follistatin induziert wird. Diese binden direkt an Bmp4 und verhindern damit eine Interaktion mit dessen Rezeptor (Fainsod et al., 1994; Liem et al., 1997; Piccolo et al., 1996; Zimmerman et al., 1996). Dazwischen, bei einer mittleren Konzentration an Bmp, spezifizieren sich die Neuralleisten (Mayor and Aybar, 2001). Für diesen ersten Schritt der Induktion während der Gastrulation wird also eine Aktivierung von Wnt und eine Inhibierung von BMP benötigt. Beide Faktoren werden durch Signale aus der dorsolateralen Marginalzone reguliert. Im Gegensatz dazu ist für die Aufrechterhaltung des Neuralleistencharakters in der Neurula eine Aktivierung von Wnt und BMP

erforderlich, was durch das intermediäre Mesoderm und das benachbarte Ektoderm gesteuert wird (Abb. 1-5).

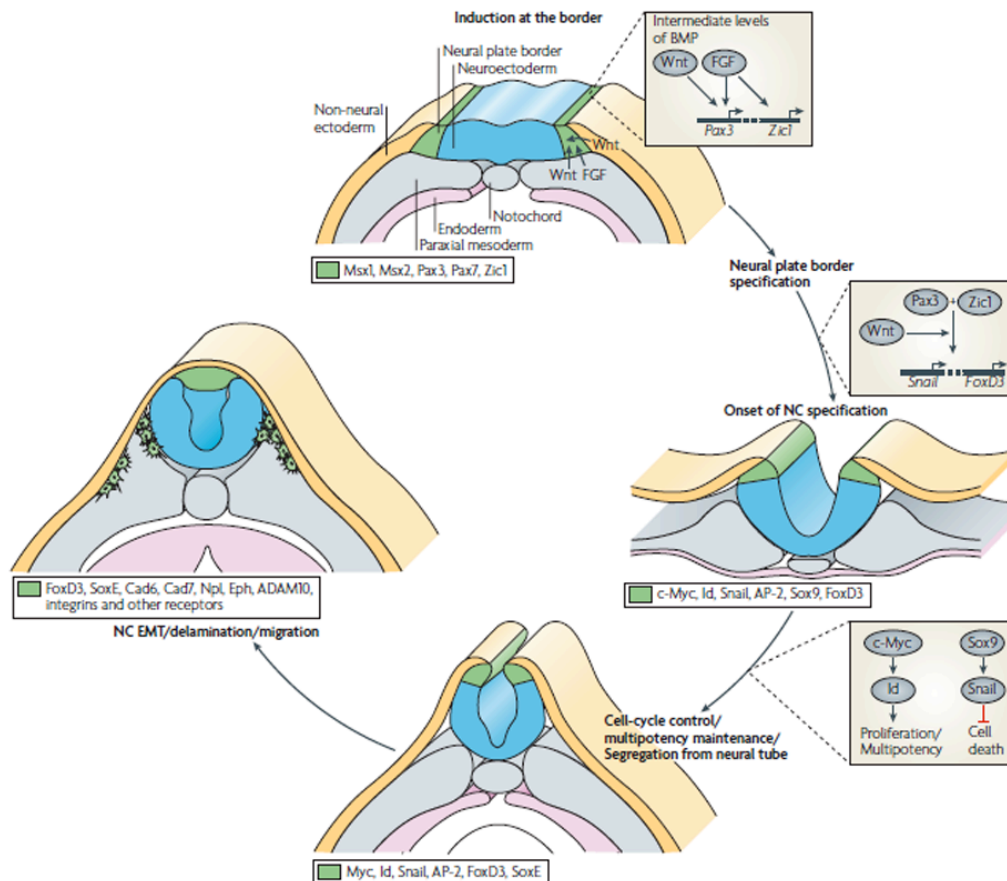


**Abb. 1-5: Modell der Neuralleisteninduktion in zwei Schritten.** (A) Das Diagramm fasst die zeitlich unterschiedlich benötigte Aktivität des Wnt und Bmp Signalweges zusammen. (B) Modell für die Induktion während der Gastrulation und den Schritt der Aufrechterhaltung des Neuralleistencharakters in der Neurula. In der Gastrula werden Wnt-Signale und

Die Neuralleisten-Vorläuferzellen müssen bis zum Schließen des Neuralrohrs in ihrem pluripotenten, undifferenzierten Zustand verbleiben. Dies wird über den Transkriptionsfaktor *hairy2* (Hairy and Enhancer of Split 4) gewährleistet, der den Zellzyklus-Inhibitor *p27* und das neural-spezifisierende *delta-1* hemmt. Solange *hairy2* aktiv ist, erfolgen parallel die Schritte der Neuralplatten-Spezifikation und das Schließen des Neuralrohrs. Erst danach erfolgt die Spezifikation der Neuralleistenzellen, indem *hairy2* durch die Bindung an *id3* (Inhibitor of DNA Binding 3) inaktiviert wird. *Id3* wird durch einen hohen Level an Bmp induziert und führt zur Aktivierung der Neuralleisten-Spezifikatoren (Nichane et al., 2008). Dieser Schritt dient der Aufrechterhaltung des Neuralleistencharakters und der Neuralleistenzellpopulation; *id3*, *sox9* und *sox10* sind als Überlebensfaktoren beschrieben (Cheung et al., 2005; Kee et al., 2005; Light et al., 2005; Sonnenberg-Riethmacher et al., 2001; Southard-Smith et al., 1998).

Für die Spezifikation der NLZ muss zunächst die Neuralplattengrenze festgelegt werden. Bei einem mittleren Level an BMP und aktivem Wnt-Signal werden Spezifikatoren der Neuralplattengrenze, wie *pax3*, *zic1*, *msx1* und *meis3* aktiviert (Abb. 1-6). *Pax3* wird in der Neuralplattengrenze und dem nicht-neuralen Ektoderm exprimiert und führt zur Festlegung der „Hatching gland“, während *zic1* in der Neuralplatte exprimiert wird und zur Ausbildung des präplakodalen Ektoderms führt.

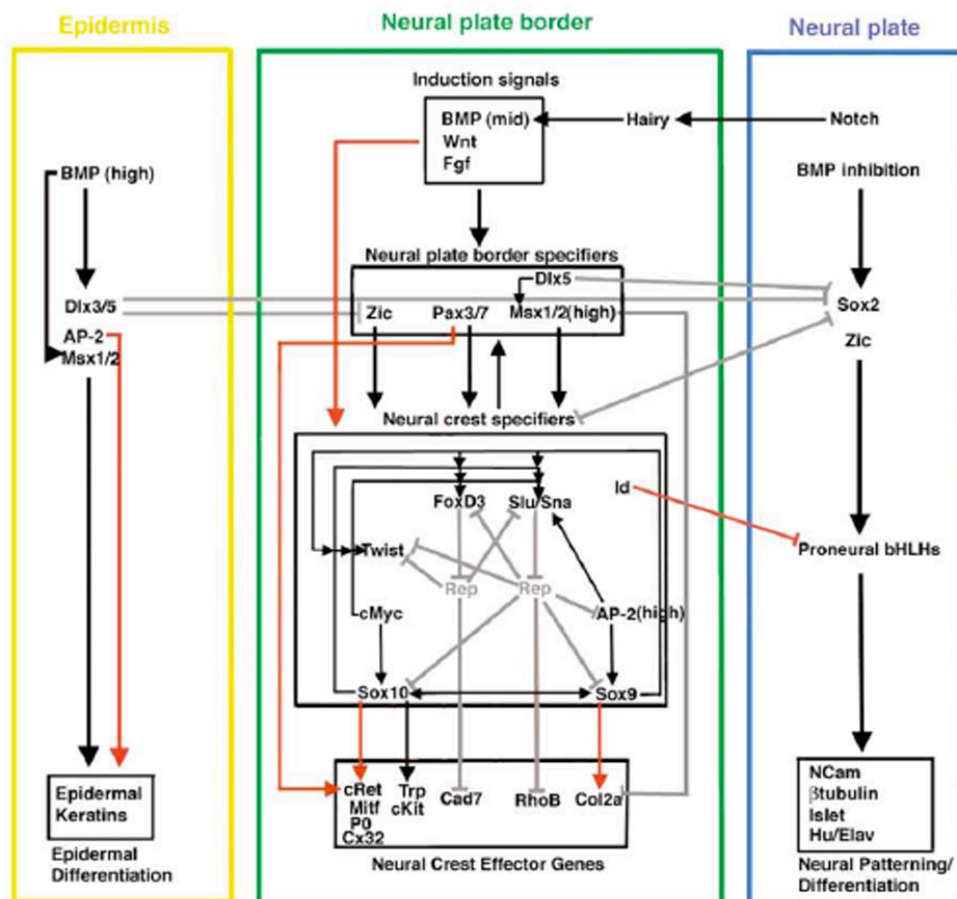
Eine Koexpression von *pax3* und *zic1* führt jedoch zur Spezifikation der Neuralleisten (Hong et al., 2007). Der Transkriptionsfaktor *meis3* wird sowohl für neurales- als auch für Neuralleisten-Schicksal benötigt und wird durch *pax3* und *zic1* reguliert.



**Abb. 1-6: Regulatorische Schritte in der Entwicklung von NLZ.** Die Induktion an der Neuralplattengrenze wird durch Fgf- und Wnt- Signale aus dem Mesoderm und nicht-neuralem Ektoderm aktiviert. Eines oder beide Signale führen bei einem mittleren Level an Bmp zur Expression der Spezifikatoren der Neuralplattengrenze *pax3* und *zic1*, welche wiederum Neuralleisten-Spezifikatoren wie *snail* und *foxD3* in den Neuralfalten aktivieren. Die Aufrechterhaltung der Multipotenz sowie das Überleben der NLZ werden durch *id* bzw. *snail* gewährleistet. Die frühen Neuralleisten-Spezifikatoren kontrollieren die Delamination und den Beginn der EMT. Andere Neuralleisten-Spezifikatoren, wie *foxD3* und *sox10* werden in migrierenden NLZ weiter exprimiert und regulieren die Expression von Effektorgenen, wie Cadherinen, Matrix Metalloproteasen (ADAM10), Integrinen und anderen Transmembranrezeptoren. (Sauka-Spengler and Bronner-Fraser, 2008)

Ein knockdown von *meis3* führte in Neurula Embryonen zu einem Verlust von primären Neuronen und Neuralleisten (Gutkovich et al., 2010). *Msx1* wird durch *Fgf8*

und Wnt aktiviert und kontrolliert die Expression von *pax3* (Monsoro-Burq et al., 2005). Sobald die Neuralplattengrenze etabliert ist, erhalten die zukünftigen NLZ neue Signale von Transkriptionsfaktoren aus der Gruppe der Neuralleisten-Spezifikatoren. Dazu gehören u.a. *snail1/2*, *sox9/10*, *foxD3*, *AP-2*, *twist* und *c-myc* (Abb. 1-6; 1-7). Diese Faktoren vermitteln Veränderungen in den adhäsiven Eigenschaften und der Motilität der NLZ und sind für die EMT verantwortlich. Die Regulation der Neuralleisten-Spezifikatoren ist äußerst komplex, da sie in einer Art „cross talk“ miteinander interagieren, jedoch auch autoregulatorischen Mechanismen unterliegen (Abb. 1-7). *Snail1*, ein transkriptioneller Repressor mit einer Zinkfinger-Domäne und ist eines der ersten Gene, das in den zukünftigen Neuralleisten exprimiert wird und die Transkription des nahe verwandten Gens *snail2* reguliert.



**Abb. 1-7: Netzwerk der Genregulation in der Neuralleistenentwicklung.** Rote Pfeile zeigen nachgewiesene direkte Interaktionen. Schwarze Pfeile deuten Interaktionen an, die durch Funktionsverlust- und -gewinn-Studien in *Xenopus* analysiert wurden. Eine Repression wird durch graue Linien verdeutlicht (Meulemans and Bronner-Fraser, 2004). Dieses Modell ist weder vollständig noch das einzig vertretene.

*Snail2* wiederum reguliert seine eigene Expression und kontrolliert die Transkription von weiteren Neuralleisten-Spezifikatoren, *twist* und *foxD3* (Essex et al., 1993; Mayor et al., 1993).

*FoxD3* wird bereits ab der späten Gastrula ähnlich wie *snail2* exprimiert und eine Überexpression führt zu einer ektopischen Expression von *snail2*, *AP-2* und endogenem *foxD3*. Auch das neurale Markergen *sox2* wird durch *foxD3* induziert (Sasai et al., 2001). Der Transkriptionsfaktor *AP-2* hat eine besondere Stellung in der Neuralleistenentwicklung. Die *AP-2* exprimierende Region ist im Vergleich zu *snail2* weiter nach lateral ausgebreitet. Die Regulation erfolgt ebenfalls durch Bmp-Signale, wobei die Induktion von *AP-2* schon bei einem niedrigeren Level an Bmp in der Epidermis stattfindet. Durch Wnt Signale und der Inhibierung von Bmp wird *AP-2* verstärkt exprimiert und kann *snail2* und *sox9* induzieren, was zu einem positiven Regelkreis zwischen *sox9*, *AP-2* und *snail2* führt. Alle drei Faktoren werden für eine vollständige Induktion der Neuralleisten benötigt (Luo et al., 2003).

In NLZ und Tumorzellen ist die Funktion von *snail1/2* sehr ähnlich, da sie in beiden Fällen für die Einleitung der EMT und die Inhibierung der Apoptose verantwortlich sind. Das gilt für das Protoonkogen *c-myc* nicht. In Tumoren fördert mutiertes *c-myc*, dadurch dass der Eintritt in den Zellzyklus erleichtert wird, das Wachstum und sensibilisiert die Zellen für Apoptose (Herold et al., 2009; Hoffman and Liebermann, 2008; Morrish et al., 2009). In der Neuralleisteninduktion reguliert *c-myc* weder Proliferation noch Apoptose. Es wird ab St. 11/12 in den Neuralplattengrenzen exprimiert und durch Wnt-Signale aktiviert. Die Inhibierung von *c-myc* führt zu dem Verlust der Neuralleistenmarker *snail2*, *twist* und *foxD3* (Bellmeyer et al., 2003).

Die Migration der Neuralleistenzellen wird durch komplexe Mechanismen reguliert. Sie beginnt in St. 19, verläuft wellenartig durch den ganzen Embryo und endet rostral in St. 41 und caudal in St. 46 (Collazo et al., 1993; Mayor et al., 1999). Die Wanderung der NLZ ist nur möglich, wenn die Zellen ihren epithelialen Charakter verlieren und als Mesenchymzellen aus ihrem stabilen Verband in den Neuralfalten ausbrechen. Dazu sind Veränderungen der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen nötig, wobei die Zell-Zell-Adhäsion möglichst verringert und die Zell-Matrix-Adhäsion verstärkt werden sollte. Es werden Komponenten des Aktin-Zytoskeletts, Proteine der extrazellulären Matrix und Transkriptionsfaktoren benötigt, um den Zellen die Fähigkeit zur Migration auf einem bestimmten Substrat zu ermöglichen. *Snail1* fördert die EMT, indem es als Repressor von E-Cadherin fungiert und die Expression von

Fibronectin induziert (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000). Außerdem wirkt snail1 als Repressor für Komponenten der „tight junctions“, wie occludin und claudin-1 (Ohkubo and Ozawa, 2004). Das Startsignal zur Delamination erhalten die Zellen in einem Bmp-abhängigen Mechanismus durch die Aktivierung von Rho (Ras Homolog Gene Family)-abhängigen Proteinen (Liu and Jessel, 1998) oder über den kanonischen Wnt-Signalweg. Dabei muss der Übergang von der G1 in die S-Phase des Zellzyklus gewährleistet sein, da die meisten Neuralleistenzellen während der S-Phase delaminieren (Burstyn-Cohen et al., 2004). Für die Substrat-abhängige Migration der NLZ spielen die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege (planar cell polarity PCP oder Wnt-Ca<sup>2+</sup>) eine große Rolle. Ein entscheidender Faktor ist Wnt11, wobei der Verlust, sowie die Überexpression von Wnt11 zur Blockierung der Migration führen. Der PCP-Signalweg wird zur Stabilisierung von Lamellipodien benötigt und Wnt11 kann vermutlich das Zytoskelett und die Adhäsion von migrierenden Neuralleistenzellen beeinflussen (De Calisto et al., 2005).

Nach Erreichen des Zielortes erfolgt die Differenzierung der Neuralleistenzellen, die von den Milieufaktoren der Umgebung abhängig ist, wobei auch wieder Wachstumsfaktoren wie Bmp und Fgf und andere parakrine Faktoren beteiligt sind.

Induktion, Spezifikation, Migration und Differenzierung der Neuralleistenzellen sind komplexe Prozesse, in denen eine Vielzahl von spezifischen Genen miteinander interagieren, um eine korrekte Entwicklung der Derivate zu gewährleisten. Dabei spielt die zeitliche und räumliche Abstimmung unter den Genen eine entscheidende Rolle.

Da die Depletion von Xphb1 zum Verlust des Neuralleisten-Spezifikators *twist* führt, ist der Einfluss von Xphb1 in der frühen Neuralleistenentwicklung klärungsbedürftig. Wird Xphb1 für die Induktion, die Festlegung der Neuralplatten/Ektodermgrenze oder die Spezifikation der cranialen NLZ benötigt?



## 2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Funktion von prohibitin1 in der Neuralleistenentwicklung von *Xenopus laevis* zu charakterisieren. Das Augenmerk liegt hierbei insbesondere auf der Einordnung von Xphb1 in die hierarchisch gegliederte Regulationskaskade der Neuralleistenentwicklung, aber auch auf der Aufklärung des molekularen Mechanismus. Durch Funktionsverlust-Studien sowie epistatische Experimente soll mittels Ganzkeimfärbungen und real-time PCR Analysen der Einfluss einer Xphb1 Depletion auf verschiedene Neuralleistengene untersucht werden. Prohibitin1 ist als Mediator von Zellproliferation und Apoptose bekannt, weshalb geklärt werden soll, ob Xphb1 in Neuralleistenzellen diese Funktion ebenfalls ausübt.

Zur Analyse der Struktur-Funktions-Beziehung sollen verschiedene Deletionsmutanten von Xphb1 hergestellt werden und mittels Rekonstitutionsversuchen auf ihre Funktion in der Neuralleistenentwicklung untersucht werden. Außerdem soll durch Immunfärbungen an Explantaten die subzelluläre Lokalisation von Xphb1 in cranialen Neuralleistenzellen charakterisiert werden und in Zusammenhang mit der Funktion gebracht werden.

Prohibitin1 besitzt Interaktionsdomänen für Zellzyklusregulatoren wie E2F1 und Rb, weshalb ein regulatorischer Mechanismus zwischen den Transkriptionsfaktoren und Xphb1 in der Neuralleistenentwicklung analysiert werden soll.

### 3 Materialien

#### Antikörper

- AP-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG (Dianova, Hamburg)
- AP-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG (Dianova, Hamburg)
- Cy<sup>™</sup>-3-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG (Dianova, Hamburg)
- Cy<sup>™</sup>-2-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG (Dianova, Hamburg)
- Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments (Roche Applied Science, Mannheim)
- Anti-myc 9E10 (Maus) (Zellkulturüberstand)
- Anti-prohibitin (Kaninchen) (Abcam, Cambridge, GB)
- Anti-phospho-Histon H3 (Kaninchen) (Millipore, Temecula, USA)
- Anti-β-Catenin, 7D12 (Maus) (Ralph Rupp, München)
- Streptavidin Alkaline Phosphatase (Promega, Mannheim)

#### Enzyme

- SP6, T7, T3 RNA-Polymerase (Roche Applied Science, Mannheim)
- DNase I, RNase frei (Roche Applied Science, Mannheim)
- Proteinase K (Merck, Darmstadt)
- RNase Inhibitor (Promega, Mannheim)
- RNase A (Fermentas, St. Leon-Rot)
- Restriktionsendonukleasen (Promega, Mannheim)
- Go-Taq DNA-Polymerase (Promega, Mannheim)
- M-MLV Reverse Transkriptase (Promega, Mannheim)
- T4 DNA-Ligase (Promega, Mannheim)

#### Bakterien

- NEB 5-Alpha (New England Biolabs, Frankfurt/Main)  
Genotyp: *fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44Φ80Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*

#### Primer zur Klonierung

- Xphb1\_fwd 5' GGA TCC ATG GCA GCA CGA CTG TTA GAG AC 3'
- Xphb1\_rev 5' GCT AGC TTG TGG CAG CTG TAA TAA CGT CGA C 3'
- Xphb2\_fwd 5' ACT TCC GGT GTC CTT CTT CTA 3'
- Xphb2\_rev 5' AAC AAA GGG AAG TAC TTG GAG A 3'

- Xphb1ΔNterm\_fwd 5' GGA TCC ATG AGA GTC CTG CCC TCC ATT AC 3'
- Xphb1ΔNterm\_rev 5' GCT AGC TTG TGG CAG CTG TAA TAA CGT CGA C 3'
- Xphb1ΔRaf\_fwd 5' GGA TCC ATG GCA GCA CGA CTG TTA GAG AC 3'
- Xphb1ΔRaf\_rev 5' GCT AGC TTC CAG TTT GCG CAG CTC GAT G 3'
- Xphb1ΔCterm\_fwd 5' GGA TCC ATG GCA GCA CGA CTG TTA GAG AC 3'
- Xphb1ΔCterm\_rev 5' GCT AGC CTG TTT GGC TTC TAC GGC CTC 3'
- Xphb1ΔTM\_fwd 5' GGA TCC ATG GAC GCT GGA CAC AAC GCA 3'
- Xphb1ΔTM\_rev 5' GCT AGC TTG TGG CAG CTG TAA TAA CGT CGA C 3'

### Primer zur Amplifikation spezifischer DNA Fragmente

- Xphb1\_fwd 5' GAT GCA GGC GAG CTA ATC AC 3'
- Xphb1\_rev 5' GGC CTC CGT GAA CTC CTT AC 3'
- twist\_fwd 5' CTC AGT GAA GCG CAA CAA GA 3'
- twist\_rev 5' CTC TGA CGC TCC CTG ACA TT 3'
- snail2\_fwd 5' ACC TGC AGA CCC ATT CTG AT 3'
- snail2\_rev 5' CAC AGC AAC CAG ATT CCT CAT 3'
- snail1\_fwd 5'-GGC ACC AGT TAT TGC CTT TC-3'
- snail1\_rev 5'-TGT TGT TCC ATC CAC CTG TC-3'
- AP-2\_fwd 5'-GAA GAC GTA TCG CAC GTT GA-3'
- AP-2\_rev 5'-GGA CGA CAC CGC ATT GTT AT-3'
- c-myc\_fwd 5'-TTC CCA TTC ACC AAC ACA ACT-3'
- c-myc\_rev 5'-GAC CCG GAT GTT GCT TTC TA-3'
- Trp2\_fwd 5'-TGT TAC TTG GGT TAC C-3'
- Trp2\_rev 5'-GCA CTT ATC ACG GGT C-3'
- ODC\_fwd 5' CAT TGC AGA GCC TGG GAG ATA 3'
- ODC\_rev 5' TCC ACT TTG CTC ATT CAC CAT AAC 3'

Alle primer wurden über die Firma biomers.net GmbH, Ulm bezogen.

### Konstrukte zur Herstellung Digoxigenin markierter anti-sense RNA als *in situ* Sonde

- |           | linearisiert | transkribiert |                                   |
|-----------|--------------|---------------|-----------------------------------|
| • Xphb1:  |              |               | (M. Schneider, Diplomarbeit 2007) |
| antisense | <i>NotI</i>  | T7            |                                   |
| sense     | <i>SphI</i>  | SP6           |                                   |
| • twist   | <i>Xba</i>   | T7            | (von M. Sargen, London, GB)       |
| • snail1  | <i>BglII</i> | SP6           | (von M. Sargen, London, GB)       |
| • snail2  | <i>BglII</i> | SP6           | (von M. Sargen, London, GB)       |

## Materialien

- foxD3 *BamHI* T7 (von D. Kessler, Philadelphia, USA)
- c-myc *Apal* SP6 (von K. Henningfeld, Göttingen)
- AP-2 *HindIII* T7 (von A. Borchers, Ulm)
- zic3 *EcoRI* T7 (von N. Ueno, Okazaki, Japan)
- pax3 *Sall* T7 (von K. Koebernick, Homburg)
- meis3 *EcoRI* T7 (von T. Pieler, Göttingen)
- sox2 *EcoRI* T7 (von E. de Robertis, Los Angeles, USA)
- sox10 *EcoRI* T3 (von JP. Saint-Jeannet, Philadelphia, USA)
- Xk81A1 *EcoRI* SP6 (von R. Mayor, London, GB)
- Xbra *EcoRI* T7 (von M. Kühl, Ulm)
- Chordin *EcoRI* T7 (von E. de Robertis, Los Angeles, USA)

### Konstrukte zur RNA/DNA Injektion

Plasmid:

- Xphb1 in pCS2+myc                      amplifiziert mit den Primern Xphb1\_fwd + rev aus Xphb1 pCS2+, über die Schnittstellen *BamHI/NheI* in pCS2+myc ligiert.
- Xphb1 $\Delta$ N-term in pCS2+myc              amplifiziert mit den Primern Xphb1 $\Delta$ Nterm\_fwd + rev aus Xphb1 pCS2+, über die Schnittstellen *BamHI/NheI* in pCS2+myc ligiert.
- Xphb1 $\Delta$ Raf-1 in pCS2+myc                amplifiziert mit den Primern Xphb1 $\Delta$ Raf\_fwd + rev aus Xphb1 pCS2+, über die Schnittstellen *BamHI/NheI* in pCS2+myc ligiert.
- Xphb1 $\Delta$ C-term in pCS2+myc                amplifiziert mit den Primern Xphb1 $\Delta$ Cterm\_fwd + rev aus Xphb1 pCS2+, über die Schnittstellen *BamHI/NheI* in pCS2+myc ligiert.
- Xphb1 $\Delta$ TM in pCS2+myc                    amplifiziert mit den Primern Xphb1 $\Delta$ TM\_fwd + rev aus Xphb1 pCS2+, über die Schnittstellen *BamHI/NheI* in pCS2+myc ligiert.
- Xphb2 in pGEM-T                            (M. Schneider, Diplomarbeit 2007)
- Hphb1 in pcDNA3                            (von T. Rudel, Berlin)
- Hphb1 $\Delta$ \_116-275 in pCS2+                (in pCRII, von S. Chellappan, New York, USA; über die Schnittstellen *BamHI/EcoRI* in pCS2+ ligiert)
- Hphb1 $\Delta$ 185-214 in pCS2+                (in pCRII, von S. Chellappan, New York, USA; über die Schnittstellen *BamHI/EcoRI* in pCS2+ ligiert)

## Materialien

Gal4-DBD-E2F1 in pFA-CMV (von S. Chellappan, New York, USA)  
pFR-LUC *trans* Reporter plasmid (von S. Chellappan, New York, USA bzw. Agilent Technologies, CA, USA)

### Morpholinos

Alle Morpholinos wurden über Gene Tools, LLC, USA bezogen.

- phb1 Morpholino 5' ATC CCT GTT CTT CCA CAC GGC TAA T 3'
- c-myc Morpholino 5' TGG GAA AAT TGG CGT TAA GAG GCA T 3'  
(Bellmeyer et al., 2003)
- XE2F3 Morpholino 5' GGC CAC CCT GGA ATC CTT TTC TCA T 3'

### Kits

- pGEM-T Vector Systems (Promega, Mannheim)
- mMESSAGE mMACHINE™ (Ambion, Austin, USA)
- Fluorescein/Digoxigenin RNA-Labeling Kit (Roche Applied Science, Mannheim)
- Nucleobond XtraMidi (Macherey Nagel, Düren)
- High Pure RNA Isolation Kit (Roche Applied Science, Mannheim)
- High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Applied Science, Mannheim)
- High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science, Mannheim)
- TnT® T7/SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega, Mannheim)
- Transcend™ Colorimetric Non-Radioactive Translation Detection System (Promega, Mannheim)
- BCA Protein Assay Kit (Novagen/Merck, Darmstadt)

### 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. (Karslsruhe) oder Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen).

- 2Log DNA Marker (New England Biolabs, Frankfurt/Main)
- <sup>35</sup>S-Methionin (GE Healthcare, Buckinghamshire, GB)
- Agarose (Serva, Heidelberg)
- ATP-Dinitriumsalz (Roche Applied Science, Mannheim)

## Materialien

- Beetle Luciferin, Potassium Salt (Promega, Mannheim)
- Complete, EDTA-freie Protease Inhibitor Cocktail Tabletten (Roche Applied Science, Mannheim)
- Desoxyribonucleotide (Promega, Mannheim)
- Dextran-FITC (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Dig-11-dUTP (Roche Applied Science, Mannheim)
- Dig RNA Labelling Mix (Roche Applied Science, Mannheim)
- DTT (Dithiothreitol) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- iQ SYBR Green Supermix (BioRad, Hercules, USA)
- Magermilchpulver (Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell)
- MitoTracker® Deep Red FM (Molecular Probes, Oregon, USA)
- Natriumdodecylsulfat (SDS) (Serva, Heidelberg)
- PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot)
- Pferdeserum (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- TdT, recombinant (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

## Lösungen

Alle Lösungen wurden entweder autoklaviert oder aus sterilen Stammlösungen und A. bidest. bzw. DEPC-(Diethyl-Pyrocbonat)-H<sub>2</sub>O angesetzt. Bei der Verwendung nicht autoklavierbarer Chemikalien wie z.B. Methanol, Glucose, Tween 20 wurden die Lösungen, wenn nötig, durch Sterilfiltration ( $\varnothing$  0,2 $\mu$ m) entkeimt.

**Alzianblau-Beschichtungslösung:** 1% (w/v) Alzianblau, 1% (v/v) Essigsäure

**Alzianblau-Färbelösung:** 40 mg Alzian-Blau in 35 ml 100% (v/v) Ethanol und 15 ml Essigsäure lösen.

**Ampicillin-Stammlösung:** 100  $\mu$ g/ml, 1:1000 in LB (Luria-Bertani)-Medium

**APBS:** 2,7 mM KCl, 0,15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 103 mM NaCl, 0,7 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,5

**APS:** 10% (w/v) Ammoniumpersulfat in H<sub>2</sub>O

**Cysteinlösung:** 2% Cystein in 0,1 MBSH, pH 8,2 mit NaOH

**Coomassie-Färbelösung:** 4 g CBB R250, 100 ml Essigsäure, 450 ml Methanol auf 1 l H<sub>2</sub>O

**Coomassie-Entfärbelösung:** 45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure

**Danilchick's Puffer:** 53 mM NaCl, 15 mM NaHCO<sub>3</sub>, 13,5 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 4,5 mM K-Gluconat, 5 mM Bicin, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>. Zunächst mit 1 M HEPES

(2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure) pH-Wert 8,3 einstellen und anschließend CaCl<sub>2</sub> und MgSO<sub>4</sub> dazugeben. Der Puffer wird nicht autoklaviert.

**DAPI-Kernfärbelösung:** Stammlösung 1mg/ml in DMF, Gebrauchslösung 1:1000 in APBS

**Dissoziationspuffer:** 50,3 mM NaCl, 0,67 mM KCl, 18,42 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,85 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,38 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,8 mM EDTA, pH 7,3

**in situ Alkalische Phosphatase Puffer:** 0,1 M Tris-HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Tween 20

**in situ Blockierlösung:** 2% BMB in 1x MAB

**in situ Denhardt's (50x):** 1% BSA, 1% Polyvinylpyrrolidon, 1% Ficoll

**in situ Färbelösung:** 1,5 µl NBT, 1,5 µl BCIP auf 1 ml AP-Puffer

**in situ Heparin-Lösung:** 100 mg/ml in DEPC-H<sub>2</sub>O

**in situ Hybridisierungspuffer (50 ml):** 25 ml Formamid, 12,5 ml 20x SSC, 1 ml 50 mg/ml Torula RNA, 50 µl 100 mg/ml Heparin, 1 ml 50x Denhardt's, 500 µl 10% Tween 20, 500 µl 10% CHAPS, 500 µl 0,5 M EDTA

**in situ SSC (20%):** 300 mM Na-Citrat pH 7,0; 300 mM NaCl

**in situ Waschlösung1:** 50% Formamid, 2x SSC, 0,1% Tween 20

**in situ Waschlösung2:** 25% Formamid, 2x SSC, 0,1% Tween 20

**in situ Waschlösung3:** 12,5% Formamid, 2x SSC, 0,1% Tween 20

**in situ Waschlösung4:** 2x SSC, 0,1% Tween 20

**in situ Waschlösung5:** 0,2x SSC, 0,1% Tween 20

**LAP-Puffer:** 10 ml Tris (0,5 M, pH 6,8), 6 ml SDS (10%), 30 ml Glycerol, 15 ml β-Mercaptoethanol, 1,8 ml Bromphenolblau auf 100 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen

**LB/Antibiotika-Platten:** 1,5% Agar in 1x LB-Medium, Antibiotikum 1:1000

**LB-Medium (5x):** 5% Trypton, 2,5 % Hefeextrakt, 5% NaCl, mit A. dest. auf 1l auffüllen, pH 7,5 mit NaOH, autoklavieren

**Luciferase-Reagenz:** 2,12 mg CoenzymA-Trilithiumsalz-Dihydrat, 1,32 mg Luciferin, 2,92 mg ATP-Dinatriumsalz in 10 ml LuziAssay-Puffer

**LuziAssay-Puffer:** 33,3 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 1,07 mM MgCO<sub>3</sub>·Mg(OH)<sub>2</sub>·5H<sub>2</sub>O, 2,65 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Tricin, pH 7,8

**LuziLyse Puffer:** 25 mM Tris/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,8, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 10% Glycerin, 1% TritonX-100

**MAB (5x):** 0,5 M Maleinsäure, 0,75 M NaCl, pH 7,5

**MBSH (10x):** 880 mM NaCl, 200 mM HEPES, 100 mM KCl, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 4 mM CaCl<sub>2</sub>, 3,3 mM CaNO<sub>3</sub>, pH 7,4

**MEM (1x):** 100 mM MOPS pH 7,4, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO<sub>4</sub>

**MEMFA:** 3,7% (v/v) Formaldehyd in 1x MEM (Modified Eagle's Medium)

**Mowiol:** 6,0 g Glycerin, 2,4 g Mowiol 4-88, 6,0 ml A. dest, 12,0 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5), 25 mg DABCO pro ml Lösung

**Nile-Blau-Färbelösung:** 0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 g Nile Blue (Chlorid) auf 1 l H<sub>2</sub>O

**NOP-Puffer:** 100 µl NOP (1 ml 1 M HEPES / KOH pH 7,4, 3 ml 5 M NaCl, 400 µl 0,5 M EDTA, 10 ml 10 % (w/v) NP40 für 100 ml Lösung), 10 µl 10x Complete , 5 µl 100 mM Vanadat, 1 µl 500 mM Natrium-Fluorid

**Orange G-Ladepuffer (5x):** 4 g Saccharose, 0,025 g Orange G auf 10 ml H<sub>2</sub>O

**PBS (10x):** 1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 65 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,5

**PTW:** 1x PBS, 0,1% Tween 20

**SDS-Ladepuffer (5x):** 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 10 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v) β-Mercaptopropandiol, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau

**SDS-Laufpuffer (10x):** 1% (w/v) SDS, 250 mM Tris, 1,92 M Glycin

**SOC-Medium:** 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glucose zu SOB-Medium geben

**TAE (50x):** 2 M Tris-Base, 1 M Essigsäure, 0,1 M EDTA, pH 8,3

**TBS (10x):** 25 mM Tris-HCl pH 7,4, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>

**TBST:** 1x TBS, 0,1% Tween 20

**β-Galaktosidase-Färbelösung:** 47 ml 1x PBS, 1 ml X-Gal in DMSO (50 mg/ml), 0,5 ml K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>III (500 mM), 0,5 ml K<sub>2</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>II (500 mM), 1 ml MgCl<sub>2</sub> (100 mM)

**β-Galaktosidase-Assay-Mix:** 3,6 µl 100x Mg-Lösung (0,1 M MgCl<sub>2</sub>, 4,5 M β-Mercaptoethanol), 79,2 µl ONPG-Substrat (4 mg/ml ONPG in 0,1 M NaPhosphat-Puffer, pH 7,5), 217,2 µl 0,1 M NaPhosphat-Puffer (0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, pH 7,5) mit A.bidest auf 300 µl auffüllen

### Zelllinien, Zellkulturverbrauchsmaterialien und Medien

Für die Immunfärbung wurden HEK293 (human embryonic kidney)-Zellen eingesetzt.

- DMEM Kompletmedium:  
10% FCS, 1% Pen/Strep in DMEM
- Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM (PAA Laboratories, Cölbe)
- Fötale Kälberserum (FCS) (Gibco® Invitrogen, Darmstadt)
- Gewebekulturflaschen (Greiner bio-one, Frickenhausen)
- Penicillin/Streptomycin (100x) (PAA Laboratories, Cölbe)
- TC-Platten, 6-well, steril (Greiner bio-one, Frickenhausen)
- TransPass™ COS-7/293 Transfektionsreagenz (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)
- Trypsin-EDTA (1x) (PAA Laboratories, Cölbe)

### Geräte

- Binokular Leica L2 und Leica S6E (Leica Mikrosysteme, Bensheim)



## Materialien

- Brutschrank, APT LineSerieBD/ED/FD (Binder, Tuttlingen)
- Digitalkamera Retiga Color 12 bit (QImaging, Burnaby, Kanada)
- Digitalkamera C4742-95-12 ERG (Hamamatsu, Herrsching)
- Feinwaage (Sartorius, Göttingen)
- Flachbettgelelektrophoresekamern (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Fluoreszenzbinokular Leica S8AP0 (Leica Mikrosysteme, Bensheim)
- Fluoreszenzmikroskop DMIRE2 und CTR MIC (Leica Mikrosysteme, Bensheim)
- Geldokumentationsanlage „Gel Max“ (Intas, Göttingen)
- Konfokales Mikroskop LSM510 (Zeiss, Jena)
- Kühlbrutschränke:
  - BK-600 (Kendro, Langenselbold)
  - MIR 254 (Sanyo, München)
- Luminometer Lumat LB 9507 (Berthold Technologies, Bad Wildbad)
- Magnetrührer, MR 3002 (Heidolph, Nürnberg)
- Micropipette Puller Model P-97 (Sutter Instruments, Novato, USA)
- Microwelle, R-2J28 (Sharp Electronics, Hamburg)
- Microinjektionsanlage (H. Saur Laborbedarf, Reutlingen)
  - Kaltlichtquelle, Fiber Optic Light Source EK-1 (Euromex)
  - Membranpumpe MZ2 (Vacuubrand)
  - Pneumatische Picopumpe PV 820
  - Stereomikroskop MIC 1630 ZS (Euromex)
- PAGE-Apparatur, Mini Protean II™ und Blotapparatur, Mini Trans Blot (BioRad, Hercules, USA)
- PCR-Cycler iCycler (BioRad, Hercules, USA)
- PCR/UV Work station, Cleanspot (Coy, Michigan, USA)
- pH-Meter (WTW, Weilheim)
- Phosphoimager BAS 1500 (Fuji, Japan)
- Photometer:
  - Bio-Photometer (Eppendorf, Hamburg)
  - Ultrospec 2100 pro (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Schüttelinkubator, Orbital Shaker (Thermo Forma, Marietta, USA)
- SemiDry Blotkammer (BioRad, Hercules, USA)
- Spannungsquelle 200/2,0 Power Supply (BioRad, Hercules, USA)
- Sterilwerkbank:
  - Microflow advanced safety cabinet class 2 (Nunc, Langenselbold)

## Materialien

- Software
  - ApE v1.12 (Freeware von M. Wayne Davis, USA)
  - Openlab 4.0.3 und 5.5.0 (Openlab, Heidelberg)
  - LSM Image Browser Version 4.2.0.121 (Zeiss, Jena)
- Vibratom Leica VT 1000 S (Leica, Bensheim)
- Vortex Reax Control (Heidolph, Nürnberg)
- Wasserbäder:
  - Memmert (Schwabach)
  - WB12 (Medingen GmbH, Dresden)
- Zellkulturinkubator Steri-Cycle CO<sub>2</sub> Incubator (Thermo Forma, Dreieich)
- Zentrifugen
  - Biofuge fresco (Kendro, Langenselbold)
  - Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg)
  - Multifuge 3 S-R (Thermo Scientific, Karlsruhe)

## 4 Methoden

### 4.1 Entwicklungsbiologische Methoden

#### 4.1.1 Tierhaltung

Die Haltung von adulten *Xenopus laevis* erfolgt nach Geschlechtern getrennt in 50 Liter fassenden Aquarien bei einer Wassertemperatur zwischen 18°C und 20°C. Die Beleuchtungsdauer ist über einen automatischen Tag-Nacht-Rhythmus auf 14 Stunden eingestellt. Das Aquarienwasser wird mit Hilfe eines Bakterienfilters und durch UV-Bestrahlung entkeimt. Die Nahrung besteht aus Fertigfutter in Form von Presslingen und zusätzlich einmal wöchentlich klein geschnittenem Rinderherz. Alle Tiere eines Beckens werden nacheinander zur Eiablage gebracht. Nach der Eiablage werden die Weibchen über Nacht in einem Salzwasserbad aus 30 g Meersalz in zehn Liter Wasser gehalten, um Hautreizungen und Infektionen möglichst gering zu halten.

#### 4.1.2 Eiablage und Testisextraktion

Die Eireifung bei adulten weiblichen *Xenopus laevis* wird durch Injektion von humanem Choriongonadotropin angeregt. Für eine Eiablage nach 14-16 Stunden werden 600 Einheiten subkutan in den Lymphsack injiziert. Soll die Ablage nach 20-22 Stunden erfolgen, injiziert man zunächst 50 Einheiten und 6-8 Stunden vor der gewünschten Eiablage nochmals 600 Einheiten. Von jedem Weibchen sollten an einem Tag nicht mehr als vier Gelege, in einem stündlichen Rhythmus gewonnen werden. Nach der Ablage sollten mindesten drei Monate Ruhezeit folgen. Mit Hilfe einer sanften Massage der Lendengegend wird das Weibchen zur Eiablage angeregt. Die aus der Kloake austretenden Eier werden in einer Petrischale aufgefangen und darin befruchtet.

Zur Testisextraktion werden die Männchen zunächst in einer kalten 0,25% (v/v) Aminobenzoesäure-Ethylester-Lösung betäubt. Nach ca. 30 Minuten kann das Tier schmerzfrei durch Durchtrennen der Halswirbelsäule getötet werden. Danach wird die Bauchdecke durch einen medianen Schnitt geöffnet und die Hoden, welche im dorsalen Fettgewebe ventral der Nieren liegen, entnommen. Die Hoden können für ca. fünf Tage in 1x MBSH bei 4°C gelagert werden.

#### 4.1.3 *In vitro* Fertilisation

Durch *in vitro* Fertilisation wird eine kontrollierte und gleichmäßige Entwicklung möglichst vieler Embryonen gewährleistet. Dazu wird bei Bedarf ein kleiner Teil des Hoden mazeriert und diese Suspension wird 1:10 mit sterilem A. bidest. verdünnt wobei die Spermien mobil

werden. Nach ca. 20 Minuten äußert sich eine erfolgreiche Befruchtung durch die Drehung der Eier mit der dunklen, animalen Seite nach oben, da sich im vegetalen Pol der schwere Dotter befindet.

### **4.1.4 Entfernen der Gallerthülle und Färbung mit Nile-Blau**

Eine Stunde nach der Befruchtung wird das Gelege für einige Minuten in einer 2%igen Cysteinlösung (pH 8,2) geschwenkt, um die Gallerthülle zu entfernen. Haften keine Zygoten mehr aneinander, werden sie zum Auswaschen der Cysteinlösung mehrmals mit 0,1x MBSH gewaschen. Werden Eier von Albino Fröschen verwendet folgt nach der Cysteinisierung ein Färbeschritt mit Nile-Blau. Dadurch werden die pigmentfreien Zellen der Embryonen für weitere Versuche sichtbar gemacht. Nach ca. fünf Minuten Inkubation in der Nile-Blau Färbelösung werden die gefärbten Eier mit 0,1x MBSH gespült.

### **4.1.5 Mikroinjektion**

Durch Mikroinjektion können Funktionsgewinn- und -verlust-Studien an Embryonen durchgeführt werden, indem eine definierte Menge an mRNA bzw. DNA oder Morpholino-Oligonukleotide in einen bestimmten Bereich injiziert wird. Eine mechanisch ausgezogene Glaskapillare dient als Nadel und kann mit Hilfe eines Eichgitters kalibriert werden. Mit Hilfe von N<sub>2</sub>-Gasdruck wird nach der Eichung ein Injektionsvolumen von 4 nl appliziert.

Bei Embryonen die in einer Ganzkeimfärbung analysiert werden, wird animal in eine Blastomere eines Embryos im 2-Zell Stadium injiziert. Durch die Teilungsebene sind die zukünftigen Körperhälften entlang des Medians getrennt. Werden die Embryonen in einer RT-PCR oder auf Proteinebene untersucht, wird dagegen in beide Blastomere injiziert. Erfolgt die Analyse in einer real-time PCR werden die Embryonen im 4-Zell Stadium in die beiden dorsalen Blastomeren injiziert, die man von den ventralen unterscheiden kann, da sie kleiner und heller pigmentiert sind.

### **4.1.6 Embryonenpflege und Fixierung**

Injizierte Embryonen werden bei ca. 16°C in 0,1x MBSH kultiviert. Die Entwicklungsgeschwindigkeit der Embryonen ist temperaturabhängig und kann durch eine niedrigere Temperatur verlangsamt bzw. einer höheren Temperatur beschleunigt werden. Das Kulturmedium sollte jeden Tag gewechselt werden. Die Einteilung der Entwicklungsstadien erfolgt nach Nieuwkoop und Faber (1967). Haben die Embryonen das gewünschte Stadium erreicht, werden sie entweder eine Stunde in MEMFA fixiert und danach in 100% Ethanol bei -20°C gelagert oder mittels flüssigem Stickstoff für eine RNA- bzw. Proteinextraktion schockgefroren und bei -80°C gelagert. Embryonen, die in einer Ganzkeimfärbung analysiert werden, dürfen nur 30 Minuten in MEMFA fixiert werden. Darauf

folgt eine  $\beta$ -Galaktosidase Färbung und ein weiterer Fixierungsschritt für 30 Minuten in MEMFA, worauf sie ebenfalls in 100% Ethanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### 4.1.7 Gensuppression mittels *antisense* Morpholino Injektion

Für die gezielte Suppression von Genen werden Morpholino-Oligonukleotide verwendet. Morpholinos sind so konstruiert, dass sie im Bereich des 5'UTR bzw. des Start-Codons an die Zielsequenz der endogenen mRNA binden und somit deren Translation verhindern. Sie sind strukturell ähnlich den Nukleinsäuren aufgebaut, besitzen jedoch anstatt einer Ribose oder Desoxyribose einen heterozyklischen Morpholinring. Ein großer Vorteil der Gensuppression mittels Morpholino ist deren hohe Bindespezifität und Stabilität. Morpholinos können nicht von endogenen Nukleasen abgebaut werden. Desweiteren ist das Rückgrat durch eine Amidatgruppe ungeladen und kann somit schwerer Reaktionen mit Kofaktoren eingehen. Da die Gene mit dieser Technik nicht vollständig ausgeschaltet werden spricht man hier von einem Knockdown. Durch die fortschreitende Zellteilung wird die Konzentration des injizierten Morpholinos stetig verdünnt, sodass das Gen nur zeitweise reprimiert werden kann.

### 4.1.8 $\beta$ -Galaktosidase Färbung

Für weitere Versuche ist eine Injektionskontrolle nötig. Um die injizierte Stelle an einem Embryo sichtbar zu machen, wird zusätzlich zur mRNA bzw. dem Morpholino  $\beta$ -Galaktosidase DNA (50 pg) ko-injiziert. Haben die Embryonen das gewünschte Stadium erreicht, werden sie nach der Fixierung in MEMFA dreimal in 1x PBS gewaschen und anschließend für 30 Minuten in der  $\beta$ -Galaktosidase Färbelösung bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach wird die Färbung bei RT fortgesetzt und nach Erreichen der gewünschten Farbintensität wiederum in 1x PBS gewaschen und weitere 30 Minuten in MEMFA fixiert. Als Substrat für die  $\beta$ -Galaktosidase enthält die Färbelösung X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid), welches zu einem stabilen blauen Farbstoff umgesetzt wird und im Embryo als gepunktete blaue Färbung sichtbar wird.

### 4.1.9 Ganzkeimfärbung - Whole mount *in situ* Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung ist eine Methode zur Lokalisation von mRNA in Zellen von Geweben oder ganzen Organismen (Ganzkeimfärbung) durch Hybridisierung einer markierten RNA-Sonde mit der endogenen Zielsequenz. Dadurch kann die räumliche und zeitliche Aktivität eines oder mehrere Gene gezielt am ganzen Embryo beobachtet werden. Die Sonde besteht aus der komplementären Nukleotid-Sequenz und wird durch *in vitro* Transkription linearisierter Plasmid DNA hergestellt. Dabei wird die Sonde mit Digoxigenin oder Fluorescein markiert, welches mit dem C5-Atom der Uridinbase verbunden ist. Die

Detektion erfolgt über ein spezifisches Antikörper/Enzym-Konjugat, zum Beispiel anti-Dig-AP. Die alkalische Phosphatase (AP) setzt in einer Färbereaktion die Substrate NBT und BCIP zu einem blauen Präzipitat um. Alternativ kann BCIP alleine als AP-Substrat verwendet werden. Andere Substrate, wie BMPurple oder FastRed, werden in einer violetten bzw. roten Färbereaktion umgesetzt. Die ISH erfolgte leicht modifiziert wie in der Literatur beschrieben (Harland, 1991). Die Embryonen werden dafür in Schraubdeckelgläser überführt. Nach der Rehydratisierung über eine absteigende Ethanolreihe werden die Embryonen in PTW gewaschen und permeabilisiert. Die Prähybridisierung dient der Blockierung unspezifischer Bindestellen für die RNA-Sonden. Vor Zugabe der Sonde, wird sie in Hybridisierungspuffer aufgenommen und fünf Minuten bei 85°C inkubiert, um mögliche Sekundärstrukturen aufzutrennen. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 60°C. Die Sonde kann am nächsten Tag abgenommen und für eine Weiterverwendung bei -20°C gelagert werden. Danach werden die Embryonen in den Waschlösungen 1-4 jeweils für 10 Minuten und in Waschlösung 5 für 30 Minuten bei 60°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PTW und 1xMAB wird für zwei Stunden Blockierungspuffer zugegeben. Dieser enthält BMB und blockiert unspezifische Bindestellen für den Antikörper. Der anti-Dig-AP Antikörper (1:3000) wird bei RT für vier Stunden auf die Embryonen gegeben. Über Nacht werden sie in 50 ml Röhrchen bei 4°C gewaschen und am nächsten Tag in den Alkalische-Phosphatase-Puffer überführt. Die Färbung erfolgt in kleinen Petrischalen in je 1 ml Färbelösung im Dunkeln bei 4°C. Zur Vermeidung unspezifischer Hintergrundfärbung wird die Färbelösung auf Verfärbung kontrolliert und gegebenenfalls mehrmals gewechselt. Um die Reaktion zu stoppen, werden die Embryonen mehrmals in A. bidest. gewaschen. Unspezifische Farbstoffablagerungen können durch wiederholtes Einwirken in 100% Methanol ausgewaschen werden. Danach werden sie über eine absteigende Methanolreihe in MEMFA überführt und ein bis zwei Stunden nachfixiert. Die gefärbten Embryonen können in 20% Ethanol bei 4°C längere Zeit gelagert werden.

Für eine Doppelfärbung werden zwei unterschiedlich markierte Sonden verwendet, die zusammen inkubiert werden. Nach der, wie oben beschriebenen, ersten Färbung werden die Embryonen nicht in MEMFA fixiert, sondern für 30 min in 100mM EDTA bei 60°C inkubiert um die Aktivität der AP zu stoppen. Danach wird bei der Blockierung der unspezifischen Bindestellen für den Antikörper wieder eingesetzt und die zweite Färbung entsprechend mit einem anderen AP-Substrat durchgeführt.

### **4.1.10 Knorpelfärbung**

Zur Analyse der cranialen Knorpelstruktur wird eine Alzianblau-Färbung durchgeführt. Dabei werden saure Mukosubstanzen, Glykosaminglykane, die sich auf dem Knorpel befinden, an fixierten Embryonen angefarbt. Die Durchführung erfolgte leicht modifiziert nach Pasqualetti

et al. (2000). Embryonen im St. 46 oder älter werden zwei Stunden in MEMFA fixiert und anschließend über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert. Für eine tiefblaue Färbung werden die Embryonen für drei Tage bei RT in der Alzianblau-Färbelösung inkubiert. Danach wird dreimal 15 Minuten mit 95 % (v/v) Ethanol gewaschen und über eine absteigende Alkoholreihe wieder rehydriert. Die Alkoholreihe wird mit Ethanol in 2% (v/v) Kaliumhydroxid hergestellt. Da die cranialen Knorpelstrukturen instabil sind, werden die Embryonen in 80% (v/v) Glycerin in 2% (v/v) Kaliumhydroxid umgepuffert. Dazu werden sie je eine Stunde in 20% (v/v) Glycerin, 40% (v/v) Glycerin und 60% (v/v) Glycerin in 2% (v/v) Kaliumhydroxid inkubiert. Um die Knorpelstrukturen besser sichtbar zu machen, wird der Kopf zunächst vom Rumpf getrennt. Mit zwei Pinzetten werden dann die Epidermis und die Augen vom Kopf entfernt. Die isolierten Knorpel können in 80% (v/v) Glycerin in 2% (v/v) Kaliumhydroxid bei 4°C gelagert werden.

### 4.1.11 TUNEL Assay

Der TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling) Assay ist eine Methode zur Detektion apoptotischer Zellen. Dies kann an Gewebeschnitten sowie an ganzen Embryonen durchgeführt werden. Dabei werden DNA-Bruchstücke, die beim programmierten Zelltod, durch die Enzymaktivität von Endonukleasen entstehen, markiert. Digoxigenin markierte dUTPs (2'-Deoxyuridin, 5'-Triphosphat) werden durch das Enzym TdT (Terminale deoxyribonucleotidyl Transferase) an die freien Hydroxylgruppen (3'OH-Enden) der DNA-Bruchstücke gebunden und mit einem gegen Digoxigenin gerichteten AP-konjugierten Antikörper nachgewiesen. Der Versuch wurde nach einem Standardprotokoll durchgeführt (Hensey and Gautier, 1998).

Nach der Fixierung der Embryonen für eine Stunde in MEMFA, werden sie zweimal 30 Minuten in Methanol gewaschen. Danach werden die Embryonen durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert und 10 Minuten in 1% (v/v) Tween20 in 1x PBS permeabilisiert. Darauf folgen zwei Waschschrte für je 15 Minuten mit 0,2 % (v/v) Tween20 in 1x PBS und zwei weitere in 1x PBS. Die Embryonen werden dann 30 Minuten in TdT Puffer (1:5 in H<sub>2</sub>O verdünnt) inkubiert und über Nacht bei RT werden das Enzym TdT (1 µl/100 µl) und Dig-11-dUTP (0,1 µl/100 µl) in TdT Puffer dazugegeben. Am zweiten Tag werden die Embryonen zweimal eine Stunde in 1 mM EDTA in 1x PBS bei 65°C und viermal eine Stunde in 1x PBS bei RT gewaschen. Danach wird zweimal 15 Minuten in 1x MAB gewaschen. Die Blockierung unspezifischer Antikörperbindestellen erfolgt für 30 Minuten in 2 % (w/v) BMB in 1x MAB und eine Stunde in 2% (w/v) BMB / 20% (w/v) Pferdeserum in 1x MAB. Die Inkubation mit dem anti-Dig-AP Antikörper (1:5000 in Blockierungspuffer) wird über Nacht bei 4°C durchgeführt. Die Embryonen werden dann viermal 30 Minuten in 1x MAB gewaschen und dann in AP-Puffer mit NBT/BCIP, wie in 4.1.9 beschrieben, gefärbt und fixiert.

#### **4.1.12 Whole mount phosphoH3 Immunfärbung**

Mit einer phosphoH3 Immunfärbung können proliferierende Zellen am ganzen Embryo nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung des Histon H3 erfolgt in der Mitose Phase von proliferierenden Zellen und wird von Wachstumsfaktoren ausgelöst. Der phosphoH3 Antikörper bindet an die phosphorylierte Form des Histon H3. Die Färbung wurde wie beschrieben durchgeführt (Kunz et al., 2004).

Die Embryonen werden eine Stunde in MEMFA fixiert und anschließend zweimal 30 Minuten in Methanol gewaschen. Danach werden sie 10 Minuten in vorgekühltem (-20°C) Aceton inkubiert und über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert. Dann folgen drei Waschschrte für 10 Minuten in APBS und zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindestellen vier Schritte für je 30 Minuten in 1% (w/v) BSA in APBS. Der PhosphoH3 Antikörper wird 1:100 im Blockierungspuffer verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am zweiten Tag werden die Embryonen viermal 30 Minuten in 0,1 % (v/v) Triton in APBS gewaschen und dann zwei Stunden mit dem Sekundärantikörper (Cy3-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen; 1:200) bei RT inkubiert. Danach wird wiederum viermal 30 Minuten mit 0,1 % (v/v) Triton in APBS gewaschen und die Embryonen werden schließlich eine Stunde in MEMFA nachfixiert. Die Lagerung erfolgt in APBS bei 4°C.

#### **4.1.13 Anfertigung von Vibratomschnitten**

Zur Anfertigung von Vibratomschnitten werden Embryonen, die nach einer Ganzkeimfärbung in MEMFA fixiert und in Ethanol gelagert wurden, zunächst über eine absteigende Ethnaolreihe rehydriert und in 1x PBS äquilibriert. Die Embryonen werden in 2% (w/v) Agarose in kleinen Petrischalen eingebettet. Nach Aushärten der Agarose werden die Embryonen in der gewünschten Lage aufgeblockt und im Vibratom befestigt. Die Schnittdicke beträgt 40 µm und die Schnitte werden mit einem Pinsel sofort auf Objektträger überführt und mit Mowiol bedeckt.

#### **4.1.14 Präparation von Explantaten der cranialen Neuralleistenzellen**

Die cranialen Neuralleistenzellen können aus Embryonen im St. 16 explantiert und auf Fibronektin beschichteten Oberflächen kultiviert werden. Die Analyse erfolgt mittels einer Immunfärbung an den fixierten Zellen. Den Embryonen wird im 2-Zell Stadium animal in eine Blastomere mRNA injiziert. Zusätzlich wird zur Injektionskontrolle GFP mRNA (200 pg) ko-injiziert. Im St.14 werden die Embryonen anhand GFP-Fluoreszenz nach der injizierten Seite sortiert. Zunächst wird die Vitellinmembran, die dem Embryo als Schutzhülle dient mit zwei Pinzetten entfernt. Die Explantation wird in einer Petrischale, die mit 2% (w/v) Agarose beschichtet ist, in 1x MBSH durchgeführt. Mit dem Skalpell wird ein Stück Agarose entfernt,



so dass der Embryo hinein gelegt und darin immobilisiert werden kann. Als Werkzeug werden Augenwimpern verwendet, die einzeln in die Öffnung einer Kanüle geschoben und mit Nagellack darin befestigt werden. Der erste Schnitt erfolgt entlang der Neuralplatte, der zweite in einem Winkel von ca. 90° zum ersten Schnitt, so dass die Epidermis von der Neuralplatte aus nach unten weggeklappt werden kann. Darunter liegen die grau schimmernden Neuralleistenzellen, die sich von den umgebenden, großen weißen Mesodermzellen unterscheiden und mit der Wimper heraus gehoben werden können. Mit einer Pipette, deren Spitze mit einer 3% (w/v) BSA-Lösung in 1x MBSH für zehn Minuten bei RT blockiert wurde, werden die Zellen in eine Petrischale mit Dissoziationspuffer überführt. Nach einigen Minuten sind die Zellen separiert und werden in eine Kammer eines „µ-Slide 8 well“ Objektträgers (ibidi®) überführt. Dieser wurde vorher für eine Stunde bei RT mit 200 µg/ml Fibronectin beschichtet und danach 15 Minuten mit einer 3% (w/v) BSA-Lösung in 1x MBSH blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit Danilchick's Puffer ist der Objektträger vorbereitet für die Zellen. Nach ein bis zwei Stunden, nachdem die Zellen auf dem Fibronectin adhärirt sind und sich aus dem Zellverband heraus bewegt haben, können sie für die folgende Immunfärbung fixiert werden.

### **4.1.15 Immunfluoreszenzfärbung auf Explantaten**

Mit einem spezifischen primären Antikörper werden nachzuweisende Proteine markiert und mittels eines an einem Sekundärantikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes visualisiert. Im Fluoreszenzmikroskop wird damit die subzelluläre Lokalisation des markierten Proteins ermittelt.

Die Färbung der Zellen mit einem MitoTracker, der spezifisch die Mitochondrien anfärbt wird vor der Fixierung durchgeführt. Bei dem „MitoTracker Deep Red“ handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der selektiv aktive Mitochondrien anfärbt. Der Farbstoff enthält eine thiolreaktive Chloromethyl-Gruppe, die es ermöglicht, dass die Färbung auch nach der Fixierung mit Aldehyden bestehen bleibt. Während der Inkubation erfolgt ein passiver Transport der Farbstoffmoleküle durch die Plasmamembran und eine Akkumulation in den aktiven Mitochondrien. Die Zellen werden nach der Explantation im Dunkeln für 45 Minuten bei RT mit dem MitoTracker (1:3000) in Danilchick's Puffer inkubiert. Die Stammlösung (1mM in Dimethylsulfoxid) wird bei -20°C gelagert. Danach werden die Zellen mehrmals mit Danilchick's gewaschen. Die folgenden Schritte werden ebenfalls im Dunkeln durchgeführt.

Die Neuralleistenzellen werden in 4% (v/v) Paraformaldehyd in 1x PBS für 10 Minuten bei RT fixiert und anschließend eine Minute in 0,5% (v/v) Triton-X in 1x PBS permeabilisiert. Nach drei Waschschritten mit PBST werden die Zellen eine Stunde in 20% (v/v) Pferdeserum in 1x PBS bei RT blockiert. Danach werden die Zellen über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper 9E10 ( $\alpha$ -myc) inkubiert. Der ungebundene Antikörper wird mit 1x PBS

heraus gewaschen und danach erfolgt erneut ein Blockierungsschritt in 20% (v/v) Pferdeserum in 1x PBS. Der Sekundärantikörper, ein Cy3-gekoppelter Ziege-anti-Maus Antikörper, wird 1:400 in der Blockierungslösung verdünnt und für eine Stunde bei RT auf die Zellen gegeben. Nach mehreren Waschschritten mit 1x PBS werden die Zellkerne mit DAPI (4'-6-Diamidino-2-Phenylindol) angefärbt. DAPI bildet mit doppelsträngiger DNA einen fluoreszierenden Komplex, indem es sich in die kleine Furche der DNA lagert. Die Stammlösung (1 mg/ml in Dimethylformamid) wird 1:1000 in 1x PBS verdünnt und für eine Minute auf die Zellen gegeben. Danach werden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit Mowiol bedeckt.

### 4.1.16 Luziferase Reporteranalyse

Für die Luziferase Reporteranalyse wurden Embryonen im 2-Zell Stadium in eine Blastomere injiziert und bis St. 18 kultiviert. Als Injektionskontrolle wurde Dextran-FITC (Fluoresceinisothiocyanat) (4 pg) injiziert. Die Luziferase aus *Photinus pyralis* dient hier als Reporter (pFR-LUC *trans*-Reporter Plasmid, Stratagene) und steht unter der Kontrolle eines 5-fachen GAL4-Bindungselements gekoppelt mit einem Transkriptionspromoter (TATATA). E2F1 wurde mit der GAL4-DNA-Bindedomäne (Gal4-DBD-E2F1 Fusionskonstrukt) gekoppelt und steht unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven CMV (Cytomegalovirus) Promoters. Werden beide Plasmide injiziert, wird GAL4-DBD-E2F1 exprimiert, bindet an die GAL4-Bindungsstelle des Luziferase Reporter Plasmids und aktiviert somit die Expression des Luziferasegens. Daraufhin wird hinzugegebenes Luziferin unter Chemilumineszenz zu Oxyluziferin umgebaut. Die Luziferaseaktivität wird anhand des emittierten Lichts bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen und gibt Auskunft über die Stärke der Aktivierung des Promoters. Dieser Wert dient als positiv Kontrolle und wird auf 100% gesetzt. Die Injektion von Luziferase Reporter Plasmid DNA (40 pg) alleine dient als negativ Kontrolle. Durch die Koinjektion von Xphb1 mRNA (700 pg) kann untersucht werden, ob Xphb1 reprimierend auf die Luziferase Aktivität wirkt. Parallel wird ein  $\beta$ -Galaktosidase-Assay durchgeführt und alle gemessenen Luziferaseaktivitäten werden auf den entsprechenden  $\beta$ -Galaktosidasewert normalisiert, wodurch Unregelmäßigkeiten bei der Injektion ausgeglichen werden.

Jeweils 10 Embryonen werden in 150  $\mu$ l LuziLyse Puffer aufgenommen und mit Hilfe einer Kanüle ( $\varnothing$  0,40 mm) homogenisiert und lysiert. Davon werden 20  $\mu$ l für den Luziferase-Assay und 110  $\mu$ l für den  $\beta$ -Galaktosidase-Assay verwendet. Für den Luziferase-Assay werden je Probe 100  $\mu$ l Luziferase-Reagenz zugefügt und die Extinktion der ablaufenden Lumineszenz-Reaktion am Luminometer gemessen. Für den  $\beta$ -Galaktosidase-Assay wird die Zellsuspension zunächst zur Entfernung der Zelltrümmer für 5 min bei 7000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Je 60  $\mu$ l des Zelllysates wird mit 300  $\mu$ l  $\beta$ -Galaktosidase-Assay-Mix versetzt

und bei 37°C im Wasserbad inkubiert bis eine Gelbfärbung eintritt. Als Nullwert werden 60 µl LuziLyse Puffer mit 300 µl β-Galaktosidase-Assay-Mix versetzt und inkubiert. Die Farbreaktion wird mit 500 µl 1M NaHCO<sub>3</sub> gestoppt und die Intensität der Farbreaktion wird am Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 420 nm gemessen. Die Luziferase Reportegenanalyse wurde mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt und der Mittelwert berechnet.

## 4.2 Proteinbiochemische Methoden

### 4.2.1 Proteinextraktion aus Embryonen durch nicht-ionisches Detergens

Je fünf Embryonen werden mit Hilfe einer Kanüle (Ø 0,40 mm) in 70 µl NOP-Puffer lysiert. Das Lysat wird 10 Minuten bei 13200 rpm und 4°C zentrifugiert. Zum Überstand wird das jeweils gleiche Volumen an Freon (Trichlortrifluorethan) gegeben, um die Dotterproteine abzutrennen. Der Ansatz wird gut durchmischt und wieder für 10 Minuten zentrifugiert. Es entstehen zwei Phasen, die obere enthält das gewünschte Protein und die untere die Dotterproteine. Der Überstand wird mit 5x SDS Ladepuffer versetzt und fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Das NOP-Lysat kann jetzt auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen werden oder bei -20°C gelagert werden.

### 4.2.2 Konzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Assay

Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration wurde der Bicinchoninsäure-Assay (BCA-assay) durchgeführt. Hier werden Cu<sup>2+</sup>-Ionen in alkalischer Umgebung durch Peptidbindungen zu Cu<sup>+</sup>-Ionen reduziert. Die Menge an gebildeten Cu<sup>+</sup>-Ionen ist dabei direkt proportional zur Proteinkonzentration. Als Nachweisreagenz dient Bicinchoninsäure, die mit Cu<sup>+</sup>-Ionen stabile Komplexverbindungen mit einem Absorptions-maximum bei 562 nm bildet. Bicinchoninsäurelösung wird mit 4% (w/v) CuSO<sub>4</sub> in einem Verhältnis 50:1 gemischt. Zur Konzentrationsbestimmung werden 25 µl Proteinprobe mit 1 ml des Gemisches versetzt und 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlen des Reaktionsansatzes auf Raumtemperatur wird die Absorption gemessen. Eine Kalibrierungsreihe mit BSA als Standard dient zur Berechnung der Proteinkonzentration.

### 4.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE erlaubt die Auftrennung von Proteinen in einem elektrischen Feld. Die Verwendung des ionischen Detergens SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat) führt zur Denaturierung

der Proteine so dass sie als monomere Proteinuntereinheiten vorliegen. Disulfidbrücken können mittels  $\beta$ -Mercaptoethanol gespalten werden. Außerdem werden die Proteine mit einer negativ geladenen Hülle umgeben, wodurch sie im elektrischen Feld zur Anode wandern. Die relative Wanderungsstrecke eines SDS-Protein-Komplexes ist linear vom Logarithmus des Molekulargewichts abhängig, das heißt je kleiner das Protein desto weiter wandert es in das Gel. Proteine mit einem definierten Molekulargewicht dienen als Größenmarker (Fermentas, St. Leon-Rot). Als Trennmatrix wird ein Polyacrylamidgel verwendet. Hierbei handelt es sich um ein diskontinuierliches System aus zwei Gelen, einem Sammelgel und einem Trenngel, die sich im Hinblick auf den pH, die Ionenstärke und die Porengröße unterscheiden. Das Sammelgel besitzt eine größere Porenweite. Der Puffer enthält Chlorid-Ionen und Glycinmoleküle und die Proteine reihen sich entsprechend ihrer Geschwindigkeit im elektrischen Feld zwischen den Glycinmolekülen mit einer niedrigen und den Chlorid-Ionen mit einer hohen Mobilität ein. Im Trenngel, das einen höheren pH-Wert und eine höhere Salzkonzentration aufweist, werden die Proteine nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Alle Faktoren führen dazu, dass die Proteine im Sammelgel zunächst konzentriert werden und eine scharfe Bande im Gel bilden.

Das Netzwerk wird aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid generiert, wobei das Mengenverhältnis die Größe der Poren bestimmt. Die Polymerisation wird durch freie Radikale eingeleitet, das heißt durch den chemischen Zerfall von Ammoniumpersulfat. Als Stabilisator und Katalysator wird zusätzlich TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin) zugegeben. Das Gel wird zwischen zwei Glasplatten gegossen, zuerst das Trenngel und nach Aushärtung das Sammelgel darüber (Tabelle 4-1).

Lösung	Trenngel 12% (10 ml)	Sammelgel (3 ml)
H <sub>2</sub> O	3,3 ml	2,1 ml
30% Acryl- bisacrylamid-Lösung	4,0 ml	500 $\mu$ l
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	-
0,5 M Tris pH 6,8	-	380 $\mu$ l
10% SDS	100 $\mu$ l	30 $\mu$ l
10% APS	100 $\mu$ l	30 $\mu$ l
TEMED	4 $\mu$ l	3 $\mu$ l

**Tabelle 4-1: Herstellung von Polyacrylamidgelen.** Lösungen zur Herstellung von zwei 12%igen Polyacrylamidgelen.

Das frisch gegossene Trenngel wird mit Wasser überschichtet, um eine möglichst gleichmäßige Trennfläche zu erhalten. Zur Herstellung der Ladetaschen wird ein Kamm in dem flüssigen Sammelgel angebracht, welcher nach der Aushärtung wieder entfernt wird.

Die Glasplatte mit dem Gel wird in der Gelelektrophoresekammer vollständig mit SDS-Laufpuffer überschichtet, bevor die Proben aufgetragen werden. Zur Auftrennung wird eine Gleichspannung von ca. 80 V angelegt, wobei die Spannung erhöht werden kann, nachdem die Proteine das Sammelgel durchlaufen haben. Sobald die Bromphenolblau-Front aus dem Trenngel austritt, sind die Proteine vollständig aufgetrennt und das Gel kann aus den Glasplatten befreit werden und direkt für weiterführende Versuche benutzt werden.

In einer Coomassie-Färbung können Proteine unspezifisch in dem Gel angefärbt werden. Dazu wird das Trenngel 15 bis 30 Minuten in der Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend in einer Coomassie-Entfärbelösung mehrmals gewaschen bis die Proteinbanden deutlich zu sehen sind. Nach einem weiteren Waschschrift in A. bidest. wird das Gel getrocknet.

Wird das Gel für die Exposition einer Phosphoimager Platte verwendet, wird es zunächst 30 Minuten in der Coomassie-Entfärbelösung fixiert und anschließend in A. bidest. gewaschen und getrocknet.

#### **4.2.4 Proteinanalyse mittels Western Blot**

In einem Western Blot werden Proteine, die vorher in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden, auf einer PVDF (Polyvinylidenfluorid) oder Nitrocellulose Membran immobilisiert und anschließend mit Antikörpern detektiert. Die Proteine wandern aus dem Gel auf die Membran, da ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt wird. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen bleiben die Proteine auf der Membran haften. Für den Transfer wird die „*semi-dry electrophoretic*“ Methode angewandt. Drei 3 mm dicke Filterpapiere werden in Blotpuffer eingeweicht und dienen als Unterlage für die Membran. Die PVDF Membran wird vor Verwendung eine Minute in Methanol aktiviert, kurz in A. bidest. und danach in Blotpuffer gewaschen. Darauf wird das Trenngel gelegt und mit einer weiteren Schicht aus drei eingeweichten Filterpapieren bedeckt. Die Bestandteile sollten luftblasenfrei aufeinander gelegt werden. Der Proteintransfer erfolgt bei 50 mA pro Gel für 90 Minuten. Die Membran wird anschließend 30-60 Minuten in 10% (w/v) Magermilchpulver in TBST inkubiert, um freie, unspezifische Antikörperbindestellen zu blockieren. Der Primärantikörper wird sofern erforderlich in Milchpulver verdünnt ( $\alpha$ -phb: 1:4000). Die Antikörperbindung erfolgt über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST wird der Sekundärantikörper in Milchpulver verdünnt (AP-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen und Ziege-anti-Maus: 1:3000) für eine Stunde bei RT zugegeben. Danach wird die Membran dreimal 10 Minuten mit TBST und einmal 10 Minuten mit 1x TBS gewaschen. Für die Detektion wird eine Farbreaktion mit NBT/BCIP angewandt. BCIP dient als Substrat für die Alkalische Phosphatase, wobei NBT als Oxidans wirkt und beide Stoffe in ein dunkelblaues Präzipitat umgesetzt werden. Vor der Farbreaktion wird die Membran zweimal 10 Minuten in

AP-Puffer gewaschen. Die Farbreaktion wird mit A. dest. gestoppt und die Membran wird getrocknet.

#### 4.2.5 TNT® *in vitro* Translation

Mit der TNT® *in vitro* Translation kann die Bildung eines Proteins durch eine spezielle Markierung nachgewiesen werden. Diese Methode erlaubt zum Beispiel die Analyse der Funktionalität eines Morpholino-Oligonukleotids. Für eine radioaktive Markierung wird ein DNA-Template zusammen mit einer RNA-Polymerase und einem Reticulozytenlysat in Anwesenheit von radioaktivem <sup>35</sup>S-Methionin inkubiert. Die *in vitro* transkribierte RNA wird durch Ribosomen aus dem Reticulozytenlysat translatiert und durch den Einbau von <sup>35</sup>S-Methionin markiert. Im nicht-radioaktiven System wird bei der *in vitro* Translation biotinyliertes Lysin eingebaut, welches in Form eines biotinylierten Lysin-tRNA Komplexes zum Ansatz gegeben wird. Folgender Reaktionsansatz wird für 90-120 Minuten bei 30°C inkubiert:

25 µl	TnT® Rabbit Reticolucyte Lysate (Promega)
2 µl	TNT® Reaction Buffer (Promega)
1 µl	TNT® RNA Polymerase (Promega)
1 µl	Aminosäure-Mix ohne Met bzw. ohne Lys (Promega)
2 µl	<sup>35</sup> S-Methionin (GE Healthcare) bzw. biotinylated lysine-tRNA (Promega)
1 µl	RNAsin® (40 u/µl) (Promega)
1 µg	DNA-Template
1 mM	Morpholino
<u>x µl</u>	H <sub>2</sub> O
50 µl	

Anschließend wird 5x SDS-Ladepuffer zugegeben, der Ansatz für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Trocknen des Gels kann das <sup>35</sup>S-markierte Protein mit einem Phosphoimager detektiert werden, wohingegen Biotin-markierte Proteine mittels Western Blot mit einem AP-gekoppelten Streptavidin Antikörper und einer NBT/BCIP Farbreaktion detektiert wird. In Anwesenheit des funktionellen Morpholinos sollte auf dem SDS-Polyacrylamidgel bzw. dem Blot bei der entsprechenden Größe keine Bande auftreten.

### 4.3 Molekularbiologische und biochemische Methoden

#### **4.3.1 Restriktionsanalyse von DNA**

Doppelsträngige DNA kann durch bakterielle Restriktionsendonukleasen auf verschiedene Arten durchtrennt werden. Die spezifische DNA-Erkennungssequenz entspricht meist einem Palindrom und wird entweder glatt oder mit überhängenden Enden geschnitten. Bei einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l besteht der Restriktionsansatz aus 1  $\mu$ g DNA, zwei Einheiten Restriktionsendonuklease und je einem Zehntel-Volumen 10x BSA (10 mg/ml) und 10x Puffer. Der Verdau wird bei dem enzymatischen Temperaturoptimum von meist 37°C für mindestens eine Stunde inkubiert.

#### **4.3.2 Analytische und präparative Flachbett-Gelelektrophorese**

Durch Anlegen eines elektrischen Feldes kann DNA in einem Agarosegel seiner Größe nach aufgetrennt werden. Nukleinsäuren besitzen aufgrund ihres Phosphatrückgrates eine negative Ladung und wandern durch die Agarosematrix zur Anode. Für die relative Mobilität ist die Moleküllänge verantwortlich. Kleinere Moleküle wandern somit schneller durch die Agarose. Fragmente bis zu einer Größe von 500 bp werden in einem 2%igen Gel, größere Fragmente in einem 1%igen Gel aufgetrennt. Dazu wird die Agarose in TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer durch Erhitzen aufgelöst und nach dem Abkühlen mit Ethidiumbromid (1:10000) versetzt. Danach wird die Suspension in eine Gelform gegossen und mit einem entsprechenden Kamm, der die Probetaschen bildet, versehen. Im Verlauf der weiteren Abkühlung härtet die Agarose aus und der Kamm kann entfernt werden. Das Gel wird mit TAE-Puffer überschichtet und die Proben, die mit 5 x Ladepuffer versetzt wurden, können in die Taschen geladen werden. Durch Anlegen einer Gleichspannung von 80-120 V wird die DNA aufgetrennt, die dann mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basenpaare, welche dann nach Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge (312 nm oder 254 nm) fluoreszieren. Durch den Vergleich mit dem gleichzeitig aufgetrennten 2Log DNA Marker kann die Größe des DNA-Fragmentes bestimmt werden.

Nach der Auftrennung kann die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell aus der Agarose ausgeschnitten und mit Hilfe des High Pure PCR Product Purification Kit nach Angaben isoliert werden. Das Gelstück wird in einem Binding-Puffer bei 56°C gelöst und dann auf eine Säule gegeben. Dabei werden die DNA-Fragmente an die in der Säule enthaltene Silica-Membran adsorbiert. Nach mehrmaligem Waschen der Säule wird die DNA in ein frisches Reaktionsgefäß eluiert.

#### 4.3.3 Fällung und Reinigung von Nukleinsäuren

Die Fällung von Nukleinsäuren erfolgt mittels monovalenten Kationen und Alkohol, die die Hydrathülle der Nukleinsäuren zerstören. Zur Präzipitation wird ein Ansatz aus 1/20 Volumen 0,5 M EDTA, 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumina Ethanol angesetzt, wobei die Probe zunächst mit A. bidest. auf 100 µl aufgefüllt wird. Der Ansatz wird 15 Minuten auf Eis inkubiert und dann weitere 15 Minuten bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Die gefällte Nukleinsäure wird bei RT getrocknet und in einem geeigneten Volumen A. bidest aufgenommen.

Um eine höhere Reinheit der Nukleinsäuren zu erzielen, können wahlweise auch Säulen mit einer Affinitätsmatrix (Probe Quant G50 Micro Columns) verwendet werden.

#### 4.3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wird die Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm gemessen. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz gilt für die Konzentration  $C[\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times V \times F$ , wobei  $A_{260}$  für die Absorption bei 260 nm, V für den Verdünnungsfaktor und F für einen Multiplikationsfaktor steht. Dieser liegt für doppelsträngige DNA bei 50 und für RNA bei 40. Zusätzlich kann mit dieser Methode die Reinheit der Probe ermittelt werden. Die Proteinkonzentration wird anhand der Absorption ihrer aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 280$  nm gemessen und der Quotient 260/280 einer proteinfreien Nukleinsäureprobe sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

#### 4.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden können durch Schließen der Phosphatbrücken in der DNA enzymatisch in einen entsprechenden DNA-Vektor ligiert werden. Bei Bedarf können die 5'-Enden der linearisierten Vektor DNA dephosphoryliert werden, um eine Religation zu verhindern. Dazu wird nach der Linearisierung 1 µl Antarctic Phosphatase und 1/10 Volumen des 10x Reaktionspuffers zum Ansatz gegeben und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Ein Ligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl enthält 25-50 ng linearisierte Vektor DNA und das zu insertierende DNA-Fragment in drei- bis siebenfachem molarem Überschuss. Dazu wird 1 µl 10x Reaktionspuffer und 1 µl (10 U) T4-DNA-Ligase gegeben und über Nacht bei 16°C inkubiert.

#### 4.3.6 Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* Bakterien

Bei einer Transformation wird Fremd-DNA in Bakterien eingeschleust und vervielfältigt. Alle Transformationen wurden mit chemisch-kompetenten *E. coli* Bakterien NEB 5-alpha (New England Biolabs) durchgeführt. Dazu werden 2 µl Ligationsansatz zu 10 µl Bakterien gegeben



und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgt ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C im Wasserbad. Der Ansatz wird sofort zum Abkühlen auf Eis gestellt und mit 400 µl SOC-Medium versetzt. Die Kultur wird eine Stunde bei 37°C geschüttelt und danach auf eine LB/Ampicillin-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 4.3.7 Blau-Weiß-Selektion

Zur Selektion positiver Kolonien wird zum einen die Antibiotikaresistenz ausgenutzt, bei der allerdings nur Klone selektiert werden, die ein Plasmid aufgenommen haben. Die Blau-Weiß-Selektion ermöglicht eine Aussage über das Ergebnis der voran gegangenen Ligation. Das Klonierungsplasmid pGEM-T enthält den kodierenden Bereich für die  $\beta$ -Galaktosidase als Reportergen, welches durch den regulierbaren lac-Promotor kontrolliert wird. Die multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site, MCS) des Vektors enthält eine Vielzahl von Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen und befindet sich im Bereich des  $\beta$ -Galaktosidase Gens. Bei der Ligation wird das DNA-Fragment in diesen Bereich eingebaut und inaktiviert somit das  $\beta$ -Galaktosidase Gen. Dies wird durch einen Farbttest nachgewiesen. Dazu werden die LB-Platten bevor man die Bakterienkultur ausstreicht mit dem Lactose-Analogen 100 µl IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid; 0,1 M) und 20 µl X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid; 50 mg/ml in DMF) behandelt. IPTG induziert die Synthese der  $\beta$ -Galaktosidase, welche das Substrat X-Gal in Galaktose und ein Indoxyl-Derivat spalten kann, welches zum blauen Farbstoff 5,5'-Dibromo-4,4'-dichloroindigo oxidiert. Somit färben sich die Bakterienkolonien blau. War die Ligation jedoch erfolgreich, ist das  $\beta$ -Galaktosidase Gen inaktiviert und die Kolonien bleiben weiß.

### 4.3.8 Isolierung bakterieller Plasmid-DNA

Um bakterielle Plasmid-DNA im Kleinmaßstab zu gewinnen, werden die transformierten Bakterien über Nacht in 4 ml LB-Medium mit Antibiotika (1:1000) bei 37°C kultiviert. Zur Isolierung wurde die Methode nach Birnboim (Birnboim and Dooley, 1979) angewandt. Die Bakterien werden zunächst durch Zentrifugation (5 Minuten bei 4000 rpm) sedimentiert und das Pellet wird in 400 µl Resuspensionspuffer gelöst. Danach werden je 400 µl Lysepuffer und Neutralisationspuffer zugegeben, gut gemischt und 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Zur Fällung werden je 800 µl des Überstands mit 600 µl Isopropanol versetzt und wiederum für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wird mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und schließlich in 50 µl Wasser aufgenommen.

Eine Plasmidisolierung im Mittelmaßstab wurde mit Hilfe des Nucleobond XtraMidi Kits (Macherey Nagel) nach Angabe durchgeführt. Dabei werden die Bakterien zunächst lysiert und die freiwerdende DNA an eine Silica-Membran gebunden. Die gebundene DNA wird

gewaschen, danach mittels eines Niedrigsalzpuffers eluiert und mit Isopropanol gefällt. Die DNA kann in 200-600 µl Wasser gelöst und bei -20°C gelagert werden.

#### **4.3.9 *In vitro* Transkription**

Mit der Methode der *in vitro* Transkription können RNA-Kopien eines Gens in einem geeigneten Plasmid hergestellt werden. Dazu werden Bindestellen für RNA-Polymerasen im Vektor benötigt. Im Allgemeinen sind dies Bindestellen für die T7, die T3 und / oder die SP6 RNA-Polymerasen. RNA wird mit Hilfe des mMessage mMachine Transkription Kit (Ambion) nach Herstellerangaben *in vitro* transkribiert. Der Transkriptionsansatz hat ein Gesamtvolumen von 20 µl und enthält 1 µg linearisierte Plasmid-DNA, 10 µl der Ribonukleotide, 2 µl des Reaktionspuffers und 2 µl RNA-Polymerase-Mix. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei 37°C wird 1 µl DNase zugegeben und weitere 15 Minuten inkubiert. Zur Aufreinigung der RNA kann entweder eine Fällung mit Ethanol durchgeführt werden, oder man verwendet „Probe Quant G-50 Micro Columns“ (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers. Die RNA kann bei -80°C gelagert werden.

#### **4.3.10 RNA Isolierung aus Embryonen**

Die Gesamt-RNA aus jeweils drei bzw. fünf Embryonen wurde mit Hilfe des „High Pure RNA Isolation Kit“ von Roche gewonnen. Mit Hilfe einer Kanüle (Ø 0,40 mm) werden die Embryonen zunächst in 1x PBS homogenisiert. Die lysierten Embryonen werden auf die Säulen gegeben und die Nukleinsäuren werden mittels Zentrifugation an die Silika-Membran gebunden und anschließend 15 Minuten mit DNase inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Membran wird die RNA schließlich eluiert. Die RNA wird bei -80°C gelagert.

#### **4.3.11 cDNA Synthese**

Zur cDNA Synthese aus RNA werden in einem Reaktionsansatz von 10 µl 150-500 ng RNA zusammen mit 2 µl Oligo (dT) 18-Primer eingesetzt und für fünf Minuten bei 70°C denaturiert. Nachdem der Ansatz auf 4°C abgekühlt wurde, werden 10 µl Transkriptions-Mix aus 4 µl 5x Puffer, 1 µl dNTPs, 0,5 µl Reverse Transkriptase (MMLV) und 4,5 µl Wasser zugegeben. Der Ansatz wird zunächst fünf Minuten bei 25°C und dann für eine Stunde bei 42°C inkubiert. Als Negativkontrolle wird parallel ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase angesetzt um DNA-Kontaminationen auszuschließen. Die cDNA wird bei -20°C gelagert.

#### **4.3.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die PCR ist ein semiquantitatives *in vitro* Verfahren zur Amplifikation von DNA-Fragmenten. Im ersten Schritt wird das DNA-Template bei 95°C denaturiert. Die zu amplifizierende DNA-Sequenz wird durch entsprechende Primer (Vorwärts = fwd, Rückwärts = rev) begrenzt,

welche beim zweiten Schritt, dem „*Annealing*“, an den DNA-Einzelstrang hybridisieren. Die Hybridisierungstemperatur ist abhängig vom CG/AT-Verhältnis der Primer. Bei der Elongation werden die Primer verlängert, indem eine DNA-Polymerase neue dNTPs an das freie 3'-OH-Ende anhängt. Dadurch entsteht ein neuer komplementärer DNA-Strang, der im darauffolgenden Zyklus wieder denaturiert wird, wodurch die DNA Menge exponentiell ansteigt. Für die Elongation verwendet man üblicherweise entweder die thermostabile Taq-Polymerase (Promega) aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*. Um lange Sequenzen mit möglichst wenigen Fehlpaarungen zu erhalten, wird dagegen eine Korrekturlese-Polymerase, wie die Phusion-Polymerase (NEB) oder die Pfu-Polymerase (Stratagene), welche eine 3'-5'-Exonuclease-Funktion besitzen verwendet.

Für eine PCR mit der Taq-Polymerase wird folgender Ansatz verwendet:

5 µl	5x Go Taq Flexi Puffer
~1 µl	cDNA Template
1 µl	dNTPs (10 mM)
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
1 µl	Primer fwd
1 µl	Primer rev
~14,5 µl	H <sub>2</sub> O
<u>0,1 µl</u>	Taq-Polymerase
25 µl	

Das PCR Programm wird abhängig von der verwendeten DNA-Polymerase, dem Temperaturoptimum der Primer und der eingesetzten DNA-Menge entsprechend verändert:

2 Minuten bei 95°C	} 30 Zyklen
30 Sekunden bei 95°C	
30 Sekunden bei 48°C-64°C	
30 Sekunden bei 72°C	
5 Minuten bei 72°C	

Nachdem der Ansatz auf 4°C gekühlt wurde, kann die DNA bei -20°C gelagert werden.

#### 4.3.13 Real-time PCR

Die real-time quantitative PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion. Gleichzeitig ist jedoch eine Quantifizierung mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-Messungen während der PCR-Zyklen möglich, da die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt.

SYBR® Green I ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet und dazu führt, dass die Fluoreszenz in jedem Zyklus ansteigt. Am Anfang der Reaktion findet eine

exponentielle Vermehrung der DNA statt, die DNA-Menge verdoppelt sich also pro Zyklus. Das bedeutet, dass nach  $n$  Zyklen die DNA-Menge  $2^n$  vorhanden ist. Die Reaktion wird jedoch in späteren Zyklen durch mehrere limitierende Faktoren, wie der Menge an Nukleotiden und der Aktivität des Enzyms gehemmt. Damit die Quantifizierung nur im exponentiellen Teil der Reaktion stattfindet, wird ein Schwellenwert  $C_T$  (Threshold Cycle) bestimmt. Dieser Wert beschreibt den Zyklus, in dem die Fluoreszenz erstmals deutlich über den Hintergrund ansteigt.

Die Zykluszahl  $n$  entspricht dabei dem Threshold Cycle  $C_t$  und  $N$  der Anzahl Amplikon-Moleküle am Schwellenwert.

$$N = N_0 \cdot 2^{C_t}$$

Unterscheiden sich zwei Proben in der DNA-Konzentration um den Faktor 2, werden ihre  $C_t$ -Werte genau einen Zyklus auseinander liegen.

Anhand der  $C_t$ -Werte ist es möglich zu zeigen, wie sich die DNA-Mengen zweier Proben im Verhältnis zueinander verhalten. Zum Beispiel, ob die Menge einer bestimmten DNA im injizierten Embryo im Verhältnis zum uninjizierten Embryo ansteigt oder abfällt. Zur Normierung wird im Allgemeinen das Haushaltsgen Ornithin-Decarboxylase (ODC) verwendet.

Für die Relative Quantifizierung berechnet sich die Änderung in der Template-Menge des Zielgens (Target T) relativ zum Haushaltsgen als Referenz (R) wie folgt:

$$N_T = N_{T0} \cdot 2^{C_{tT}}$$

$$N_R = N_{R0} \cdot 2^{C_{tR}}$$

Zunächst wird eine Normierung auf das verwendete Referenz-Gen durchgeführt. Das Verhältnis zwischen Target und Referenz ist:

$$\begin{aligned} \frac{N_T}{N_R} &= \frac{N_{T0} \cdot 2^{C_{tT}}}{N_{R0} \cdot 2^{C_{tR}}} \\ &= \frac{N_{T0}}{N_{R0}} \cdot 2^{C_{tT} - C_{tR}} \\ &= \frac{N_{T0}}{N_{R0}} \cdot 2^{\Delta C_t} \end{aligned}$$

Durch Umformen erhält man eine Formel für das Ausgangsverhältnis von Target und Referenz:

$$\frac{N_{T0}}{N_{R0}} = \frac{N_T}{N_R} \cdot 2^{-\Delta Ct}$$

Bei der relativen Quantifizierung wird eine Probe als Kontrolle definiert. Dies sind hier, die mit GFP injizierten Embryonen. Alle weiteren Proben werden als Test-Proben bezeichnet. Um nun Veränderungen zwischen der Kontrolle (control) und einer Test-Probe (test) zu berechnen, nutzt man die folgenden Beziehungen:

$$\begin{aligned} \frac{\frac{N_{T0(test)}}{N_{R0(test)}}}{\frac{N_{T0(control)}}{N_{R0(control)}}} &= \frac{\frac{N_{T(test)}}{N_{R(test)}} \cdot 2^{-\Delta Ct(test)}}{\frac{N_{T(control)}}{N_{R(control)}} \cdot 2^{-\Delta Ct(control)}} \\ &= \frac{2^{-\Delta Ct(test)}}{2^{-\Delta Ct(control)}} \\ &= 2^{\Delta Ct(control) - \Delta Ct(test)} = 2^{-\Delta \Delta Ct} \end{aligned}$$

mit  $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct(test) - \Delta Ct(control)$

weil  $N_{T(test)} = N_{R(test)} = N_{T(control)} = N_{R(control)}$

und damit  $\frac{N_{T(test)}}{N_{R(test)}} = \frac{N_{T(control)}}{N_{R(control)}} = 1$

$2^{-\Delta \Delta Ct}$  entspricht dem Faktor der Änderung der Ausgangsmenge an Template zwischen der Kontroll- und der Test-Probe.

Jedes DNA-Fragment besitzt eine spezifische Schmelztemperatur, die zusätzlich in einer Schmelzkurve dargestellt wird, da die Fluoreszenz nicht genspezifisch ist. Anhand der Schmelzkurvenanalyse kann eine ungefähre Aussage über die Menge des amplifizierten DNA-Fragments getroffen werden. Zusätzliche Schmelzpunkte lassen sich meist unspezifisch entstandenen Primerdimeren zuordnen, deren Schmelzpunkt niedriger liegt, als bei doppelsträngiger DNA.

Für die PCR-Reaktion wird der „iQ SYBR Green Supermix“ von Biorad in folgendem Ansatz verwendet:

10 µl	SYBR Green Supermix
1 µl	Primer-Mix
7 µl	H <sub>2</sub> O
<u>2 µl</u>	cDNA
20 µl	

Die Real Time PCR wird in einem speziell ausgestatteten PCR-Cycler (iCycler von BioRad) mit folgendem Programm durchgeführt:

Zyklen	Zeit	Temperatur in °C
3x	30 Sekunden	95
1x	5 Minuten	95
36x	30 Sekunden	95
	30 Sekunden	60
	30 Sekunden	72
80x	10 Sekunden	60
1x	~	4

#### 4.3.14 Sequenzanalyse

Die Sequenzierungen wurden bei GATC Biotech, Konstanz in Auftrag gegeben. Die Vorgehensweise beruht auf der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten dNTPs.

## 4.4 Zellbiologische Methoden

### 4.4.1 Kultivieren und Passagieren von HEK293 Zellen

Die Zellen werden bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> in DMEM Komplettmedium kultiviert. Konfluente Zellen werden dreimal mit 1x PBS gewaschen, trypsiniert und in geeigneter Verdünnung in neue Gewebekulturflaschen mit Komplettmedium ausgesät.

### 4.4.2 Transfektion eukaryotischer Zellen

Mittels Transfektion kann der Genotyp einer eukaryotischen Zelle durch die Aufnahme fremder DNA verändert werden. Man unterscheidet zwischen dem zeitweiligen Einbringen der Fremd-DNA in die Zelle (transiente Transfektion) und dem dauerhaften Einbau ins Genom (stabile Transfektion). Im Gegensatz zu Bakterien werden bei eukaryotischen Zellen Vehikel für den Transport fremder DNA in die Zelle benötigt. In dieser Arbeit wurde ein

kationisches Polymer (TranPass<sup>TM</sup>) eingesetzt, welches zur Bildung des DNA-Polymer-Komplexes zunächst mit dem gewünschten Plasmid 30 Minuten bei RT in Medium ohne FCS inkubiert und anschließend auf die Zellen in den Gewebekulturflaschen gegeben wird. Für eine erfolgreiche Transfektion sollten die Zellen eine Konfluenz von etwa 20-40% haben.

Werden die Zellen für eine Immunfluoreszenzfärbung benötigt, werden sie vor der Transfektion auf Alzianblau-beschichteten Deckgläsern ausgesät. Dazu werden sterile Deckgläser in 6-Well Platten für 30 Minuten mit Alzianblau-Lösung beschichtet, dann 3x mit 1x PBS gewaschen. Nach der Transfektion werden die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert.

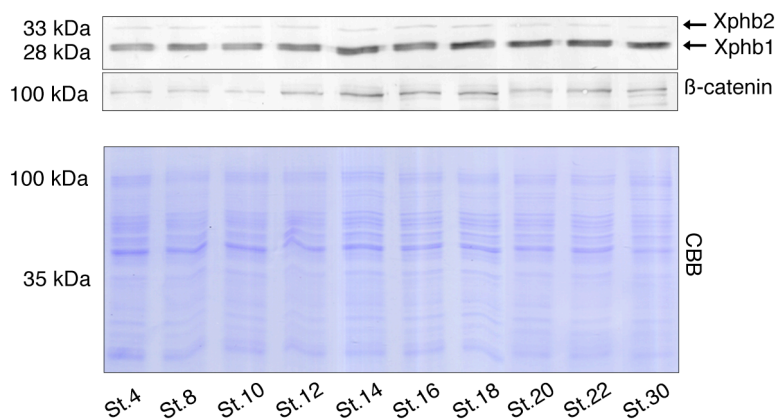
### **4.4.3 Immunfluoreszenzfärbung**

Die Zellen auf den Deckgläsern in 6-Well Platten werden zunächst 3x mit 1x PBS gewaschen und für 10 Minuten mit 3% (v/v) PFA-Fixierlösung fixiert. Anschließend folgen drei Waschschritte mit 1x PBS gewaschen. Die Immunfärbung wird in einer feuchten Kammer durchgeführt. Zur Permeabilisierung werden die Zellen 8 Minuten mit 0,1% (v/v) Triton® X-100-Lösung inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit 1x PBS werden unspezifische Bindestelle mit 20% (v/v) Pferdeserum in 1x PBS für 30 Minuten bei RT blockiert. Der primäre Antikörper 9E10 ( $\alpha$ -myc, Zellkulturüberstand, unverdünnt) wird über Nacht bei 4°C zugegeben. Alle folgenden Schritte werden im Dunkeln durchgeführt. Nach 3x Waschen mit 1x PBS wird der sekundäre Cy2-gekoppelte Ziege-anti-Maus Antikörper (1:400) zugegeben und 2 Stunden bei RT inkubiert. Für die Färbung der Zellkerne werden die Proben 3x mit 1x PBS gewaschen, 5 Minuten mit einer 1:1000 verdünnten DAPI-Lösung bei RT inkubiert und nochmals 3x mit 1x PBS gewaschen. Anschließend werden die Deckgläser auf Objektträgern überführt, mit Mowiol eingedeckelt und zum Trocknen über Nacht bei RT im Dunkeln gelagert.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Xphb1 wird in cranialen NLZ exprimiert

*Xphb1* wird maternal und in der gesamten frühen Embryonalentwicklung von *X.laevis* exprimiert. In Ganzkeimfärbungen konnte ein spezifisches Expressionsmuster gezeigt werden, wobei insbesondere die Expression in den Neuralleisten hervortrat (M. Schneider, Diplomarbeit 2007). In Western Blot Analysen mit Wildtyp-Embryonen in verschiedenen Entwicklungsstadien konnte bestätigt werden, dass *Xphb1* sowie das homologe Protein *Xphb2* während der gesamten Embryonalentwicklung exprimiert wird (Abb. 5-1). Dabei weist *Xphb2* allerdings insgesamt einen niedrigeren Level auf. Für eine korrekte Quantifizierung wurde die Proteinkonzentration der Lysate mittels BCA-Assay gemessen und auf eine einheitliche Konzentration eingestellt. Als Kontrolle wurde  $\beta$ -catenin (100 kDa), ein Protein das in allen Stadien gleichermaßen exprimiert wird, gezeigt. Zusätzlich wurde eine Coomassie Brilliant Blue (CBB) Färbung angefertigt, wobei Proteine unspezifisch angefärbt werden.



**Abb. 5-1: Xphb1 und Xphb2 werden während der gesamten Embryonalentwicklung exprimiert.** Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen *phb1* und  $\beta$ -catenin. Aus jeweils 5 Embryonen in den angegebenen Stadien wurden NOP-Lysate hergestellt. Alle Proben wurden auf eine Proteinkonzentration von 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingestellt und in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der  $\alpha$ -*phb1* Antikörper erkennt sowohl *Xphb1* als auch *Xphb2*, welche beide durchgängig exprimiert werden. Als Kontrolle wurde  $\beta$ -catenin detektiert und ein CBB Färbung durchgeführt.



Im Western Blot treten nach der Inkubation mit dem spezifische Antikörper gegen *phb1* zwei Banden auf. Die Bande bei 28 kDA entspricht *Xphb1* und die größere Bande bei 33 kDA kann anhand des berechneten Molekulargewichts *Xphb2* zugeordnet werden. Der Antikörper gegen *phb1* erkennt im Western Blot also beide Proteine.

Die Expression von *Xphb1* in Neuralleistenzellen (NLZ) konnte in Doppelfärbungen mit dem Neuralleisten-Markergen *twist* verifiziert werden. In St. 18 ist eine Kolokalisation von *Xphb1* und *twist* in den Neuralleisten zu sehen (Abb. 5-2). Die Expression von *Xphb1* ist allerdings nicht auf die Neuralleisten beschränkt, sondern findet sich auch in dem angrenzenden neuralen und ektodermalen Gewebe. Dies ist besonders in einem Transversalschnitt durch die Neuralleistenregion eines Embryos mit *Xphb1/twist* Doppelfärbung zu erkennen (Abb. 5-2b'). Da die Expressionsdomänen von *Xphb1* und *twist* sich stark überlagern und somit der farbliche Unterschied nach der Doppelfärbung nur schwer erkennbar ist, wurde der Embryo sowohl nach der ersten Färbung (Abb. 5-2a), als auch nach der zweiten Färbung (Abb. 5-2b) fotografiert.



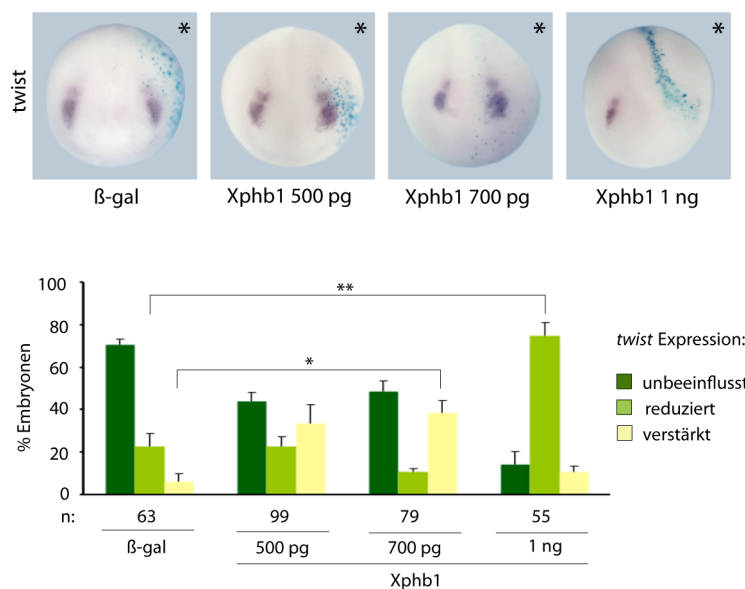
**Abb. 5-2: *Xphb1* und *twist* weisen eine Kolokalisation in den cranialen NLZ auf.** ISH im St. 18 mit einer *Xphb1* Sonde (violett) alleine (a) und zusammen mit einer *twist* Sonde (b, blau). Als AP-Substrat wurde zunächst BMpurple und als zweites BCIP verwendet. Ein Transversalschnitt (b', 40  $\mu$ m) durch die Neuralleistenregion zeigt, dass die Expressionsdomänen von *Xphb1* (violette Pfeilspitze) und *twist* (blaue Pfeilspitze) sich zum Teil in den NLZ überlappen (Pfeil). (Maßstab 400  $\mu$ m).

*Xphb1* wird während der gesamten frühen Embryonalentwicklung von *X. laevis* exprimiert. Die spezifische Expression in den cranialen NLZ, die durch eine Doppelfärbung mit *twist* nachgewiesen wurde, führte zur Überlegung, ob eine Depletion von *Xphb1* Auswirkungen auf die Neuralleistentwicklung hat.



## 5.2.2 Die Überexpression von Xphb1 führt konzentrationsabhängig zu unterschiedlichen Phänotypen

Mittels Funktionsgewinn-Studien sollte die Funktion von Xphb1 in der Neuralleistenentwicklung analysiert werden. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen an Xphb1 mRNA animal in eine Blastomere von 2-Zell Embryonen injiziert. Die Analyse erfolgte im St. 18 anhand *in situ* Hybridisierung mit dem Neuralleisten-Markergen *twist*. Zur Injektionskontrolle wurde jeweils 50 pg  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) DNA koinjiziert. Da nur in eine Blastomere injiziert wurde, ist nur eine Körperhälfte des Embryos betroffen und diese wird durch eine blaue Färbung markiert. Als zusätzliche Kontrolle wurde  $\beta$ -Gal alleine injiziert ( $\beta$ -gal).



**Abb. 5-4: Xphb1 beeinflusst die Expression von *twist* konzentrationsabhängig.** ISH im St.18. Die einseitige Injektion von 500 pg und 700 pg Xphb1 mRNA führt zu einer Verstärkung des *twist* Signals, wobei jedoch nur der Effekt von 700 pg Xphb1 statistisch signifikant ist. Die Injektion von 1 ng Xphb1 mRNA führt dagegen zu einer Reduktion der *twist* Expression. Sternchen und  $\beta$ -Gal Färbung markieren die injizierte Seite. (n = Anzahl analysierter Embryonen, \* p < 0,05, \*\* p < 0,005).

Zur Quantifikation wurden mindestens drei Gelege unabhängig voneinander ausgewertet und gemittelt. Zusätzlich ist der Standardfehler und die Signifikanz, berechnet mittels Student T-Test, angezeigt. Die Expression von *twist* wird als „unbeeinflusst“ angegeben, wenn die Expression auf der injizierten Seite

vergleichbar mit der nicht injizierten Seite ist. Ist die Expression auf der injizierten Seite schwächer, wird sie als „reduziert“ ausgewertet und entsprechend für eine „verstärkte“ Expression. In allen folgenden Experimenten, in denen die Analyse mittels *in situ* Hybridisierung erfolgt, wurden die Injektionen und die Quantifikation entsprechend durchgeführt.

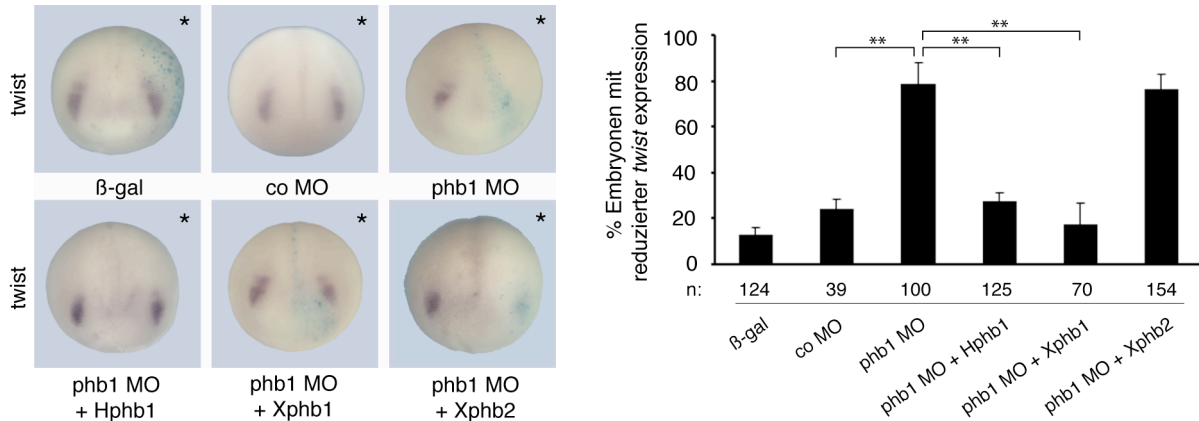
Durch die Injektion von 500 pg Xphb1 mRNA wurde die Expression von *twist* in ca. 30% der Embryonen verstärkt, was sich jedoch als statistisch nicht signifikant erwies. Im Fall von 700 pg Xphb1 stieg die Anzahl der Embryonen mit verstärkter *twist* Expression jedoch signifikant an. Überraschenderweise führte die Erhöhung der Xphb1 Konzentration auf 1 ng zu einer sehr signifikanten Reduktion des *twist* Signals (Abb. 5-4).

Festzuhalten ist, dass die Wirkung von Xphb1 auf die Neuralleisten bei niedrigeren Konzentrationen aktivierend ist, während sich der Einfluss bei einer hohen Konzentration umkehrt und Xphb1 inhibitorisch wirkt.

### **5.2.3 Xphb1 wird für die Entwicklung der cranialen NLZ benötigt**

Die Funktion von Xphb1 kann mittels Funktionsverlust-Studien verifiziert werden. Hierfür wird mittels Morpholino-induziertem knockdown die Proteinsynthese von Xphb1 inhibiert und die Auswirkungen auf die Expression von *twist* untersucht. Als negativ Kontrolle wurde ein 3'Carboxyfluorescein-getaggttes Standard Kontroll Morpholino (co MO) von Gene Tools verwendet, welches keine spezifische Bindestelle besitzt und anhand seiner Fluoreszenz detektiert wird. Die Injektion des phb1 MO führte in 80% der Embryonen zur Reduktion des *twist* Signals auf der injizierten Seite, wohingegen *twist* durch das co MO nicht beeinflusst wurde.

Die Spezifität eines Morpholino-induzierten knockdowns kann durch Rekonstitutionsexperimente verifiziert werden. Die Koinjektion des phb1 MO zusammen mit mRNA, die für humanes phb1 kodiert, sowie Xphb1 mRNA, der die Bindestelle für das phb1 MO fehlt, führte zur Rekonstitution von *twist*. Bemerkenswert ist, dass die Expression von *twist* durch die Koinjektion von Xphb2 nicht wieder hergestellt wurde (Abb. 5-5).



**Abb. 5-5: Xphb1 wird für die Expression von *twist* benötigt.** ISH im St. 18. Die einseitige Injektion des *phb1* MO (16 ng), jedoch nicht eines Kontroll Morpholinos (co MO; 0,5 mM), führt zur Reduktion der *twist* Expression. Durch die Koinjektion von 700 pg humanem *phb1* (Hphb1), sowie durch Xphb1 mRNA (700 pg), der die Bindestelle für das *phb1* MO fehlt, kann die Expression von *twist* rekonstituiert werden. Dies ist bei Koinjektion von Xphb2 mRNA (700 pg) nicht der Fall. Sternchen und  $\beta$ -Gal Färbung markieren die injizierte Seite. (n = Anzahl analysierter Embryonen, \*\* p < 0,005).

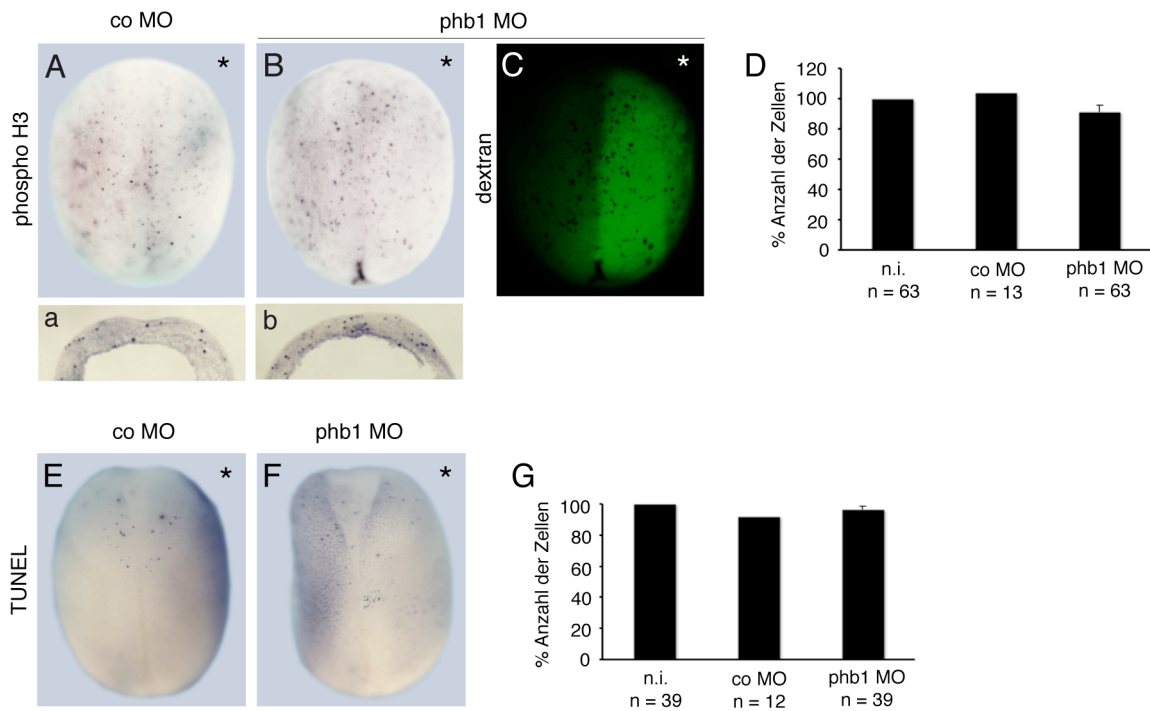
#### 5.2.4 Xphb1 reguliert weder Proliferation noch Apoptose

Aus Untersuchungen mit Säuger-Zelllinien ist bekannt, dass *phb1* Zellproliferation und Apoptose reguliert (Joshi et al., 2003; McClung et al., 1989; Wang et al., 1999a+b). Beruht die *phb1* MO vermittelte Reduktion von *twist* auf einer Veränderung in der Zellproliferation bzw. dem Zelltod? Mittels phosphoH3 und TUNEL Färbung am ganzen Embryo kann der Einfluss einer Xphb1 Depletion auf Proliferation und Apoptose von NLZ untersucht werden.

Die Injektion erfolgte animal in eine Blastomere von 2-Zell Stadien und als Injektionskontrolle wurde Dextran-FITC verwendet (Abb. 5-6C).

Nach der Injektion eines co MO bzw. dem *phb1* MO wurden die Embryonen im St. 18 fixiert und proliferierende bzw. apoptotische Zellen angefärbt. Die gefärbten Zellen im Bereich der Neuralleisten wurden in beiden Körperhälften getrennt ausgezählt. Dabei wurde die Anzahl der Zellen auf der nicht injizierten Seite gemittelt und als 100% angegeben (Abb. 5-6D, G). Weder Proliferation, noch Apoptose wurden in den Neuralleisten durch den Xphb1 knockdown beeinträchtigt (Abb. 5-6). Von den

Embryonen mit phosphoH3 Färbung wurden zusätzlich Transversalschnitte durch die Neuralleistenregion angefertigt (Abb. 5-6a, b), die das Ergebnis bestätigten. Allerdings konnte die injizierte Seite hier nicht dargestellt werden, da die Fluoreszenz des Dextran-FITC nach Anfertigung der Gewebeschnitte nicht mehr detektiert werden konnte.

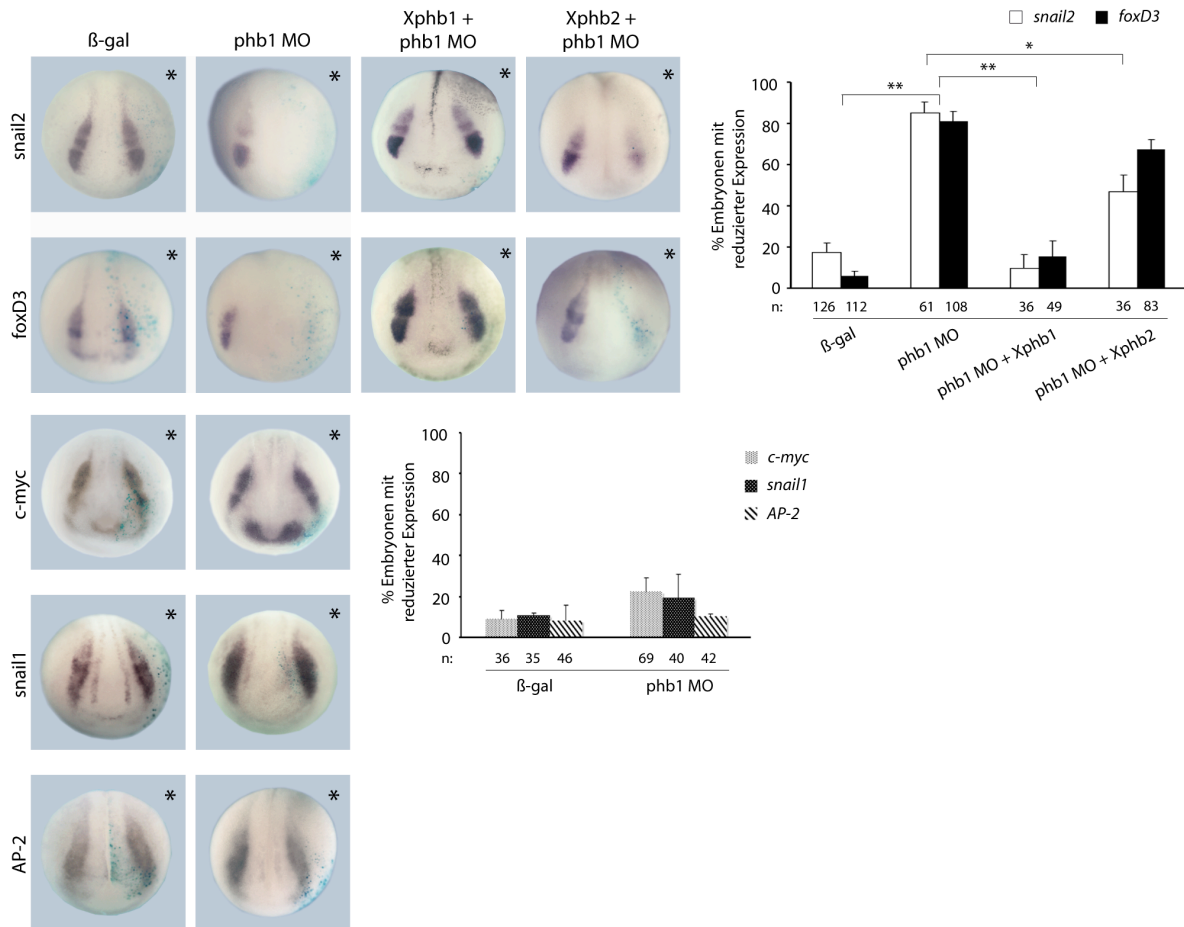


**Abb. 5-6: Xphb1 wirkt unabhängig von Proliferation und Apoptose. (A-C,a,b)** PhosphoH3 und (E, F) TUNEL Färbung mit einseitig injizierten Embryonen im St.18. Weder die Injektion des co MO (0,5 mM), noch des phb1 MO (16 ng) führt zu einer veränderten Anzahl an proliferierenden oder apoptotischen Zellen. Als Injektionskontrolle wurde Dextran-FITC verwendet (C). (a, b) Transversalschnitte durch die Neuralleistenregion. (D, G) Quantifizierung der phosphoH3 (D) und TUNEL (G) Färbung. Das Mittel der ausgezählten Zellen auf der nicht injizierten (n.i.) Seite wurde auf 100% gesetzt. Sternchen markieren die injizierte Seite. (n = Anzahl analysierter Embryonen).

### 5.2.5 Einordnung von *Xphb1* in die Hierarchie der Neuralleistengene

Zur Einordnung von *Xphb1* in die Hierarchie der Neuralleistengene wurden epistatische Experimente durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss einer *Xphb1* Depletion auf verschiedene Markergene untersucht.

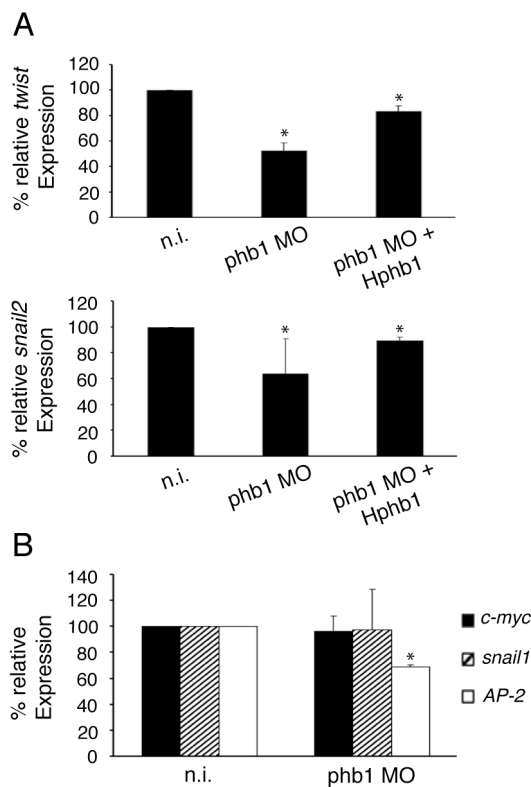
## Ergebnisse



**Abb. 5-7: Ein Xphb1 knockdown inhibiert die Expression von *snail2* und *foxD3*, wohingegen *c-myc*, *snail1* und *AP-2* unbeeinflusst bleiben.** ISH im St.18. Die einseitige Injektion des phb1 MO (16 ng) führt zum Verlust der *snail2* und *foxD3* Expression. Die Expression von *snail2* und *foxD3* wird durch Koinjektion von Xphb1 mRNA (700 pg) wieder hergestellt werden. Durch die Koinjektion von Xphb2 mRNA (700 pg) wird die Expression von *snail2* nur geringfügig und die Expression von *foxD3* nicht wieder hergestellt. Die Expression von *c-myc*, *snail1* und *AP-2* bleibt unbeeinflusst nach Injektion des phb1 MO. Sternchen und β -Gal Färbung markieren die injizierte Seite. (n = Anzahl analysierter Embryonen, \*\* p < 0,005, \* p < 0,05).

Ganzkeimfärbungen an einseitig mit phb1 MO injizierten Embryonen zeigten eine Reduktion des *snail2* und *foxD3* Signals. Dies wurde durch Koinjektion von Xphb1 mRNA wieder rekonstituiert. Die Expression von *snail2* konnte durch Koinjektion von Xphb2 mRNA geringfügig wiederhergestellt werden und die Expression von *foxD3* wurde nicht gerettet. Die Markergene *c-myc*, *snail1* und *AP-2* wurden durch die Xphb1 Depletion nicht beeinflusst (Abb. 5-7).

Diese Ergebnisse wurden mittels real-time PCR verifiziert. Dazu wurden Embryonen animal in beide dorsalen Blastomere von 4-Zell Stadien injiziert und die Gesamt-RNA aus jeweils drei Embryonen im St. 18 isoliert. Die relative Expression der Markergene wurde im Vergleich zum Haushaltsgen ODC (Ornithin Dexarboxylase) ausgewertet. Dabei wurden die Werte der nicht injizierten Embryonen (n.i.) normiert.



**Abb. 5-8: Real-time PCR Analysen.**

Die Injektion erfolgte in die dorsalen Blastomere von 4-Zell Embryonen. Gesamt-RNA wurde aus jeweils 3 Embryonen im St. 18 isoliert. **(A)** Die relative Expression von *twist* und *snail2* wird durch die Injektion des phb1 MO (16 ng) reduziert, was durch Koinjektion von Hphb1 RNA (700 pg) wieder umgekehrt wird. **(B)** Es tritt keine Veränderung der *c-myc* und *snail1* Transkripte auf, die Menge an *AP-2* nimmt jedoch leicht ab. Die Werte der nicht injizierten Embryonen (n.i.) wurden auf 100% gesetzt. (\*  $p \leq 0,1$ ).

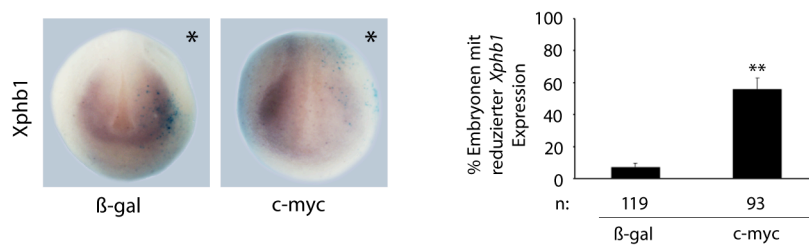
Embryonen, die mit phb1 MO injiziert wurden zeigten eine Reduktion der relativen Expression von *twist* (50%) und *snail2* (40%), was durch die Koinjektion von Hphb1 mRNA wieder umgekehrt wurde, so dass die Reduktion bei weniger als 15% lag. (Abb.5-8A). Die Menge an *c-myc* und *snail1* Transkripten veränderte sich nicht, es konnte jedoch eine leichte Reduktion von *AP-2* (30%) festgestellt werden, die in der Ganzkeimfärbung nicht sichtbar war (Abb. 5-8B, vergleiche Abb. 5-7).

### 5.2.6 Xphb1 -abhängige und -unabhängige *c-myc* Zielgene

Das Protoonkogen *c-myc* wird für die Expression von *twist* und anderen Neuralleistengenen benötigt, spielt jedoch erstaunlicherweise keine Rolle in der Regulation der Zellproliferation (Bellmeyer et al, 2003). Eine Xphb1 Depletion führte

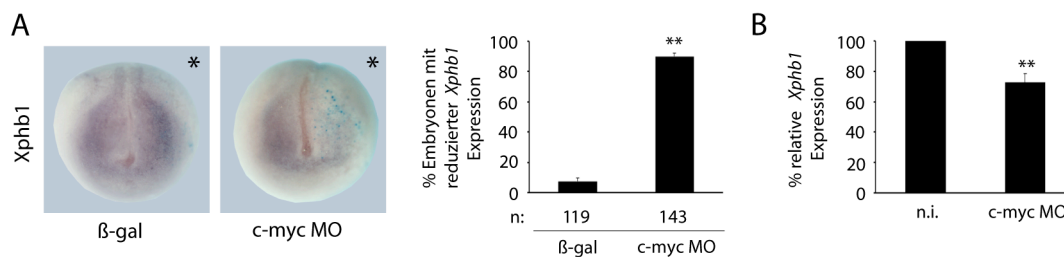


zu einem Verlust von *twist*, wohingegen die Expression von *c-myc* unbeeinflusst blieb. Aus diesem Grund wurde im Folgenden untersucht, ob *Xphb1* durch *c-myc* reguliert wird. In einer Funktionsgewinnstudie wurde zunächst *c-myc* mRNA injiziert und die Auswirkungen auf die Expression von *Xphb1* untersucht. Die Überexpression von *c-myc* führte im St. 18 zu einem signifikanten Anstieg an Embryonen, die ein reduziertes *Xphb1* Signal auf der injizierten Seite aufwiesen (Abb. 5-9).



**Abb. 5-9: Die Überexpression von c-myc reprimiert die Expression von *Xphb1*.** ISH im St. 18. Die halbseitige Injektion von *c-myc* RNA (500 pg) führt zu einer Reduktion der *Xphb1* Expression. Sternchen und β-Gal Färbung markieren die injizierte Seite. (n = Anzahl analysierter Embryonen, \*\* p< 0,005).

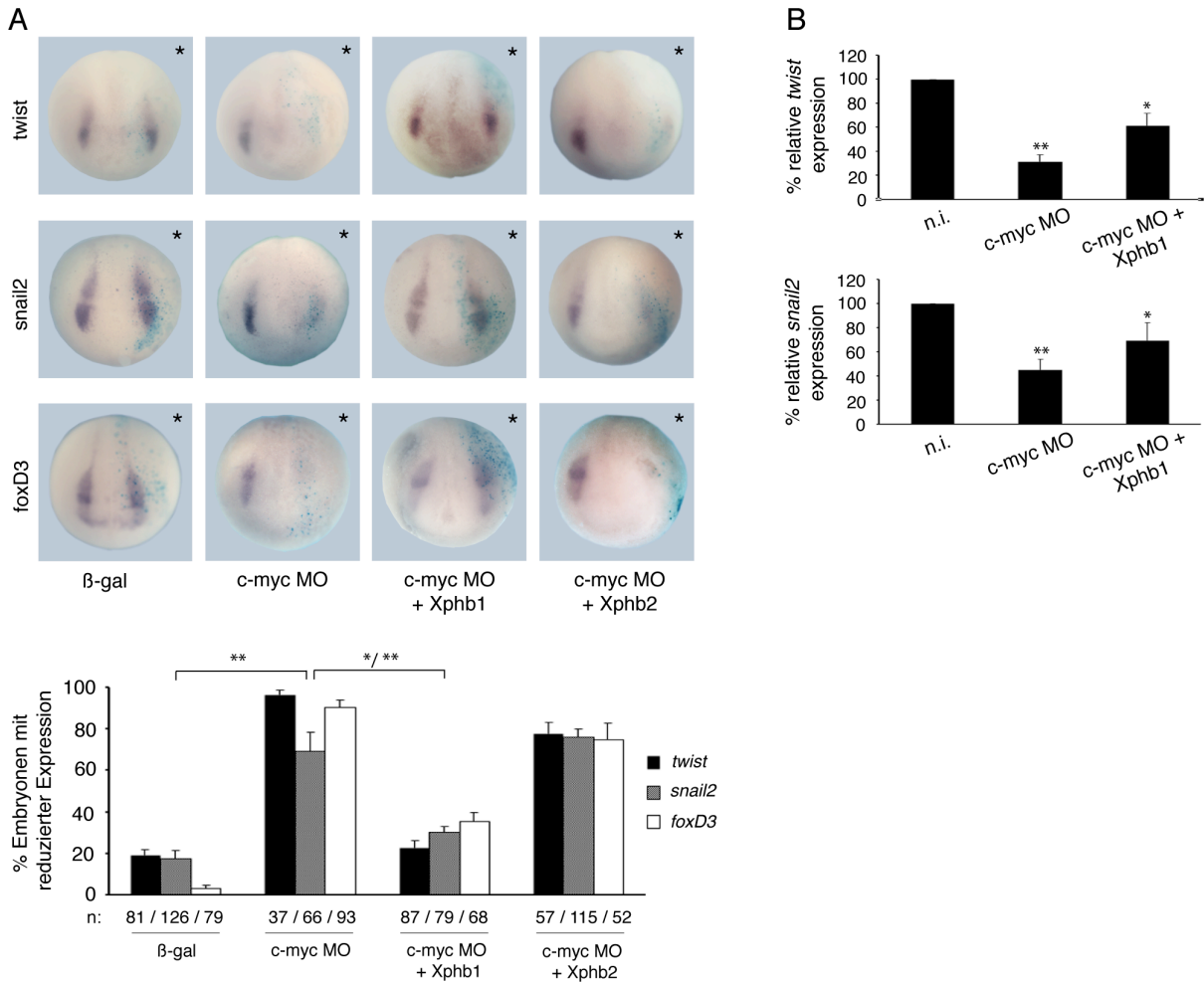
Für eine Funktionverlust-Studie wurde ein gegen *c-myc* gerichtetes Morpholino-Oligonukleotid (*c-myc* MO) verwendet. Die einseitige Injektion des *c-myc* MO führte im St. 18 zu einer Reduktion der *Xphb1* Expression in den Neuralleisten (Abb. 5-10A). Das konnte in real-time PCR Analysen bestätigt werden.



**Abb. 5-10: *Xphb1* steht in der Genhierarchie unterhalb von c-myc.** (A) ISH im St. 18. Die einseitige Injektion des *c-myc* MO (11 ng) führt auf der injizierten Seite zu einer Reduktion von *Xphb1*. Sternchen und β-Gal Färbung markieren die injizierte Seite. (n = Anzahl analysierter Embryonen). (B) Auch in real-time PCR Analysen wird die relative Expression von *Xphb1* durch den *c-myc* knockdown reduziert. Die RNA Isolation erfolgte aus jeweils 3 Embryonen im St. 18, denen das *c-myc* MO (11 ng) in beide dorsale Blastomere im 4-Zell Stadium injiziert wurde. Die Werte der nicht injizierten Embryonen (n.i.) wurden normiert. (\*\* p< 0,005).

Die relative Expression von *Xphb1* wurde durch einen c-myc knockdown um 30 % reduziert (Abb. 5-10B).

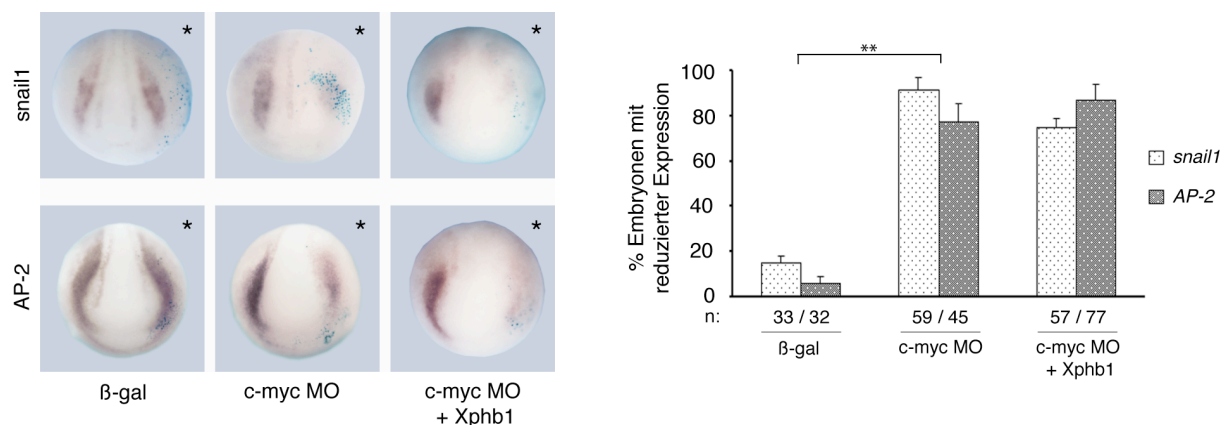
Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass *Xphb1* in der Genhierarchie unterhalb von *c-myc* steht. Sowohl durch eine Überexpression, als auch durch eine Depletion von *c-myc* wird *Xphb1* inhibiert.



**Abb. 5-11: *Xphb1* steht in der Genhierarchie unterhalb von *c-myc* und oberhalb von *twist*, *snail2* und *foxD3*.** (A) ISH im St. 18. Der durch c-myc MO (11 ng) induzierte Verlust von *twist*, *snail2* und *foxD3* (\*\*  $p < 0,005$ ) kann durch Koinjektion von *Xphb1* mRNA (700 pg; *twist*: \*\*  $p < 0,005$ , *snail2*: \*  $p < 0,05$ , *foxD3*: \*\*  $p < 0,005$ ), jedoch nicht *Xphb2* mRNA (700 pg), wieder hergestellt werden. Sternchen und  $\beta$ -Gal Färbung markieren die injizierte Seite. (n = Anzahl analysierter Embryonen). (B) In real-time PCR Analysen wird die relative Expression von *twist* und *slug* durch die Injektion des c-myc MO (11 ng) reduziert und mittels Koinjektion von *Xphb1* mRNA (700 pg) wieder hergestellt. Die RNA Isolation erfolgte aus jeweils 3 Embryonen im St. 18, die im 4-Zell Stadium in beide dorsale Blastomere injiziert wurden. Die Werte der nicht injizierten Embryonen (n.i.) wurden normiert. (\*\*  $p < 0,005$ , \*  $p \leq 0,1$ ).

Um zu zeigen, dass Xphb1 in der Genhierarchie zwischen *c-myc* und *twist* steht wurde das *c-myc* MO zusammen mit Xphb1 mRNA koinjiziert. Der knockdown von *c-myc* führte zum Verlust von *twist*, *snail2* und *foxD3*. Erstaunlicherweise konnte die Expression dieser Markergene durch Koinjektion von Xphb1 mRNA wieder hergestellt werden, wohingegen die Koinjektion von Xphb2 mRNA keine Wirkung zeigte (Abb. 5-11A). Die Resultate wurden ebenfalls mittels real-time PCR Analysen verifiziert. Ein *c-myc* knockdown führte zur Reduktion der relativen Expression von *twist* (70%) und *slug* (55%) und konnte durch Koinjektion von Xphb1 mRNA wieder umgekehrt werden (Abb. 5-11B).

Auch die Expression von *snail1* und *AP-2*, die durch einen Xphb1 knockdown nicht beeinflusst wurde, wurde durch die Injektion des *c-myc* MO reprimiert. Dies konnte allerdings durch Koinjektion von Xphb1 mRNA nicht rückgängig gemacht werden (Abb. 5-12).



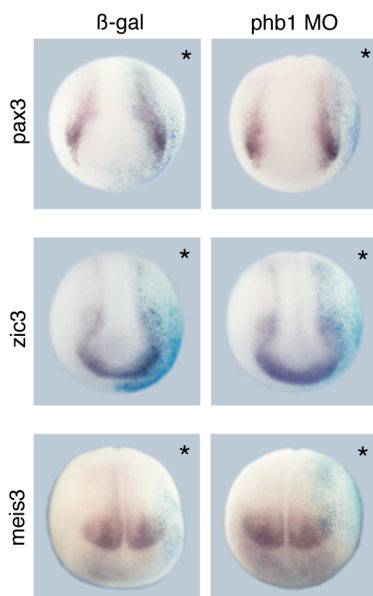
**Abb. 5-12: Die Regulation von *snail1* und *AP-2* durch *c-myc* ist unabhängig von *Xphb1*.** ISH im St.18. Die Injektion des *c-myc* MO (11 ng) führt zur Repression von *snail1* und *AP-2*, was durch Koinjektion von Xphb1 mRNA (700 pg) nicht verändert wird. Sternchen und β-Gal Färbung markieren die injizierte Seite. (n = Anzahl analysierter Embryonen, \*\* p < 0,005).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die untersuchten Markergene für NLZ durch *c-myc* reguliert werden und sich in Xphb1 -abhängige und -unabhängige *c-myc* Zielgene aufteilen lassen. Das bedeutet, *c-myc* wirkt über Xphb1 auf *twist*, *snail2* und *foxD3*, wogegen *snail1* und *AP-2* zwar auch durch *c-myc* reguliert werden, jedoch von Xphb1 nicht beeinflusst werden.

### 5.2.7 Der Einfluss von Xphb1 ist auf die Neuralleisten-Spezifikatoren beschränkt

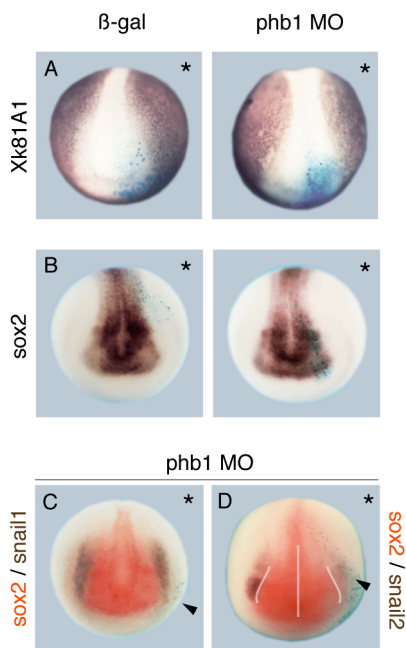
In der Hierarchie der Neuralleistengene stehen die Spezifikatoren der Neuralleistengrenze oberhalb von *c-myc* und den anderen Neuralleisten-Spezifikatoren (Abb. 1-6). Deshalb sollte untersucht werden, ob Markergene aus der Gruppe der Spezifikatoren der Neuralplattengrenze ebenfalls durch Xphb1 beeinflusst werden. Die Expression von *pax3*, *zic3* und *meis3* wird jedoch durch die einseitige Injektion des *phb1* MO nicht beeinflusst (Abb. 5-13).

Die Reduktion der Neuralleistenmarker kann auch auf eine Verschiebung der Neuralplattengrenze zurück zu führen sein. Das würde bedeuten, dass Xphb1 das Zellschicksal beeinflusst und anstatt NLZ ein neurales Schicksal induziert wird. Zur Analyse wurden Ganzkeimfärbungen mit dem neuralen Marker *sox2* und dem epidermalen Marker *cytokeratin Xk81A1* angefertigt.



**Abb. 5-13: Die Spezifikatoren der Neuralplattengrenze werden durch einen Xphb1 knockdown nicht beeinflusst.** ISH im St. 14. Die einseitige Injektion des *phb1* MO beeinflusst die Expression von *pax3*, *zic3* und *meis3* nicht. Sternchen und  $\beta$ -Gal Färbung markieren die injizierte Seite.

Weder die neurale *sox2*- exprimierende Region (Abb. 5-14B), noch die Grenze zur Epidermis, gezeigt durch den epidermalen Marker *cytokeratin Xk81A1* (Abb. 5-14A), wurde durch den Xphb1 knockdown verändert. In Doppelfärbungen mit *sox2* und *snail1* (Abb. 5-14C) bzw. *snail2* (Abb. 5-14D) wurde deutlich, dass sich die Grenze zwischen neuraler- und Neuralleistenregion nicht verschiebt. Die *snail1*- exprimierende Region wurde durch den Xphb1 knockdown nicht beeinflusst, während *snail2* reduziert wurde. Die *sox2*-exprimierende Domäne blieb jedoch in beiden Fällen unbeeinflusst.

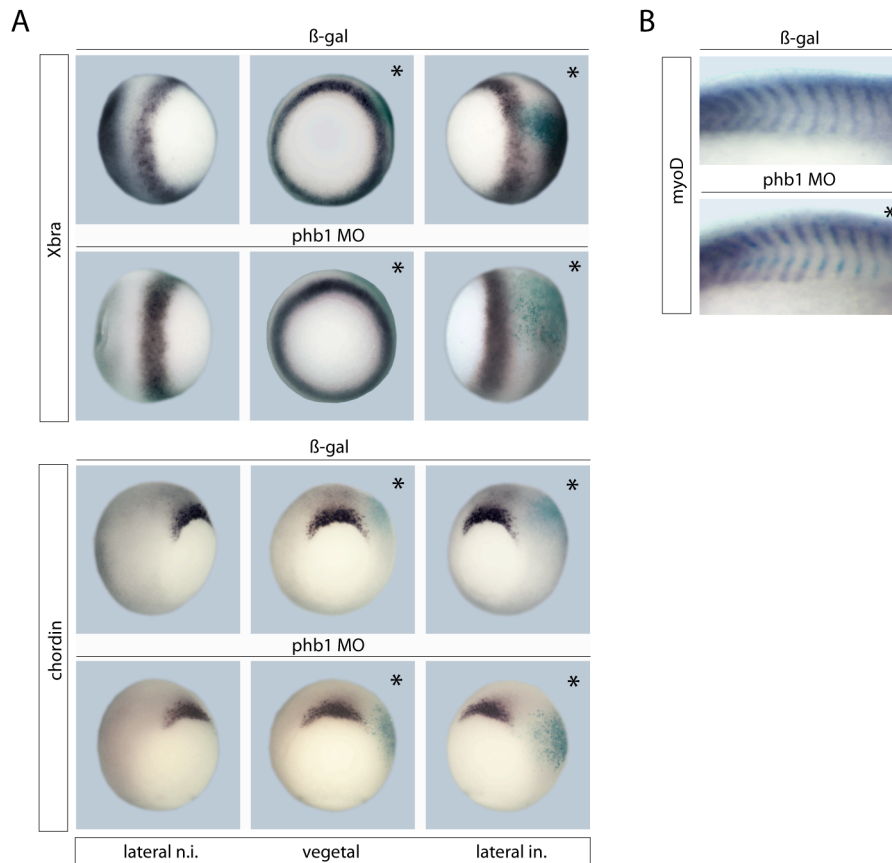


**Abb. 5-14: Die Neuralplattengrenze wird durch einen Xphb1 knockdown nicht beeinflusst.**

Weder die Expressionsdomäne von *Xk81A1* im St.16 (A) noch die von *sox2* im St. 18 (B) wird auf der *phb1* MO (16 ng) injizierten Seite beeinflusst. (C, D) Doppelfärbung im St. 18. Die *snail1*-exprimierende Region liegt direkt neben der *sox2* Domäne. Beide werden nicht beeinflusst durch die Injektion des *phb1* MO (C; rot: *sox2*, violett: *snail1*, die Pfeilspitze markiert die blaue  $\beta$ -Gal Färbung). Die *snail2* Expression ist auf der *phb1* MO injizierten Seite reduziert (Pfeilspitze), während die *sox2* Domäne (weiße Markierungen) unbeeinflusst bleibt (D; rot: *sox2*, violett: *snail2*). Sternchen und  $\beta$ -Gal Färbung markieren die injizierte Seite.

Um auszuschließen, dass die Effekte des *phb1* MO auf die Neuralleistenentwicklung durch vorzeitige Defekte im sich entwickelnden Mesoderm hervorgerufen werden, wurden weitere Funktionsverluststudien mit Markergenen des Mesoderms durchgeführt. Durch die einseitige Injektion des *phb1* MO wurde jedoch weder die Expression von *Xbra* im gesamten Mesoderm, noch die von *chordin* im dorsalen Mesoderm beeinflusst (Abb. 5-15A). Auch die Entwicklung des Mesoderms wurde durch die Injektion des *phb1* MO nicht gestört. Die Expression des Muskel-spezifischen Markers *myoD* in den Somiten wurde im St. 26 nicht beeinflusst (Abb. 5-15B).

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass *Xphb1* spezifisch an der Regulation der Neuralleisten-Spezifikatoren und weniger an einer Veränderung des Zellschicksals beteiligt ist. Der Einfluss von *Xphb1* auf die Neuralleisten beruht außerdem nicht auf einem Defekt in der Mesodermentwicklung.



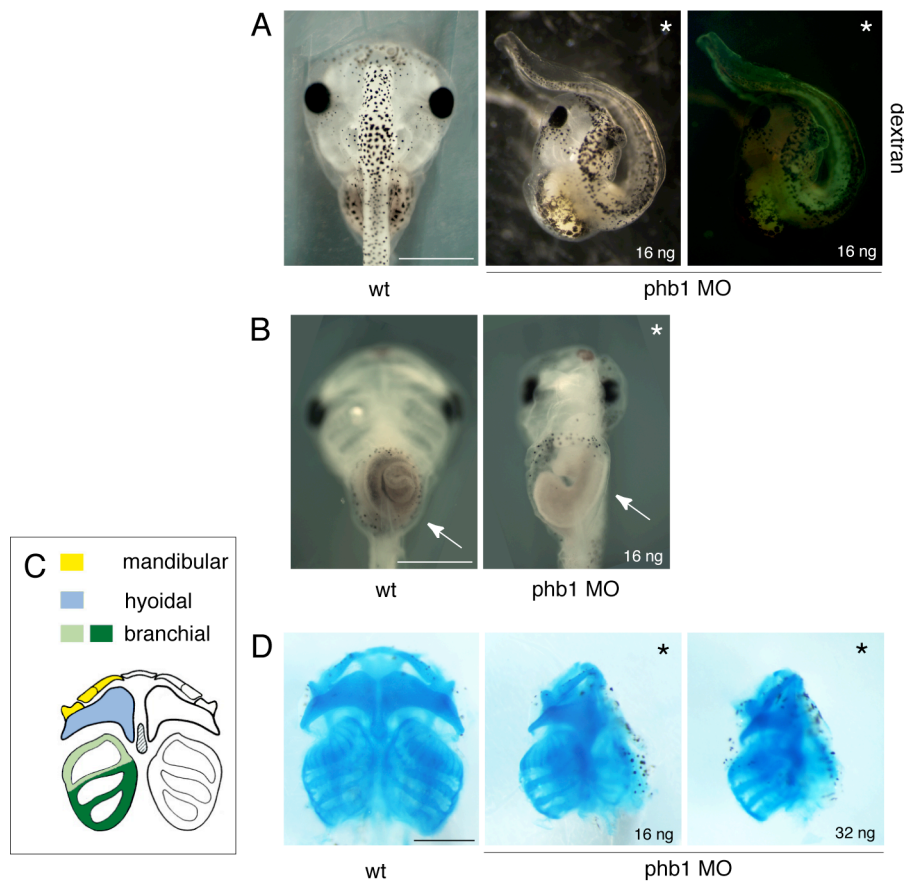
**Abb. 5-15: Das Mesoderm wird durch einen Xphb1 knockdown nicht beeinflusst. (A)** ISH im St. 10,5. Die Injektion des phb1 MO (16 ng) beeinflusst weder die Expression von *Xbra* noch die von *chordin*. Die linke und rechte Spalte zeigt jeweils die laterale Ansicht des Embryos in der Mitte, um die nicht injizierte Seite (lateral n.i.) und die injizierte Seite (lateral in.) zu verdeutlichen. **(B)** ISH im St. 26. Die Expression von *myoD* in den Somiten wird durch die Injektion des phb1 MO nicht beeinflusst (laterale Ansicht, anterior rechts). Sternchen und  $\beta$ -Gal Färbung markieren die injizierte Seite.

### 5.2.8 Xphb1 ist für die Ausbildung von Neuralleistenderivaten erforderlich

Craniale NLZ differenzieren an ihrem Zielort zu verschiedenen Zelltypen wie Melanozyten, Neuronen und Gliazellen des peripheren Nervensystems und bilden außerdem Gesichtsstrukturen wie Kiefer und Knorpel.

Um den Einfluss von Xphb1 auf die Entwicklung der Gesichtsknorpel zu untersuchen, wurde phb1 MO einseitig im 2-Zell-Stadium injiziert und die Embryonen bis St. 46 kultiviert. Die Injektionskontrolle erfolgte hier durch Dextran-FITC. Der

Xphb1 knockdown führte zu einer ausgeprägten Veränderung der gesamten Morphologie der injizierten Embryonen. Die Embryonen waren im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen (wt) insgesamt verkürzt und insbesondere der Kopf war stark verkleinert und asymmetrisch und die Ausbildung der Augen war gestört. Weiterhin konnte eine Krümmung der Embryonen zur injizierten Seite und eine Fehlbildung des Darms beobachtet werden (Abb. 5-16A, B).



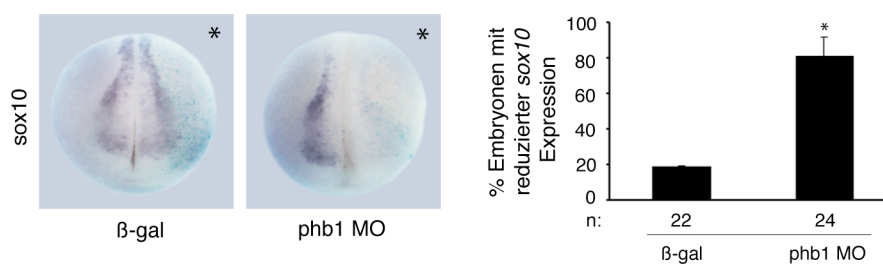
**Abb. 5-16: Xphb1 wird für die Ausbildung der gesamten Knorpelstruktur des Gesichts benötigt.** (A) Die Injektion des phb1 MO beeinflusst die Morphologie von Embryonen im St.46. Der Kopf ist stark verkleinert und asymmetrisch und die Augenentwicklung ist gestört. Zusätzlich ist der Schwanz verkürzt und die Embryonen sind zur injizierten Seite hin gekrümmt. Als Injektionskontrolle wurde Dextran-FITC (4 pg) injiziert (dorsale Ansicht). (B) Die Injektion des phb1 MO führt zu einer fehlerhaften Entwicklung des Darms (Pfeile; ventrale Ansicht, St. 46). (C) Schematische Darstellung der Knorpelstrukturen, verändert nach Baltzinger et al. (2005). Aus dem mandibularen Bogen (gelb) bildet sich unter anderem der Meckel'sche Knorpel, aus dem hyoidalen Bogen (blau) der ceratohyale Knorpel. Der anteriore (hell grün) sowie der posteriore (grün) branchiale Kiemenbogen differenzieren zu den ceratobranchialen Knorpeln der Kiemen. (D) Alcianblau Färbung von Embryonen im St. 46, ventrale Ansicht. Zur Vereinfachung wurden die Knorpel frei präpariert. In Wildtyp-

Embryonen (wt) sind die bilateral symmetrisch angelegten Knorpelstrukturen zu sehen. Die Injektion des phb1 MO (16 ng und 32 ng) führt zu einem kompletten Verlust des Meckel'schen Knorpels und der ceratohyalen Knorpel. Die ceratobranchialen Knorpel sind bei 16 ng phb1 MO insbesondere anterior stark reduziert. Bei 32 ng phb1 MO fehlen sowohl die anterioren als auch die posterioren ceratobranchialen Knorpelstrukturen. (Maßstab 1000 µm).

Mittels Alzianblau-Färbung konnte die Gesamtknorpelstruktur analysiert werden. NLZ, die die Gesichtsknorpel bilden, sind in drei Zonen organisiert. Die NLZ des mandibularen Bogens differenzieren zum Meckel'schen Knorpel, aus dem hyoidalen Bogen entsteht der ceratohyale Knorpel und die branchialen NLZ tragen zur Bildung der ceratobranchialen Knorpel der Kiemen bei (Abb. 5-16C).

Die Injektion des phb1 MO führte zu einem kompletten Verlust des Meckel'schen Knorpels und der ceratohyalen Knorpelstrukturen. Auch die Ausbildung der anterioren und posterioren ceratobranchialen Knorpelstrukturen der Kiemen war stark beeinträchtigt, wobei sich der Effekt durch eine höhere Konzentration an phb1 MO (32 ng) noch verstärkte (Abb. 5-16D).

Ein möglicher Einfluss von Xphb1 auf die Entwicklung der Melanozyten wurde anhand der Expression von *sox10* und *Trp2* analysiert. Die einseitige Injektion des phb1 MO führte im St. 18 zum Verlust der *sox10* Expression (Abb. 5-17) in den NLZ.

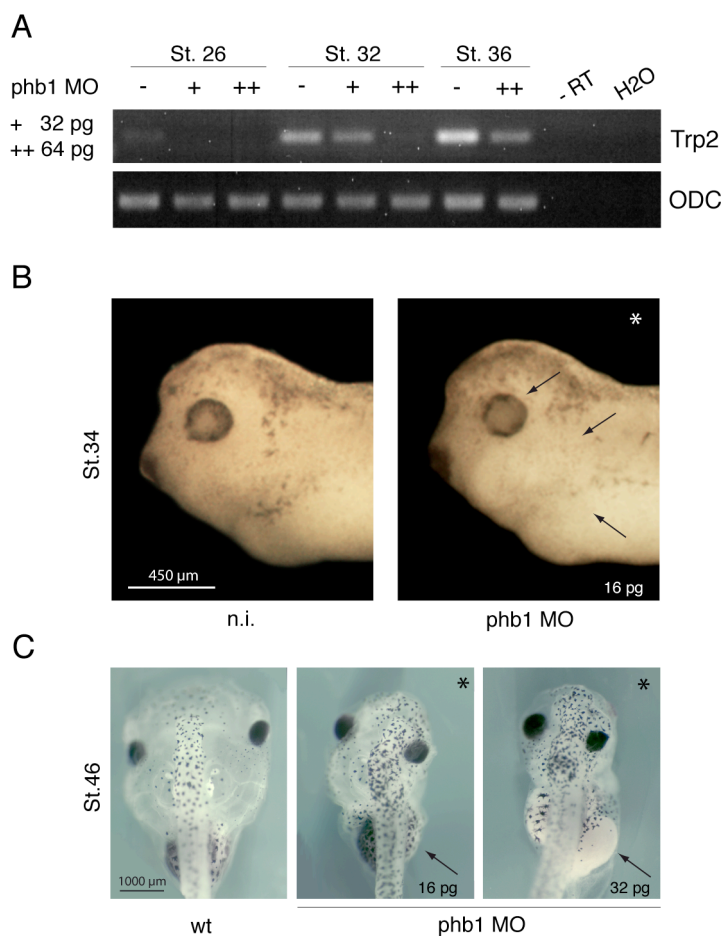


**Abb. 5-17: Sox10 wird durch eine Xphb1 Depletion reprimiert.** ISH im St. 18. Die Injektion des phb1 MO (16 ng) führt zum Verlust der *sox10* Expression. Sternchen und β-Gal Färbung markieren die injizierte Seite. (n = Anzahl analysierter Embryonen, \* p < 0,05).

Für RT-PCR Analysen wurden Embryonen im 2-Zell Stadium unterschiedliche Konzentrationen phb1 MO in beide Blastomere injiziert. Die RNA Isolation erfolgte aus jeweils 5 Embryonen in verschiedenen Stadien. Die Expression des Pigment-



spezifischen Markers *Trp2* wurde im Vergleich zum Haushaltsgen *ODC* (Ornithin Dexarboxylase) ausgewertet. Die Expression von *Trp2* konnte in Wildtyp-Embryonen (wt) ab St. 26 detektiert werden und verstärkte sich im Verlauf der Entwicklung. In allen gezeigten Entwicklungsstadien führte die Injektion des *phb1* MO im Vergleich zum Wildtyp zu einer reduzierten *Trp2* Expression (Abb. 5-18A). Im St. 26 führte bereits die niedrigere Konzentration (32 pg) zu einer vollständigen Repression. Dagegen konnte im St. 32 gezeigt werden, dass der Effekt konzentrationsabhängig ist. Die Injektion von 64 pg *phb1* MO verstärkte die Repression im Vergleich zu 32 pg deutlich.



**Abb. 5-18: Die Entwicklung der Pigmentzellen ist abhängig von Xphb1. (A)** RT-PCR. Der Pigment-spezifische Marker *Trp2* wird im Verlauf der Entwicklung durch Injektion des *phb1* MO konzentrationsabhängig reprimiert. -RT und H<sub>2</sub>O dienen als Negativkontrolle. **(B)** Embryonen im St. 34 zeigen auf der *phb1* MO injizierten Seite eine reduzierte Pigmentierung im Bereich der Kiemenbögen und der Retina (Pfeile). **(C)** Eine schwächere Pigmentierung auf der injizierten Seite ist in St. 46 hauptsächlich im Bereich des Darms zu sehen (Pfeile). Sternchen markieren die injizierte Seite.

Zusätzlich zu der PCR Analyse wurde die Pigmentierung an ganzen Embryonen in verschiedenen Stadien beobachtet. Im St. 34 zeigte sich unter anderem eine Pigmentierung im Bereich des Gehirns, der Branchialbögen und in der Retina. Die Pigmentierung wurde durch die Depletion von Xphb1 vor allem in der Retina und im Bereich der Branchialbögen schwächer (Abb. 5-18B, Pfeile). Im St. 46 war die Pigmentierung ausgeprägt und vor allem im Gehirn und dem Darm auffällig. Durch den Verlust der Gesichtsknorpel auf der phb1 MO-injizierten Seite war es nicht möglich eine Veränderung der Pigmentierung im Kopfbereich auszuwerten. Erstaunlich ist jedoch die verminderte Pigmentierung des Darms auf der injizierten Seite, wobei dieser Effekt durch eine höhere Konzentration (32 pg) des phb1 MO noch verstärkt wird (Abb. 5-18C, Pfeile).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Xphb1 knockdown-vermittelte Inhibierung der Neuralleistenspezifikation in Folge auch die Ausbildung von Neuralleisten-Derivaten, wie Gesichtsknorpel und Melanozyten blockiert wird.

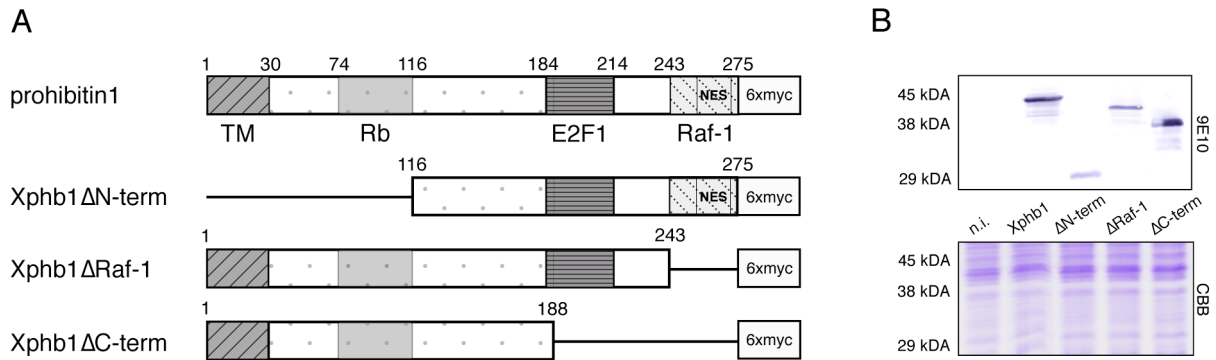
### **5.3 Aufklärung der Struktur-Funktionsbeziehung**

#### **5.3.1 Funktionelle Domänen von Xphb1**

Zur funktionellen Charakterisierung der Domänen von Xphb1 wurden verschiedene Deletionsmutanten hergestellt und auf ihre Fähigkeit untersucht als dominant-negative Mutante die Funktion des endogenen Proteins zu blockieren bzw. die Morpholino-induzierte Repression von endogenem Xphb1 zu retten. In Abb. 5-19A ist die schematische Darstellung der hergestellten Mutanten zu sehen. Die Mutante, bei der die TM-Domäne und die Rb-Bindedomäne deletiert wurde, wird mit Xphb1 $\Delta$ N-term bezeichnet. Der Mutante Xphb1 $\Delta$ Raf-1 fehlt C-terminal die Raf-1-Interaktionsdomäne und die NES. Diese beiden Domänen und zusätzlich die E2F1-Interaktionsdomäne wurden bei der Mutante Xphb1 $\Delta$ C-term deletiert.

Zur Detektion der mutierten Proteine wurden die Deletionskonstrukte C-terminal mit einem 6-fachen myc-Tag fusioniert und in einem Western Blot nachgewiesen (Abb. 5-19B). Dazu wurden die Deletionskonstrukte im 2-Zell Stadium in beide Blastomere injiziert. Aus jeweils fünf Embryonen im St. 18 wurden NOP-Lysate hergestellt und die

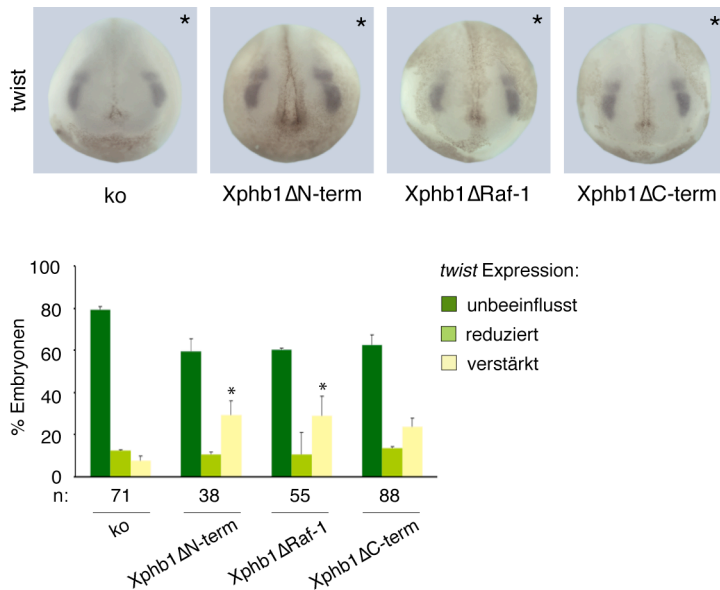
Proteine in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Kontrolle wurden Lysate aus nicht injizierten (n.i.) Wildtyp-Embryonen aufgetragen. Das Molekulargewicht des vollständigen Proteins (Xphb1) mit 6-fachem myc-Tag liegt bei ~42 kDa.



**Abb. 5-19: Deletionsmutanten von Xphb1.** (A) Schematische Darstellung der Proteindomänen von prohibitin1 (entsprechend der humanen Proteinstruktur) und der Xphb1 Deletionsmutanten (Xphb1ΔN-term: As 116-275, Xphb1ΔRaf-1: As 1-243, Xphb1ΔC-term: As 1-188). C-terminal sind alle Konstrukte mit einem 6-fachen myc-Tag (6xmyc) fusioniert. (B) Mittels Western Blot werden die Xphb1 Deletionsmutanten mit einem  $\alpha$ -myc (9E10) Antikörper detektiert. Wildtyp-Embryonen (n.i.) und eine Coomassie Brilliant Blue (CBB) Färbung dienen als Kontrolle.

Die Wirkung der Deletionsmutanten wurde in Funktionsgewinn-Studien anhand der Expression von *twist* analysiert. Die Injektion der Mutanten erfolgte im 2-Zell Stadium animal in eine Blastomere. Als Injektionskontrolle wurde Dextran-FITC koinjiziert, bzw. als Kontrolle (ko) alleine injiziert. Ebenso wie die Überexpression von Xphb1, führte auch die Überexpression der Mutanten Xphb1ΔN-term und Xphb1ΔRaf-1 zu einer signifikant höheren Anzahl an Embryonen, die eine leichte Vergrößerung der *twist*-exprimierenden Region aufwiesen (Abb. 5-20).

Keine der Mutanten erzielte eine Repression der *twist* Expression, vergleichbar mit dem Morpholino- induzierten Xphb1 knockdown.



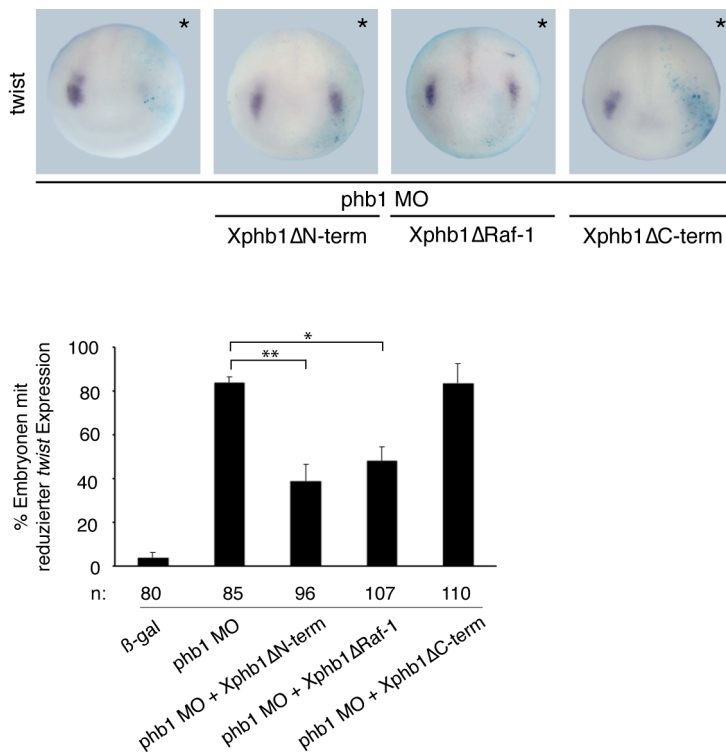
**Abb. 5-20: Überexpression der Xphb1 Deletionsmutanten.** ISH im St.18. Die halbseitige Injektion der Deletionsmutanten (700 pg) erfolgte zusammen mit Dextran-FITC (4 pg), welches alleine (ko) als Kontrolle injiziert wurde. Die Injektion von Xphb1ΔN-term und Xphb1ΔRaf-1 führt zu einem leichten, im Gegensatz zu Xphb1ΔC-term, jedoch signifikanten Anstieg der Embryonen mit einer verstärkten *twist* Expression. Sternchen markieren die injizierte Seite. (n = Anzahl analysierter Embryonen, \* p < 0,05).

### 5.3.2 Die E2F1-Interaktionsdomäne ist entscheidend für die Funktion von Xphb1

Keine der Deletionskonstrukte von Xphb1 wies eine dominant-negative Wirkung auf. Zur Analyse, welche Domäne von Xphb1 essentielle Funktionen in der Neuralleistenspezifikation vermittelt, wurden die Mutanten zusammen mit dem *phb1* MO koinjiziert. Kann der Morpholino-vermittelte Verlust der *twist* Expression wieder hergestellt werden, deutet das darauf hin, dass die deletierte Domäne keine entscheidende Funktion ausübt. Bleibt der Verlust von *twist* jedoch bestehen, wird die fehlende Domäne für die Regulation benötigt.

Die halbseitige Injektion des *phb1* MO führte zum Verlust der *twist* Expression, was durch Koinjektion von Xphb1ΔN-term und Xphb1ΔRaf-1 mRNA wieder hergestellt werden konnte. Die Koinjektion der Mutante Xphb1ΔC-term der die E2F1

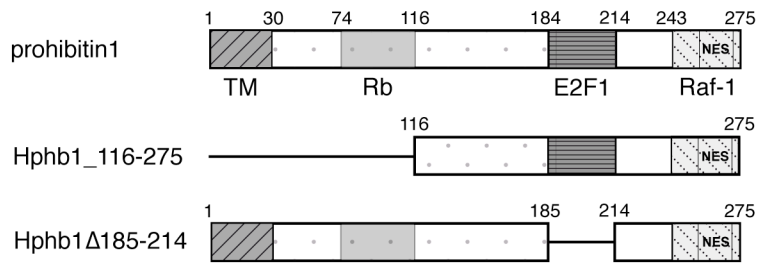
Interaktionsdomäne fehlt, konnte den Verlust des *twist* Signals dagegen nicht rückgängig machen (Abb. 5-21).



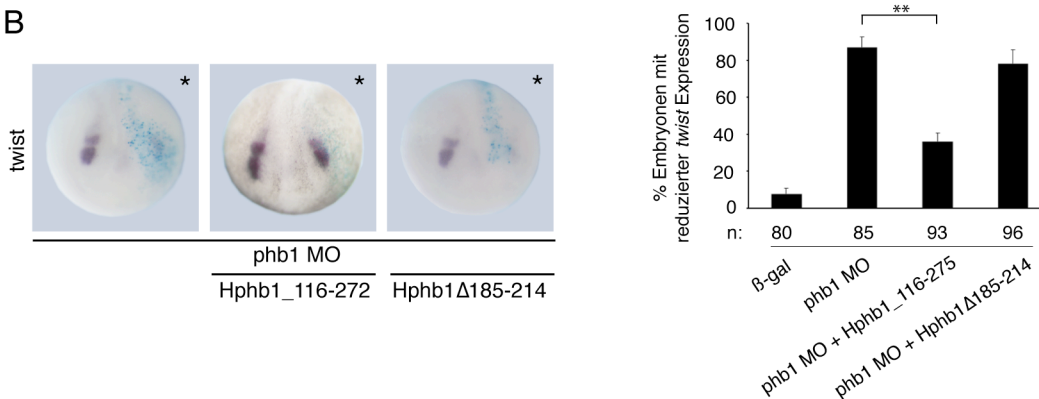
**Abb. 5-21: Die E2F1-Interaktionsdomäne hat eine essentielle Funktion in der Regulation von *twist*.** (A) ISH im St. 18. Jeweils 700 pg mRNA der Xphb1 Deletionsmutanten wurden zusammen mit dem phb1 MO (16 ng) halbseitig injiziert. Die Expression von *twist*, die durch den Xphb1 knockdown reprimiert wird, wird durch Koinjektion von Xphb1ΔN-term und Xphb1ΔRaf-1, jedoch nicht durch Xphb1ΔC-term wieder hergestellt. Sternchen und β-Gal Färbung markieren die injizierte Seite. (n = Anzahl analysierter Embryonen, \*\* p < 0,005, \* p < 0,05).

Zur Verifizierung wurden die Rekonstitutionsexperimente zusätzlich mit zwei humanen Deletionskonstrukten (Choi et al, 2008) durchgeführt. Die Mutante Hphb1\_116-275 entspricht dem Xphb1ΔN-term Konstrukt, da die TM-Domäne und die Rb-Bindedomäne deletiert sind. Entscheidend für die Untersuchung, ob die E2F1-Interaktionsdomäne essentiell ist, ist die Mutante Hphb1Δ185-214. Im Unterschied zu Xphb1ΔC-term, ist hier nur die E2F1-Interaktionsdomäne deletiert und die Raf-1-Interaktionsdomäne und die NES sind vorhanden (Abb. 5-22A).

A



B



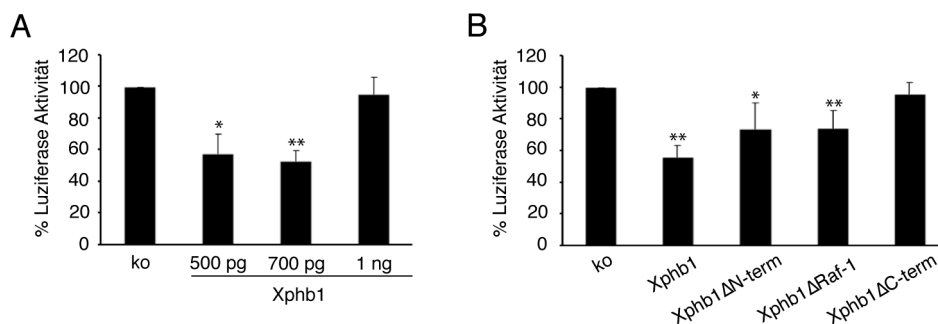
**Abb. 5-22: Die E2F1-Interaktionsdomäne ist essentiell.** (A) Schematische Darstellung der humanen Deletionsmutanten Hphb1\_166-275 und Hphb1Δ185-214 im Vergleich zum vollständigen Protein (oben). (B) ISH im St. 18. Das phb1 MO (16 ng) wurde zusammen mit je 700 pg mRNA der Deletionsmutanten halbseitig injiziert. Die Expression von *twist*, die durch den Xphb1 knockdown reprimiert wird, wird durch Koinjektion von Hphb1\_166-272, jedoch nicht durch Hphb1Δ185-214 wieder hergestellt. Sternchen und β-Gal Färbung markieren die injizierte Seite. (n = Anzahl analysierter Embryonen, \*\* p < 0,005).

Durch die Koinjektion von Hphb1\_116-275 wurde die durch das phb1 MO verursachte Reduktion des *twist* Signals rückgängig gemacht. Hphb1Δ185-214 konnte das *twist* Signal nicht wieder herstellen (Abb. 5-22B).

Die Resultate bestätigen die Aussage, dass die E2F1-Interaktionsdomäne von Xphb1 für die Regulation von *twist* benötigt wird.

### 5.3.3 Die Interaktion von Xphb1 und E2F1 in der Neuralleistenentwicklung

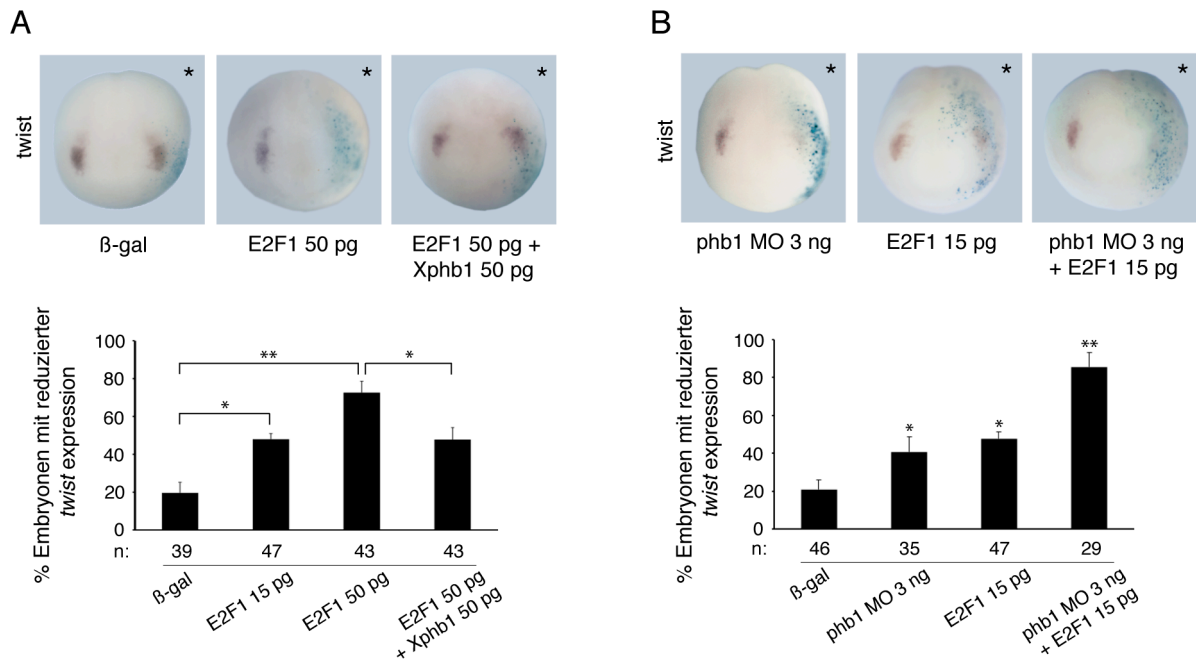
Die E2F1-Interaktionsdomäne von Xphb1 hatte sich in Rekonstitutionsversuchen als essentiell erwiesen. In humanen Tumorzelllinien wurde gezeigt, dass phb1 und E2F1 eine direkte Bindung über diese Domäne eingehen und phb1 somit die transkriptionelle Aktivität von E2F1 reprimiert (Choi et al, 2008; Wang et al., 1999a). Um die Frage zu klären, ob diese Interaktion auch im Embryo stattfindet, wurden Reportergeranalysen durchgeführt. Dazu wurde ein pFR-Luziferase *trans*-Reporter Plasmid zusammen mit einem Gal4-DBD-E2F1 Fusionskonstrukt (Choi et al., 2008) injiziert und die Aktivität der Luziferase gemessen. Dieser Wert diente als positiv Kontrolle und wurde jeweils auf 100% gesetzt. Als negativ Kontrolle wurde das pFR-Luziferase *trans*-Reporter Plasmid alleine injiziert (nicht gezeigt). Die Injektion erfolgte animal in eine Blastomere von 2-Zell Embryonen und die Analyse wurde im St. 18 durchgeführt. Durch die zusätzliche Injektion unterschiedlicher Konzentrationen von Xphb1 mRNA konnte der Einfluss von Xphb1 auf die transkriptionelle Aktivität von humanem E2F1 gezeigt werden.



**Abb. 5-23: Xphb1 wirkt über seine E2F1-Interaktionsdomäne reprimierend auf die transkriptionelle Aktivität von E2F1.** Reportergeranalyse an Embryonen im St. 18. Die Injektion erfolgte animal in eine Blastomere von 2-Zell Embryonen. Als positiv Kontrolle (ko) wurde Gal4-DBD-E2F1 DNA (50 pg) zusammen mit dem Reporter Plasmid (40 pg DNA) injiziert und die gemessene Luziferase Aktivität jeweils auf 100% gesetzt. **(A)** Die zusätzliche Injektion von 500 pg und 700 pg Xphb1 mRNA reprimiert die Luziferase Aktivität. Bei der Injektion von 1 ng findet keine Repression statt. **(B)** Zusätzlich wurden jeweils 700pg mRNA der Deletionskonstrukte injiziert. Die Luziferase Aktivität wird durch die Mutanten Xphb1ΔN-term und Xphb1ΔRaf-1, jedoch nicht durch Xphb1ΔC-term reprimiert. (\*\*  $p < 0,005$ , \*  $p < 0,05$ ).

Dies belegt, dass sich Xphb1 auch im Embryo konzentrationsabhängig auf die E2F1 Aktivität auswirkt. Durch die Injektion von 500 bzw. 700 pg Xphb1 mRNA sank die Luziferase Aktivität auf ca. 50%. Dies war nicht der Fall wenn 1 ng Xphb1 mRNA injiziert wurde (Abb. 5-23A). Zusätzlich wurde die Reporteranalyse mit den Xphb1 Deletionsmutanten durchgeführt. Dazu wurden jeweils 700 pg mRNA injiziert, da mit dieser Konzentration mit Xphb1 die stärkste Repression der Luziferase Aktivität erzielt werden konnte. Die Koinjektion der Mutanten Xphb1 $\Delta$ N-term und Xphb1 $\Delta$ Raf-1 führte ebenfalls zu einer signifikanten Repression der Luziferase Aktivität, wohingegen Xphb1 $\Delta$ C-term nicht dazu fähig war (Abb. 5-23B).

Das bedeutet, die Aktivität von E2F1 wird durch Xphb1 reprimiert, und die E2F1-Interaktionsdomäne wird dafür benötigt.



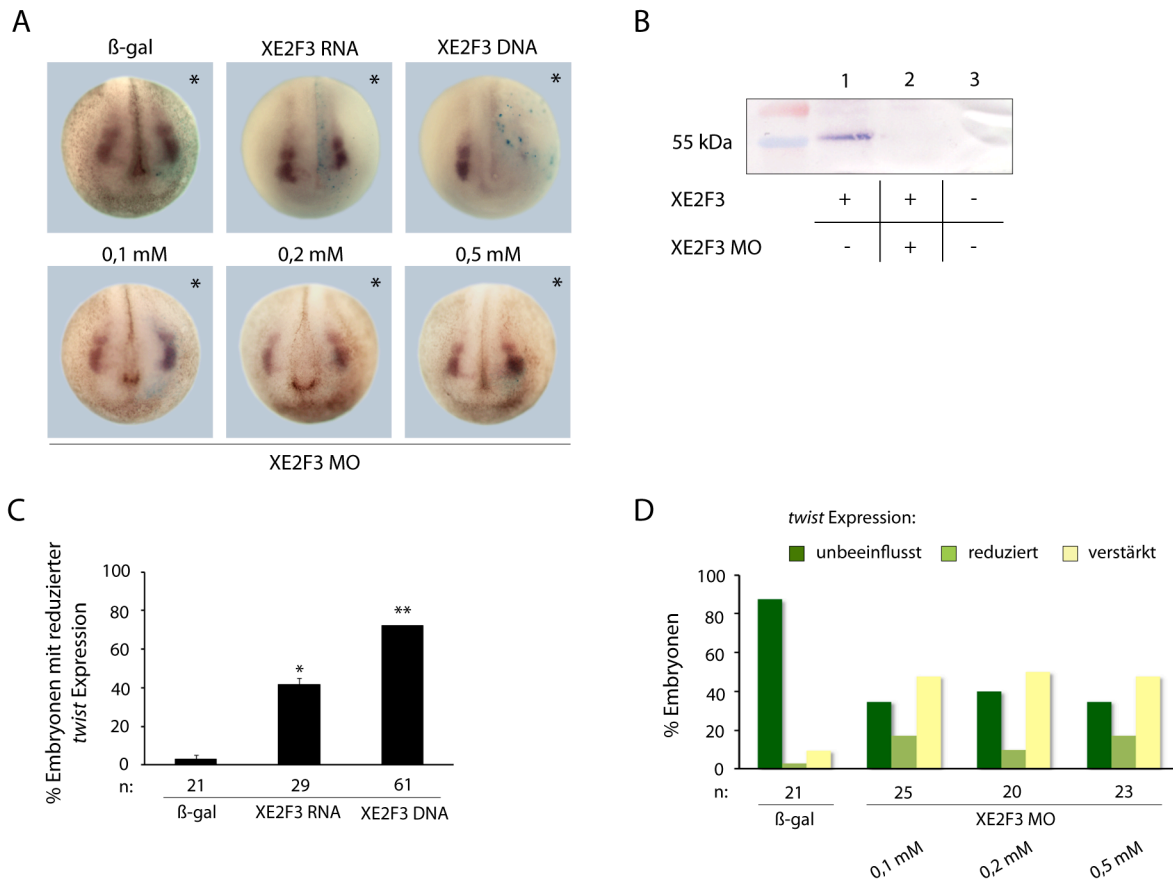
**Abb. 5-24: Xphb1 wirkt inhibitorisch auf die Aktivität von E2F1, welches wiederum die Expression von *twist* reprimiert.** ISH im St. 18. **(A)** Die Injektion von E2F1 DNA (15 bzw. 50 pg) führt konzentrationsabhängig zu einer Reduktion der *twist* Expression, was durch Koinjektion von Xphb1 mRNA (50 pg) wieder rückgängig gemacht wird. **(B)** Die Injektion des phb1 MO (3 ng) führt zu einer vergleichbaren Reduktion von *twist* wie die Injektion von E2F1 DNA (15 pg). Die Koinjektion beider wirkt synergistisch repressiv auf die Expression von *twist*. Sternchen und  $\beta$ -Gal Färbung markieren die injizierte Seite. (n = Anzahl analysierter Embryonen, \*\* p < 0,005, \* p < 0,05).



Dies führte zu der Frage, ob E2F1 eine Funktion in der Neuralleistenentwicklung ausübt und dabei mit Xphb1 interagiert. Zur Analyse wurden zunächst verschiedene Konzentrationen humaner E2F1 DNA halbseitig in 2-Zell Embryonen injiziert und anhand der Expression von *twist* ausgewertet. Die Injektion der E2F1 DNA führte konzentrationsabhängig zu einer Reduktion der *twist* Expression. Daraufhin wurde E2F1 DNA zusammen mit Xphb1 mRNA injiziert, wodurch die Expression von *twist* wieder hergestellt werden konnte (Abb. 5-24A). Die Expression von *twist* wird also durch E2F1 reprimiert, was durch die Wirkung von Xphb1 auf E2F1 blockiert wird. Die Koinjektion von E2F1 und phb1 MO wies eine synergistische Wirkung auf, indem die Anzahl an Embryonen mit einem reduzierten *twist* Signal sich deutlich erhöhte (Abb. 5-24B).

In der Entwicklung von *Xenopus* wurde ein homologes Protein XE2F3 identifiziert, das im Bereich der Neuralleisten und in den Kiemenbögen exprimiert wird (Suzuki and Hemmati-Brinvanlou, 2000). Daher stellte sich die Frage, ob XE2F3 eine vergleichbare Funktion wie das humane E2F1 ausübt.

Zur Analyse wurde XE2F3 mRNA bzw. DNA injiziert und anhand der Expression von *twist* ausgewertet. Sowohl die Injektion von mRNA als auch von DNA führte zu einer Reduktion des *twist* Signals auf der injizierten Seite, wobei die Injektion der XE2F3 DNA sich in einer höheren Anzahl von Embryonen mit einem verstärkten Effekt auswirkte (Abb. 5-25A, C). Zur Inhibierung von XE2F3 wurde ein *antisense* Morpholino Oligonukleotid hergestellt und für die spezifische Blockierung der Translation eingesetzt. Die Funktionalität des XE2F3 MO wurde in einem TNT® *in vitro* Translationsexperiment nachgewiesen, wobei das hergestellte Protein mit Biotin markiert und einem AP-gekoppelten Streptavidin Antikörper detektiert wurde. Im Western Blot zeigte sich, dass die Translation der XE2F3 Proteins durch Zugabe des XE2F3 MO blockiert wird (Abb. 5-25B). Die Injektion des XE2F3 MO erfolgte in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 mM entspricht ~3,5 ng) und die Auswirkungen wurden ebenfalls anhand der *twist* Expression untersucht. Die Injektion aller drei Konzentrationen führte in ~50% der Embryonen zu einer leichten Verstärkung des *twist* Signals auf der injizierten Seite (Abb. 5-25A, D).

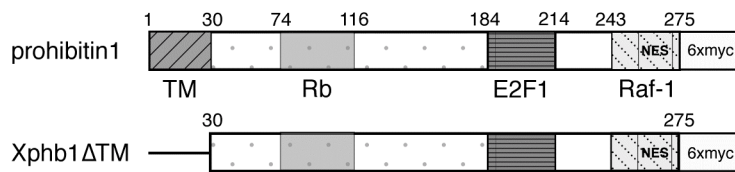


**Abb. 5-25: XE2F3 reguliert die Expression von *twist*.** (A) ISH im St. 18. (C, D) Quantifizierung der ISH. Die halbseitige Injektion von XE2F3 mRNA (200 pg) und DNA (50 pg) führt zu einer Reduktion der *twist* Expression (A, C). (B) TNT® *in vitro* Translation mit pGEM-T-XE2F3 (1, 2) in Anwesenheit bzw. Abwesenheit des XE2F3 MO. Zur Kontrolle wurde keine DNA zum Ansatz gegeben (3). Das XE2F3 MO blockiert die Translation von XE2F3 (2). Durch die Injektion unterschiedlicher Konzentrationen von XE2F3 MO steigt die Anzahl der Embryonen mit einer leicht verstärkten *twist* Expression in allen Fällen auf ~50% (A, D). Sternchen und β-Gal Färbung markieren die injizierte Seite. (n = Anzahl analysierter Embryonen, \*\* p< 0,005, \* p< 0,05).

Dies lässt die Vermutung zu, dass humanes E2F1 und *Xenopus* E2F3 homologe Funktionen ausüben. Eine Überexpression führt in beiden Fällen zur Blockierung des Neuralleisten-Spezifikators *twist*, während die Inhibierung von E2F1/XE2F3 für die Expression von *twist* benötigt wird.

### 5.3.4 Die subzelluläre Lokalisation von Xphb1 im Zusammenhang mit seiner Funktion

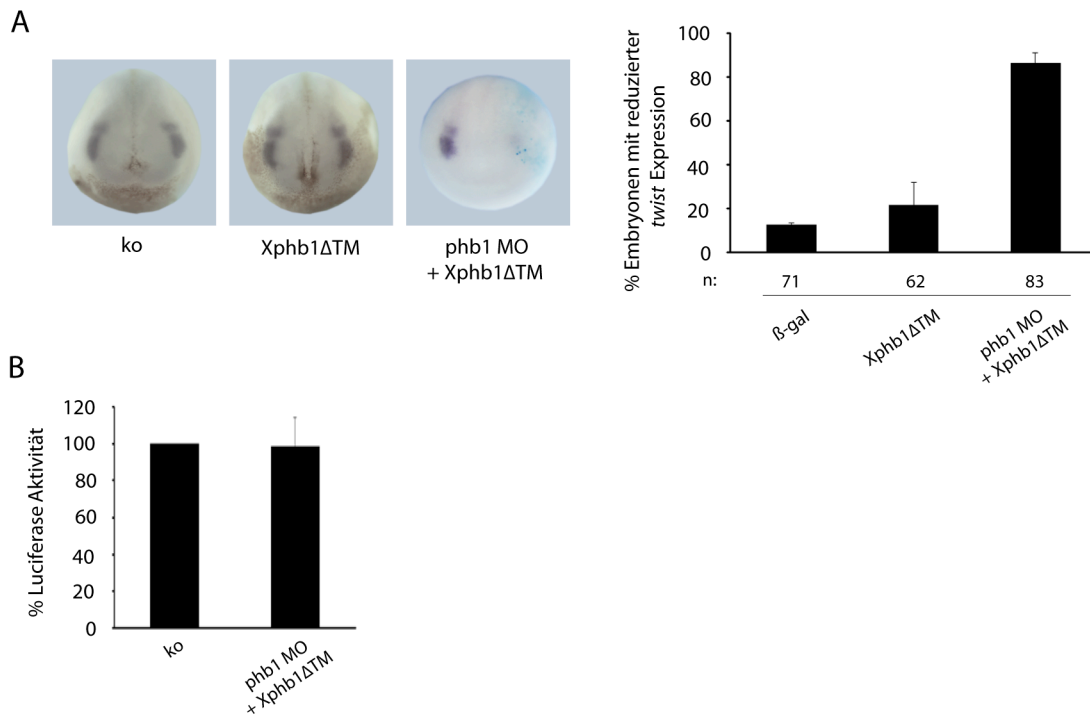
Es wurde eine weitere Deletionsmutante von Xphb1, Xphb1 $\Delta$ TM, hergestellt, die eine spezifische subzelluläre Lokalisation aufweisen sollte, da nur die TM-Domäne deletiert wurde (Abb. 5-26). Die Funktion von Xphb1 $\Delta$ TM wurde zunächst ebenfalls anhand der Expression von *twist* untersucht.



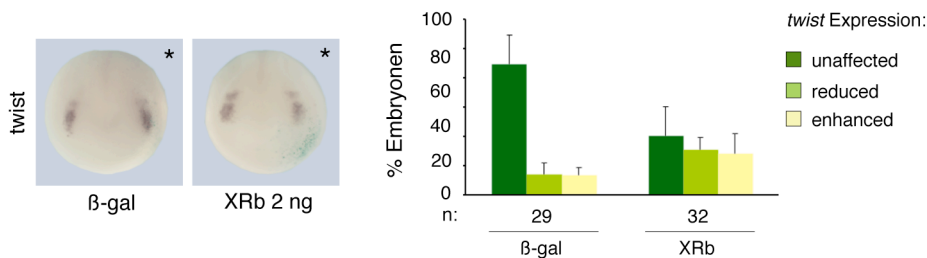
**Abb. 5-26: Schematische Darstellung der Mutante Xphb1 $\Delta$ TM.** Zum Vergleich ist die vollständige Proteinstruktur dargestellt (oben). In der Mutante Xphb1 $\Delta$ TM wurde die Transmembran Domäne (TM) von As 1-30 deletiert. C-terminal ist die Mutante mit einem 6-fachen myc-Tag fusioniert.

Die Injektion von Xphb1 $\Delta$ TM mRNA führte weder zu einer signifikanten Reduktion, noch einer Verstärkung des *twist* Signals im St. 18 (Abb. 5-27A). Für Rekonstitutionsversuche wurde Xphb1 $\Delta$ TM mRNA zusammen mit dem phb1 MO koinjiziert. Der durch das phb1 MO verursachte Verlust von *twist* konnte durch Xphb1 $\Delta$ TM jedoch nicht wieder hergestellt werden (Abb. 5-27A). Auch in Reporteranalysen zeigte sich, dass Xphb1 $\Delta$ TM keine Funktion ausübt, da die Aktivität von E2F1 nicht reprimiert wurde (Abb. 5-27B).

Der entscheidende Unterschied zwischen Xphb1 $\Delta$ TM und der Mutante Xphb1 $\Delta$ N-term, die den Verlust des *twist* Signals retten konnte, liegt im Vorhandensein der Rb-Bindedomäne. Rb ist, wie E2F1, ein Zellzyklusregulator und wird ebenfalls in den Neuralleisten exprimiert. Zur Untersuchung einer möglichen Funktion von Rb in der Neuralleistenentwicklung wurde XRb injiziert und anhand einer *twist* ISH ausgewertet. Die Expression von *twist* wurde durch die Überexpression von XRb in ca. 60% der Embryonen verändert. Dabei wurden zu ungefähr gleichen Teilen Embryonen, die ein reduziertes *twist* Signal aufwiesen, sowie Embryonen mit einem verstärkten *twist* Signal beobachtet. Keiner der Effekte erwies sich jedoch als statistisch signifikant. Es war allerdings erstaunlich, dass die Anzahl der Embryonen, die eine „unbeeinflusste“ Expression aufwiesen auf ca. 40% sank (Abb. 5-28).



**Abb. 5-27: Xphb1ΔTM zeigt keine Funktion.** (A) ISH im St. 18. Die Expression von *twist* wird durch die halbseitige Injektion von Xphb1ΔTM mRNA (700 pg) nicht beeinflusst. Der phb1 MO (16 ng) induzierte Verlust von *twist* wird durch Koinjektion von Xphb1ΔTM mRNA (700 pg) nicht wieder hergestellt. Sternchen und β-Gal Färbung markieren die injizierte Seite. (n = Anzahl analysierter Embryonen). (B) Reporteranalyse mit Embryonen im St. 18. Im 2-Zell Stadium wurde das Luciferase Reporter Plasmid (40 pg DNA) zusammen mit dem GAL4-DBD-E2F1 Fusionskonstrukt (50 pg DNA) (ko, normiert) und zusätzlich Xphb1ΔTM mRNA (700 pg) injiziert. Die Aktivität der Luziferase wird durch Xphb1ΔTM nicht reprimiert.



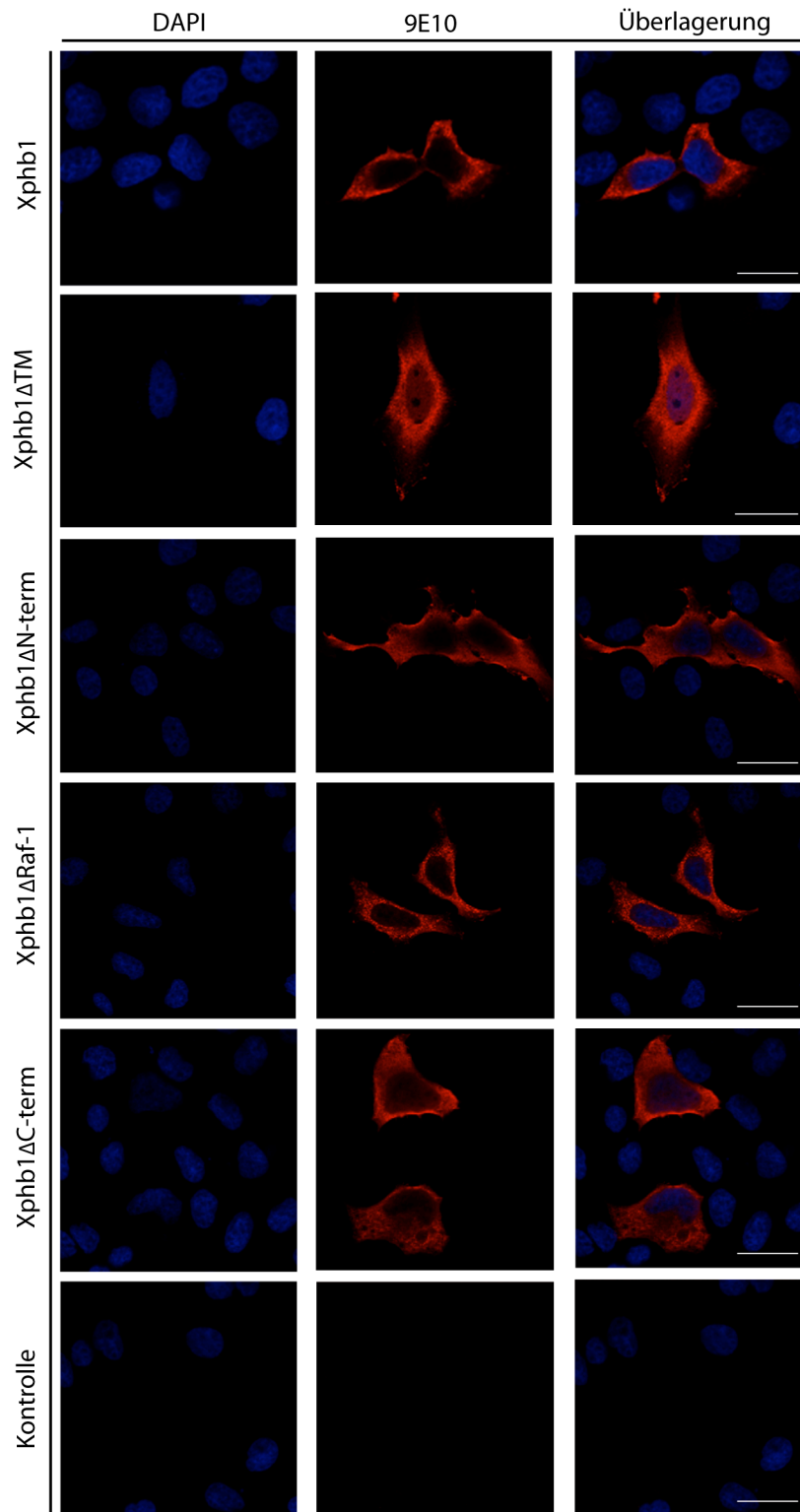
**Abb. 5-28: XRb hat keinen Einfluss auf die Expression von *twist*.** ISH im St. 18. Die halbseitige Injektion von XRb RNA (2 ng) führt weder zu einer signifikanten Reduktion noch Verstärkung des *twist* Signals. Sternchen und β-Gal Färbung markieren die injizierte Seite. (n = Anzahl analysierter Embryonen).

Da die Funktion von Rb und damit die Wirkung auf die Funktion von Xphb1 nicht ausschlaggebend zu sein schien, stellte sich die Frage, ob die Funktion der Deletionsmutanten mit der Lokalisation zusammen hängt. Um die subzelluläre Lokalisation von Xphb1 und den Deletionsmutanten zu untersuchen wurden zunächst Zellkulturstudien durchgeführt.

Dazu wurden die Xphb1 Konstrukte in HEK293 (human epithelial kidney) Zellen transfiziert und mittels Immunfärbung mit einem gegen den myc-Tag gerichteten Antikörper analysiert. Xphb1, sowie alle Mutanten wurden hauptsächlich im Cytoplasma detektiert. Die Mutanten Xphb1 $\Delta$ TM, Xphb1 $\Delta$ N-term und Xphb1 $\Delta$ C-term konnten jedoch zusätzlich im Nukleus detektiert werden, der mittels DAPI Färbung sichtbar gemacht wurde. Im Fall der Mutante Xphb1 $\Delta$ Raf-1 konnte nur eine schwache Kernfärbung detektiert werden (Abb. 5-29).

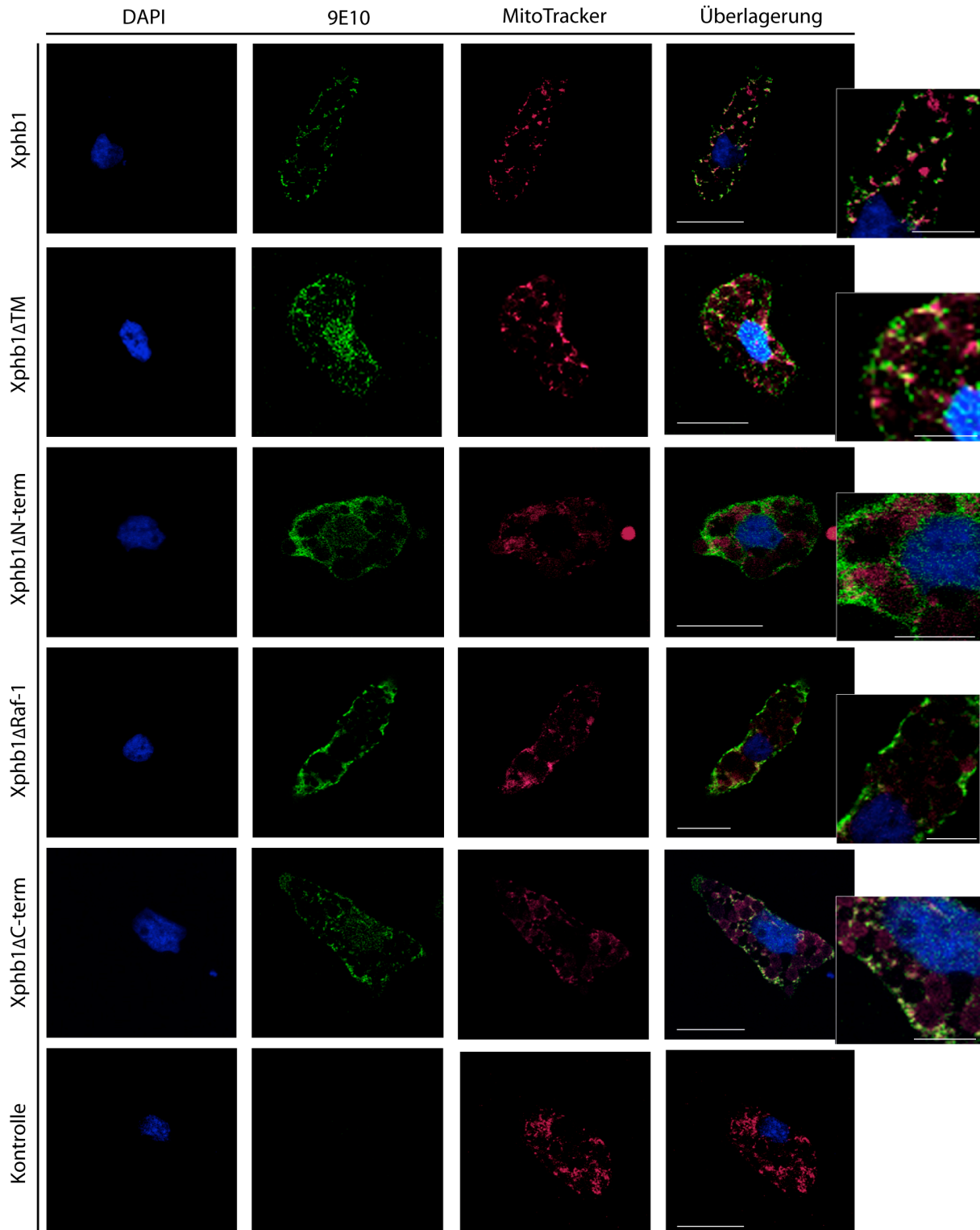
Um diese Resultate im Modellorganismus zu verifizieren, wurden Explantate von cranialen NLZ angefertigt. Die Xphb1 Konstrukte wurden im 2-Zell Stadium injiziert (700 pg) und die cranialen NLZ aus Embryonen im St. 16 explantiert. Die Kultivierung der Explantate erfolgte auf Fibronectin und nach der Fixierung wurde eine Immunfärbung mit einem gegen den myc-Tag gerichteten Antikörper (9E10) durchgeführt. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI und die Mitochondrien mit einem MitoTracker (Invitrogen) angefärbt. Die Auswertung erfolgte an einem konfokalen Mikroskop. Aus der Überlagerung der  $\alpha$ -myc Färbung und des MitoTrackers wurde deutlich, dass Xphb1 in cranialen NLZ hauptsächlich in Mitochondrien lokalisiert ist. In der Überlagerung bedeutet eine gelbe Färbung, dass das grün markierte Xphb1 Konstrukt kolokalisiert mit der roten Färbung der Mitochondrien auftritt (Abb. 5-30, siehe auch Vergrößerung). Xphb1 $\Delta$ TM wurde ebenfalls in den Mitochondrien detektiert, es trat jedoch zusätzlich eine dominante Färbung im Zellkern auf. Auch die Mutante Xphb1 $\Delta$ N-term war im Nukleus lokalisiert. Es konnte jedoch auch eine Färbung im Cytoplasma detektiert werden, die sich in der Überlagerung nur zu einem sehr geringen Teil den Mitochondrien zuordnen ließ. Dies war auch bei der Mutante Xphb1 $\Delta$ Raf der Fall, wobei hier keine Färbung im Zellkern beobachtet werden konnte. Xphb1 $\Delta$ Cterm war, ähnlich wie Xphb1 $\Delta$ N-term, sowohl im Zellkern, als auch in den Mitochondrien lokalisiert, wobei die Überlagerung mit der mitochondrialen Färbung hier deutlicher war (Abb. 5-30).

## Ergebnisse



**Abb. 5-29: Subzelluläre Lokalisation von Xphb1 in HEK293 Zellen.** Die transfizierten Konstrukte wurden mit einem  $\alpha$ -myc Antikörper (9E10) detektiert (rot). Der Nukleus wurde mit DAPI angefärbt (blau). Als Kontrolle wurden transfizierte Zellen nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Xphb1 ist hauptsächlich in Organellen im Cytoplasma lokalisiert. Dagegen können alle Mutanten zum Teil im Nukleus detektiert werden. In allen Fällen tritt jedoch weiterhin eine starke Färbung im Cytoplasma auf. (Maßstab 20  $\mu$ m).

## Ergebnisse



**Abb. 5-30: Subzelluläre Lokalisation von Xphb1 in cranialen NLZ.** Die Injektion von Xphb1 und den Deletionskonstrukten (700 pg) erfolgte einseitig im 2-Zell Stadium. Als Injektionskontrolle wurde Dextran-FITC (4 pg) koinjiziert. Die cranialen NLZ wurden im St. 16 explantiert und auf Fibronektin kultiviert. Die injizierten Konstrukte wurden mit einem  $\alpha$ -myc Antikörper (9E10) detektiert (grün). Der Nukleus wurde mit DAPI angefärbt (blau) und die Mitochondrien mit einem MitoTracker (magenta). Als Kontrolle wurde Xphb1 injiziert und nur

## Ergebnisse

mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Die Überlagerung von grün und magenta erscheint als gelbe Färbung (siehe Vergrößerungen). Xphb1 ist im Cytoplasma und überwiegend in den Mitochondrien lokalisiert. Dagegen befinden sich die Mutanten Xphb1 $\Delta$ TM, Xphb1 $\Delta$ N-term und Xphb1 $\Delta$ C-term hauptsächlich im Nukleus, ein großer Anteil ist jedoch weiterhin im Cytoplasma und in den Mitochondrien zu sehen. Xphb1 $\Delta$ Raf-1 ist nicht im Nukleus lokalisiert und auch eine Kolokalisation mit den Mitochondrien ist nicht deutlich. (Maßstab 20  $\mu$ m).

Die subzelluläre Lokalisation von Xphb1 und den Deletionsmutanten konnte hier nicht exakt bestimmt werden. In beiden Zellarten schien Xphb1, sowie alle Mutanten, hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert zu sein. In den NLZ Explantaten konnte zum Teil eine Lokalisation in den Mitochondrien gezeigt werden, wobei vor allem bei den Mutanten Xphb1 $\Delta$ N-term und Xphb1 $\Delta$ Raf-1 keine deutliche Kolokalisation zu sehen war. Die Mutanten Xphb1 $\Delta$ TM, Xphb1 $\Delta$ N-term und Xphb1 $\Delta$ C-term konnten in beiden Zellarten zusätzlich im Nukleus detektiert werden, während im Fall von Xphb1 $\Delta$ Raf-1 nur in den HEK293 Zellen eine schwache Kernfärbung auftrat.



## 6 Diskussion

Prohibitine sind multifunktionelle Proteine, die sowohl in den Mitochondrien, an der Plasmamembran und auch im Nukleus lokalisiert sind. Bislang wurde *phb1* als Regulator der Zellproliferation, Tumorigenese und der Lebensdauer von *C. elegans* beschrieben. In dieser Arbeit wird erstmalig gezeigt, dass prohibitin1 (*Xphb1*) in *Xenopus* für die Spezifizierung von NLZ essentiell ist. Es reguliert die Expression einer Untergruppe von Neuralleisten-Spezifikatoren, nämlich *twist*, *snail2* und *foxd3* und führt zu einer neuen Aufteilung in *Xphb1*-abhängige und -unabhängigen *c-myc* Zielgene. Dabei wird eine Repression von E2F1 durch *Xphb1* benötigt.

### 6.1 Der Einfluss von *Xphb1* auf die Neuralleistenentwicklung

*Xphb1* wird während der gesamten Embryonalentwicklung von *Xenopus* exprimiert und weist in den cranialen NLZ eine partielle Kolo-kalisation mit dem Neuralleisten-Spezifikator *twist* auf. Die Expression von *Xphb1* ist jedoch nicht auf den Bereich der Neuralleisten beschränkt, sondern findet sich auch in den angrenzenden epidermalen und neuralen Regionen. In Schwanzknospentstadien wurde bereits gezeigt, dass *Xphb1* Transkripte außer in den Branchialbögen, unter anderem auch in Bereichen des Gehirns und in den Ohrvesikeln lokalisiert sind (M. Schneider, Diplomarbeit, 2007). *Xphb1* könnte in diesen Geweben Funktionen ausüben, die sich von denen in der Neuralleistenentwicklung unterscheiden.

In Funktionsgewinn-Studien konnte gezeigt werden, dass die Funktion von *Xphb1* von der Konzentration abhängig ist. Bis zu einem gewissen Grad wirkt *Xphb1* neutral und führt nicht zu einer Veränderung der *twist*-exprimierenden Region. Wird die Konzentration erhöht wirkt *Xphb1* jedoch aktivierend auf die Expression von *twist* und führt zu einer vergrößerten Expressionsdomäne. Bei Überschreitung eines Schwellenwerts, der bei einer Konzentration von 1 ng erreicht ist, verkehrt sich die Wirkung ins Gegenteil und führt zu einem Verlust von *twist*. Das bedeutet, *Xphb1* unterliegt einer strikten Regulation innerhalb der Neuralleistenentwicklung. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass hohe Konzentrationen an *Xphb1* unspezifische Reaktionen auslösen. Ein weiterer Nachteil der Überexpression ist,

dass aufgrund einer ektopischen Aktivierung andere Funktionen außerhalb der Neuralleisten dereguliert werden und sich in der Folge indirekt auf die NLZ auswirken. Dies ist besonders für Prohibitine anzunehmen, da sie einen multifunktionellen Charakter besitzen (Mishra et al., 2006) und in geringen Konzentrationen ubiquitär exprimiert zu werden scheinen. Dies lässt sich aus den Western Blot Analysen und dem Vergleich der deutlich sensitiveren Nachweismethode PCR mit der ISH ableiten (Abb. 5-1; M. Schneider, Diplomarbeit 2007). Daher sind Funktionsverlust-Studien, wie sie hier weitestgehend durchgeführt wurden, aussagekräftiger.

## 6.2 Xphb1 gehört zu der Gruppe der Neuralleisten-Spezifikatoren

Die Neuralleistenentwicklung setzt sich aus den Prozessen Induktion, Spezifikation, Aufrechterhaltung des Neuralleistencharakters, Migration und Differenzierung zusammen, die über komplexe Genkaskaden reguliert werden (Abb. 1-6). Mittels Funktionsverlust-Studien konnte gezeigt werden, dass Xphb1 für die Expression der Neuralleisten-Spezifikatoren *twist*, *snail2* und *foxD3* benötigt wird. Der knockdown von Xphb1 führt in Neurula Stadien zum Verlust der Neuralleistenmarker (Abb. 5-5, 5-7). Alle drei Gene werden bereits ab der frühen Gastrulation exprimiert und sind essentiell für die Entwicklung der NLZ. Der bHLH-Transkriptionsfaktor *twist* wird durch *snail2* induziert und *snail2* und *foxD3* aktivieren sich gegenseitig und autoregulatorisch (Linker et al., 2000; Mayor and Aybar, 2001; Sasai et al., 2001). Sie werden jedoch alle drei von dem Protoonkogen *c-myc* reguliert. *C-myc* wurde als erstes direktes Zielgen des kanonischen Wnt-Sinalweges beschrieben und tritt in Tumoren häufig in einer mutierten Form auf (He et al., 1998). In *Xenopus* wird *c-myc*, zeitlich vor *snail2* ab der frühen Gastrula in der Neuralleisten-formenden Region exprimiert und der *c-myc* knockdown führt in Neurula Stadien zum Verlust der Expression von *twist*, *snail2* und *foxD3* (Bellmeyer et al., 2003). Die Expression von *c-myc* wird durch einen Xphb1 knockdown jedoch nicht beeinflusst, was bedeutet, dass Xphb1 in der Hierarchie nicht oberhalb von *c-myc* steht. *Snail1* und *AP-2* werden, wie *c-myc*, zu der Gruppe der Neuralleisten-Spezifikatoren gezählt (Abb. 1-7). Sie werden ebenfalls nicht beeinflusst durch eine Depletion von Xphb1 (Abb. 5-12). Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor *snail1* ist als einer der frühest exprimierten

Neuralleistengene beschrieben, seine Transkripte sind bereits ab St. 9 in der dorsalen Marginalzone nachweisbar. *Snail1* wird ebenfalls durch *c-myc* induziert und steht in der Genkaskade möglicherweise über *snail2* (Aybar et al., 2003; Bellmeyer et al., 2003; Essex et al., 1993). Dem Transkriptionsfaktor *AP-2* wird eine Sonderstellung zugeschrieben. *AP-2* wird in den Neuralleisten und der Epidermis exprimiert und kann die Expression von *snail2* induzieren (Luo et al., 2003). Er wird jedoch auch für die ektodermale Determination benötigt und induziert die Expression des Keratin-spezifischen Markers *Xk81A1* (Luo et al., 2002). In Ganzkeimfärbungen kann nach einer Depletion von *Xphb1* keine Veränderung der *AP-2* Expression festgestellt werden. Die sensitivere Methode der real-time PCR jedoch zeigt eine leichte Reduktion der relativen Expression von *AP-2* auf (Abb. 5-8B). Das legt die Vermutung nahe, dass *AP-2* keiner direkten Regulation durch *Xphb1* unterliegt, sondern eher durch gegenseitige Interaktionen anderer Neuralleisten-Spezifikatoren beeinflusst wird. Die komplexe gegenseitige Regulation der Neuralleisten-Spezifikatoren erschwert die Erstellung einer hierarchisch gegliederten Genkaskade. Durch weitere Funktionsverlust-Studien und die Durchführung epistatischer Experimente konnte *Xphb1* jedoch zwischen *c-myc* und *twist*, *snail2* und *foxD3* eingeordnet werden. *Phb1* weist in der Promoterregion eine Bindestelle für *c-myc* auf und ist in Fibroblasten durch *c-myc* induzierbar (Coates et al., 2001). In Neurula Stadien von *Xenopus* resultiert sowohl die Überexpression, als auch der knockdown von *c-myc* in einer Inhibierung von *Xphb1* im Bereich der Neuralleisten (Abb. 5-9, 5-10). *Xphb1* unterliegt folglich der Regulation durch *c-myc*, wobei die Wirkung von dem Level an *c-myc* abhängig ist. Das würde bedeuten, dass ab einem bestimmten Schwellenwert eine aktivierende Wirkung in eine inhibierende umschlägt. Bemerkenswerterweise wird der *c-myc* MO vermittelte Verlust von *twist*, *snail2* und *foxD3* durch *Xphb1* gerettet, woraus gefolgert werden kann, dass *Xphb1* in der Genkaskade unterhalb von *c-myc* und über *twist*, *snail2* und *foxD3* steht (Abb. 5-11). Die Neuralleisten-Spezifikatoren werden aktiviert, sobald die Neuralplattengrenze etabliert ist. Dies wird über eine exakte Abstimmung von Faktoren wie *pax3* und *zic* reguliert, die ihrerseits die Aktivität von *meis3* steuern. Ein knockdown von *pax3* oder *zic1* führt zum Verlust von *snail2* (Hong et al., 2007; Gutkovich et al., 2009). *Xphb1* hat jedoch keinen Einfluss auf die Expression von *pax3*, *zic3* und *meis3*. Anhand dieser Ergebnisse kann *Xphb1* von der Gruppe der Spezifikatoren der Neuralplattengrenze sowie der Induktoren der NLZ eindeutig ausgeschlossen

werden. Stattdessen ist Xphb1 den Neuralleisten-Spezifikatoren zuzuweisen. Allerdings nimmt Xphb1 darin eine Sonderrolle wahr, in dem es für die Separierung von *snail1/AP-2* und *snail2/foxD3/twist* verantwortlich ist (Abb. 6-1). Dies ist umso erstaunlicher, da eine regulatorische Trennung von *snail1* und *snail2* bislang kaum beschrieben wurde (Zhang et al., 2006).

In der Hefe und *C. elegans* scheint die Funktion von *phb1* und *phb2* identisch zu sein, da sie nur als Heterodimere auftreten und keine Monomere beschrieben sind (Artal-Sanz et al., 2003; Berger and Yaffe, 1998). In der Neuralleistenentwicklung von *Xenopus* ist dies nicht der Fall. Das gegen Xphb1 gerichtete Morpholino blockiert spezifisch die Translation von Xphb1 und hat keinen Einfluss auf Xphb2 (Abb. 5-3B). In Rekonstitutionsversuchen kann Xphb2 die Funktion von Xphb1 jedoch nicht übernehmen. Nur der *phb1* MO-vermittelte Verlust der *snail2* Expression wird durch Koinjektion von Xphb2 geringfügig wieder hergestellt. Da Xphb2 ebenfalls ubiquitär exprimiert wird und multifunktional wirkt, kann die Aktivierung von *snail2* jedoch auch durch sekundäre Effekte der Xphb2 Überexpression ausgelöst werden. Insgesamt lässt sich die Aussage treffen, dass die Funktionen von Xphb1 und Xphb2 in der Neuralleistenentwicklung nicht redundant sind. Dies muss allerdings nicht bedeuten, dass beide Proteine als Monomere vorliegen. Der Effekt von Xphb2 auf *snail2* legt dies jedoch nahe, wobei allerdings auch die Bildung eines Heterodimer-Komplexes aus Xphb1 und Xphb2 nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Induktion der Neuralleisten beginnt bereits in der Gastrula. Wachstumsfaktoren aus dem Bereich der dorsolateralen Marginalzone induzieren die Genkaskade im Bereich der späteren Neuralleiste (Steventon et al., 2009). Besonders dem bHLH-Transkriptionsfaktor *twist* wurden zusätzliche Funktionen in der Differenzierung des Mesoderm und der dorsoventralen Musterung zugeschrieben (Nüsslein-Vollhard et al., 1984; Chen and Behringer, 1995). Der knockdown von *twist* und *snail2* führt auch tatsächlich zum Verlust der mesodermalen Marker *Xbra* und *myoD* (Zhang et al., 2009). Die Effekte von Xphb1 auf Neuralleistenmarker in der Neurula könnten also auch durch vorzeitige Defekte im Mesoderm hervorgerufen werden, zumal es auch gemäß der PCR- und Western Blot-Daten in dieser Phase exprimiert wird. Der knockdown von Xphb1 hat jedoch keinen Einfluss auf die Expression der mesodermalen Markergene *Xbra*, *chordin* und *myoD* (Abb. 5-15). Die Wirkung von

Xphb1 auf die Neuralleisten beruht also nicht auf Defekten in der Entwicklung des Mesoderms.

### 6.3 Der Einfluss von Xphb1 auf c-myc Zielgene

*C-myc* ist ein Zielgen von Wnt und wird ab St.11 an der Neuralplattengrenze in Neuralleisten-Vorläuferzellen exprimiert. Zusätzlich kann eine Expression entlang der anterioren Neuralplattengrenze beobachtet werden. Diese Zellen bilden keine Neuralleisten sondern craniale Plakoden (Bellmeyer et al., 2003; Schlosser and Northcutt, 2000). Es ist also wahrscheinlich, dass *c-myc*, neben seiner Funktion in der Neuralleistenentwicklung auch die Entwicklung anderer Zelltypen reguliert. Bellmeyer et al. (2003) zeigten, dass *c-myc* die Neuralleistengene *snail1/2*, *sox9*, *foxD3* und *twist* induziert. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass *snail2*, *foxD3* und *twist* dabei in Abhängigkeit von Xphb1 aktiviert werden. Auch die Induktion von *snail1* und *AP-2* wird durch *c-myc* gesteuert. Die *c-myc* MO induzierte Reduktion von *snail1* und *AP-2* wird aber überraschenderweise nicht durch Xphb1 gerettet (Abb. 5-12). Diese unterschiedliche Regulierung von *snail1* und *snail2* durch Xphb1 deutet darauf hin, dass die Funktionen der beiden Proteine in *Xenopus* nicht redundant sind. Sowohl *snail1*, als auch *AP-2* wurde eine besondere Stellung in der Genkaskade zugeschrieben, indem sie über alle anderen Faktoren gestellt wurden (Meulemans and Bronner-Fraser, 2004). Die mit dieser Arbeit notwendig gewordene Aufteilung in Xphb1-abhängige und -unabhängige *c-myc* Zielgene ist jedoch neu (Abb. 6-1). Wie bereits erwähnt ist eine unterschiedliche Regulation von *snail1* und *snail2* bisher kaum beschrieben. Die Depletion von Neuralleisten-Spezifikatoren wie z.B. *sox9* und *sox10* führt stets zum Verlust von *snail1* und *snail2* (Honore et al., 2003; Lee et al., 2004; Spokony et al., 2002). Nur in einer neueren Studie von Guemar et al., (2007) wurde in RhoV-defizienten Embryonen ebenfalls eine unterschiedliche Regulation von *snail1* und *snail2* beschrieben. RhoV wird ab der Gastrula bis zur späten Neurula in cranialen NLZ exprimiert und wird für die Expression von *sox9*, *sox10*, *foxD3*, *twist* und *snail2* benötigt. Die Depletion von RhoV hat dagegen keinen Einfluss auf die Expression von *snail1*. Dabei wird allerdings vermutet, dass die kleine GTPase RhoV eher für das Rearrangement der Zellen während des Schließens des Neuralrohres, als für eine transkriptionelle

Regulation benötigt wird. Defekte in der Entwicklung der Neuralfalte könnten zu einer Verschiebung der Neuralplatte- und Neuralleiste-Regionen führen und dadurch indirekt die Genexpression beeinflussen (Guemar et al., 2007).

Die Gene *snail1* und *snail2* kodieren für transkriptionelle Repressoren und sind wichtige Regulatoren der EMT, die für die Bildung des Mesoderms und der Neuralleisten, aber auch der Metastasierung epithelialer Tumoren entscheidend ist (Kalluri and Weinberg, 2009; Nieto, 2002). Außerdem sind sie an Prozessen wie Migration und Proliferation beteiligt und haben anti-apoptotische Funktionen (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005; Zhang et al., 2006). Im Gegensatz zu Experimenten in *Xenopus* und Hühnchen, wurde in Mäusen nachgewiesen, dass weder *snail1* noch *snail2* für die Entwicklung, Delamination und Migration von NLZ benötigt werden (Murray and Gridley, 2006a).

In RhoV-defizienten Embryonen konnte zusätzlich zum Verlust der Neuralleistenmarker, eine Verbreiterung der Neuralplattenregion nachgewiesen werden, was zu der Frage führte, ob RhoV das Zellschicksal beeinflussen kann. Das würde bedeuten, dass nach einer RhoV Depletion anstatt NLZ ein neurales Schicksal induziert wird. Dies ist jedoch nicht der Fall, da keine Überlagerungen der *sox2*- und *snail1*-exprimierenden Regionen beobachtet wurde (Guemar et al., 2007). Im Gegensatz dazu führt der knockdown von *Xphb1* weder zu einer Vergrößerung der neuralen, *sox2*-exprimierenden Region, noch zu einer Veränderung der epidermalen *Xk81A1* Expression. In der Doppelfärbung kann keine Überlagerung von *sox2* und *snail1* festgestellt werden. Auch der Verlust von *snail2* durch einen *Xphb1* knockdown beeinträchtigt die Region der *sox2* Expression nicht (Abb. 5-14). Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass *Xphb1* die Balance zwischen epidermalem-, neuralem- und Neuralleisten-Schicksal reguliert. Dies passt auch zu der Feststellung, dass *Xphb1* in niedrigen Konzentrationen nicht fähig ist, die Neuralleistenregion zu vergrößern. Daraus ist zu schließen, dass *Xphb1* weder das Rearrangement der Zellen während der Neurulation noch die Regulation des Zellschicksals neural vs. epidermal beeinflusst. Dies ist ein zusätzlicher Hinweis, dass stattdessen die Wanderung und Anordnung der Zellen beeinträchtigt ist.

#### 6.4 Die Funktion von Xphb1 in der Neuralleistenentwicklung ist unabhängig von Proliferation und Apoptose

Der Verlust der Neuralleistenmarker in Xphb1-depletierten Embryonen könnte auch durch einen Einfluss auf die Zellproliferation zustande kommen. Xphb1 ist als antiproliferativer Faktor bekannt, der durch die Interaktion mit E2F1 und Rb einen Zellzyklusarrest einleiten kann (Wang et al., 1999a+b). Es wurde jedoch bereits nachgewiesen, dass die Induktion der Neuralleisten in den lateralen Bereichen der Neuralplatte nicht von Zellproliferation abhängig ist und in c-myc-depletierten Embryonen keine veränderte Zellproliferationsrate auftritt (Bellmeyer et al., 2003). Auch der knockdown von Xphb1 hat keinen Einfluss auf die Zellproliferation im Bereich der Neuralleisten (Abb. 5-6A-D). Ein alternativer Mechanismus, wie der knockdown von Xphb1 zum Verlust der Neuralleistenmarker führen könnte, ist die Aktivierung eines apoptotischen Programms. In Tumorzellen wurde gezeigt, dass Xphb1 Apoptose hemmen kann (Fusaro, et al., 2003). In der TUNEL Färbung wird jedoch deutlich, dass sich die Anzahl der apoptotischen Zellen im Bereich der Neuralleisten nach einer Xphb1 Depletion nicht verändert (Abb. 5-6E-G).

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass sich Xphb1 zwar nicht auf die Regulation des Zellzyklus von prä-migratorischen NLZ auswirkt, jedoch auf NLZ während oder nach der Migration. Der bHLH-Transkriptionsfaktor *hairy2* wird für die Aufrechterhaltung der NLZ in einem mitotischen und undifferenzierten Zustand benötigt und der knockdown führt ab St. 18 zu verminderter Zellproliferation und verstärkter Apoptose. In der Gastrula und der frühen Neurula wird diese Wirkung auf den Zellzyklus jedoch nicht beobachtet. Dieser Effekt wird im Zusammenhang mit der Repression des Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors  $p27^{xic1}$  und der Repression der Neuralleistenmarker *twist*, *snail2* und *foxD3*, die in der Regulation von Proliferation und Apoptose beschrieben wurden, diskutiert (Nagatomo and Hashimoto, 2007). In der späten Gastrula steuert *hairy2*, durch Inhibierung von Bmp4-Signalen, die Festlegung der Neuralplatte und die Induktion von *mxs1* (Glavic et al., 2004). Danach kommt es durch eine Heterodimerisierung mit dem bHLH-Protein *id3* zur Inhibierung von *hairy2* und zur Spezifizierung der Neuralleisten (Nichane et al., 2008). *Id3* ist ein direktes Zielgen von c-myc und induziert die Expression von Neuralleisten-Spezifikatoren wie *slug*, *twist* und *sox10* (Light et al., 2005). Deshalb wäre es interessant zu prüfen, ob *id3* und *hairy2* auch von Xphb1 reguliert werden. Mittels

Funktionsverlust-Studien könnte untersucht werden, ob ein *Xphb1* knockdown die Expression und/oder die benötigte Interaktion zwischen *id3* und *hairy2* beeinträchtigt und damit die Spezifikation der Neuralleiste fördert.

## 6.5 Der Einfluss von *Xphb1* auf die Differenzierung von Neuralleistenzellen

NLZ werden „*explorers of the embryo*“ genannt, weil sie über den ganzen Embryo wandern und je nach Zielort zu unterschiedlichen Zelltypen differenzieren (Kuriyama and Mayor, 2008). Der Verlust der Neuralleistenmarker durch einen *Xphb1* knockdown führt zu der Vermutung, dass die Differenzierung der Derivate ebenfalls beeinträchtigt werden könnte. Im Schwanzknospenstadium kann nach Injektion des *phb1* MO eine Veränderung der gesamten Morphologie beobachtet werden. Der knockdown führt zu einer Verkürzung der Körperachse und zu verkleinerten Augen. Auch die Depletion von *c-myc* resultiert in einer Reduktion oder dem Verlust der Augen (Bellmeyer et al., 2003). Da *Xphb1* in den Linsen exprimiert wird (M. Schneider, Diplomarbeit, 2007), ist eine Funktion von *Xphb1*, möglicherweise im Zusammenspiel mit *c-myc*, bei der Entwicklung der Augen nicht auszuschließen. Weiterhin kann eine Krümmung der Embryonen zur injizierten Seite und eine Fehlbildung des Darms festgestellt werden. Für die Entwicklung des Darms wird das *fox* Gen *foxF1*, das im Lateralplattenmesoderm exprimiert wird, benötigt. *FoxF1* wird durch BMP4 aktiviert und reguliert die korrekte Aufwindung des Darms (Tseng et al., 2004). Außerdem wird der Hauptteil des enterischen Nervensystems von vagalen und sacralen NLZ gebildet, die sehr speziellen Migrationswegen folgen müssen (Burns and Douarin, 1998). Vermutlich ist die Wirkung von *Xphb1* nicht auf die cranialen NLZ beschränkt, sondern auch auf andere Populationen von NLZ übertragbar. Die Krümmung der Embryonen kann hier nicht, wie im Fall eines *snail2* oder *twist* knockdowns auf das Fehlen von mesodermalen Derivaten zurückgeführt werden, da die Expression von *myoD* durch einen *Xphb1* knockdown nicht beeinflusst wird (Zhang et al., 2009; siehe Abb. 5-15). Da *Xphb1* keine Auswirkungen auf die Entwicklung des Mesoderms hat, ist es wahrscheinlicher, dass die Krümmung durch Defekte in der antero-posterioren Musterung und der Differenzierung von trunkalen NLZ hervorgerufen wird. Der knockdown von *Xphb1* führt zu einer starken



Verkleinerung des Kopfes, wobei das Fehlen der Branchialbögen besonders auffällig ist.

In allen Vertebraten werden die Skelettelemente des Gesichts von cranialen NLZ gebildet, die aus dem Neuralrohr in die Pharynxtaschen einwandern und die knorpeligen Branchialbögen des Kiefers bilden. Die wandernden NLZ sind in drei Hauptgruppen gegliedert, die den mandibularen, den hyoidalen und die branchialen Bögen bilden (Baltzinger et al., 2005). Es wurde bereits gezeigt, dass *c-myc* für die Entwicklung der Knorpelstrukturen des Kopfes benötigt wird (Bellmeyer et al., 2003). In der Knorpelfärbung ist nach der Injektion des *phb1* MO ebenfalls eine Reduktion der gesamten Knorpelstrukturen erkennbar (Abb. 5-16). Die Ausbildung des Meckel'schen Knorpels und der ceratohyalen Knorpel ist nach dem *Xphb1* knockdown komplett inhibiert. Die Reduktion der ceratobranchialen Knorpel ist besonders anterior ausgeprägt, verstärkt sich jedoch auch posterior nach einer erhöhten Konzentration des injizierten *phb1* MO. Der vollständige Verlust der Knorpelstrukturen korreliert mit der Aussage, dass *Xphb1* in die frühe Spezifikation der NLZ eingreift und für die Entstehung der Neuralleisten-Vorläuferzellen benötigt wird.

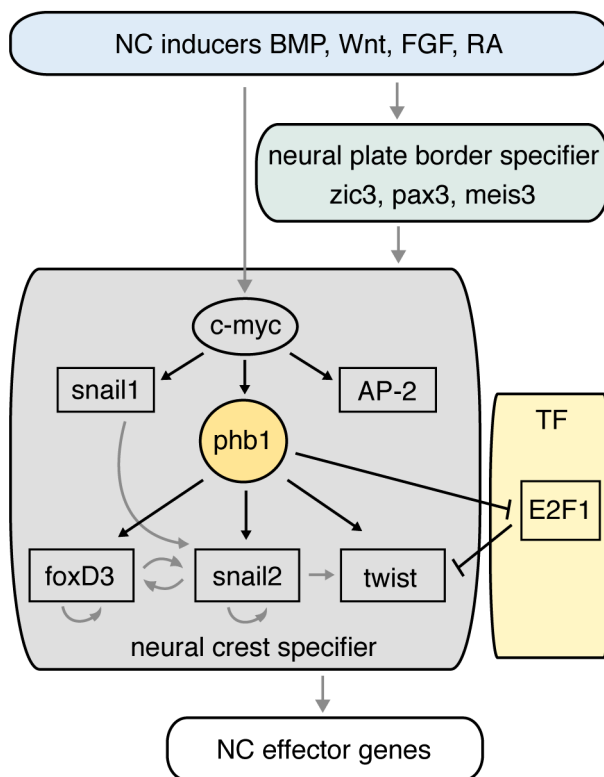
NLZ bilden außer Knorpel und Ganglien auch Melanozyten. Die Differenzierung von Melanozyten wird unter anderem von dem Transkriptionsfaktor *sox10* gesteuert. *Sox10* ist als Neuralleisten-Spezifikator beschrieben und wurde in der Genkaskade zwischen *snail1* und *snail2* platziert (Honore et al., 2003; Meulemans and Bronner-Fraser, 2004). *Sox10* wird außer in den NLZ auch in der otischen Plakode und dem Hinterhirn exprimiert. Jedoch ist lediglich die Expression in den migrierenden NLZ von *c-myc* abhängig (Bellmeyer et al., 2003). *Sox10* wird zunächst in cranialen, später verstärkt in trunkalen NLZ exprimiert und aktiviert weitere Faktoren, wie *Mitf* (Microphthalmia-associated transcription factor) oder *Trp2* (Tyrosinase-related protein 2), die für die Pigmentzellentwicklung benötigt werden (Aoki et al., 2003; Ludwig et al., 2003). In Neurula Stadien wird die Expression von *sox10* durch den knockdown von *Xphb1* vollständig inhibiert. Um einen Einfluss auf die Expression in den otischen Plakoden bzw. dem ZNS zu zeigen, müssten weitere Funktionsverlust-Studien an Embryonen im St. 25-30 durchgeführt werden. Es konnte jedoch bereits nachgewiesen werden, dass der knockdown von *Xphb1* zu einer reduzierten Expression des Melanozyten spezifischen Markergens *Trp2* führt (Abb. 5-18). Außerdem kann vor allem im Bereich der Branchialbögen und des Auges auf der

phb1 MO injizierten Körperhälfte eine Reduktion in der Pigmentierung beobachtet werden. Im St. 46 erscheint die Pigmentierung im Kopfbereich auf der phb1 MO injizierten Seite verstärkt zu sein, was vermutlich aber eher ein artifizieller bzw. sekundärer Effekt, hervorgerufen durch das Fehlen der Knorpel, zu sein scheint. Dagegen ist im Bereich des Darms eine deutlich geringere Pigmentierung zu sehen. Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass Xphb1 für die Entwicklung der NLZ benötigt wird, da durch einen knockdown nicht nur die Expression der Neuralleisten-Spezifikatoren reduziert wird, sondern auch die Differenzierung der Derivate, wie Knorpel und Melanozyten blockiert wird. Dabei scheint die Wirkung nicht auf die cranialen NLZ beschränkt zu sein, da außer den Gesichtsstrukturen auch Melanozyten und möglicherweise die parasymphathischen Ganglienzellen des Darms betroffen sind, die sich aus den trunkalen bzw. vagalen und sacralen NLZ differenzieren. Bemerkenswert ist außerdem die Tatsache, dass der Xphb1 knockdown, trotz bestehender *snail1* Expression die Entwicklung der Neuralleisten Derivate reprimiert. Ähnliche Situationen wurden bereits beschrieben. Die Inhibierung von *snail2* in frühen Stadien verhindert, trotz bestehender *snail1* Expression, die Entwicklung von Neuralleisten-Vorläuferzellen. NLZ, die aus Embryonen, denen ein dominant-negatives *snail2* Konstrukt injiziert wurde, in Wildtyp-Embryonen transplantiert wurden, zeigten keine Migration aus dem Bereich des Neuralrohrs (LaBonne and Bronner-Fraser, 2000). Durch den knockdown von RhoV wurde ebenfalls ein Verlust der *snail2* Expression und der Knorpelstrukturen beschrieben, ohne dass die Expression von *snail1* beeinflusst wurde (Guemar et al., 2007).

### **6.6 Xphb1 interagiert mit E2F und reguliert die Entwicklung der NLZ**

Phb1 wurde nicht nur im Zellkern lokalisiert, sondern es wurde auch nachgewiesen, dass es eine aktive Rolle in der Regulation der Transkription spielt. Es interagiert mit einer Vielzahl von Kernproteinen, die an der Gentranskription beteiligt sind. Darunter befinden sich Zellzyklusregulatoren wie p53, Rb und E2F, Korepressoren wie HDAC1, Brg1/Brm und N-CoR, aber auch der Östrogen und Androgen Rezeptor (Mishra et al., 2006). Die Funktion von Xphb1 in der Neuralleistenentwicklung wird vermutlich auch über die Interaktion mit Kernproteinen gesteuert, da die Deletion der E2F1-Interaktionsdomäne in Rekonstitutionsexperimenten dazu führt, dass der

Verlust von *twist* nicht gerettet wird (Abb. 5-21, 5-22). Weder die Deletion der Transmembran-Domäne und der Rb-Bindedomäne noch der Raf-1 Bindedomäne mit der NES zeigt diesen Effekt, weshalb die Interaktion mit E2F1 als ausschlaggebend betrachtet werden muss. Vor allem die Rekonstitutionsversuche mit der humanen Mutante Hphb1 $\Delta$ 185-214, der tatsächlich nur die E2F1-Interaktionsdomäne fehlt, bestätigen dies. Passend dazu, führt die Überexpression der Mutanten Xphb1 $\Delta$ N-term und Xphb1 $\Delta$ Raf-1 ähnlich wie beim vollständigen Xphb1 zu einem Anstieg von Embryonen mit leicht verstärkter *twist* Expression, während Xphb1 $\Delta$ C-term dazu nicht fähig ist. Bemerkenswerterweise führt die Überexpression von E2F1 zur Reduktion von *twist* und kann durch Xphb1 rückgängig gemacht werden. Der knockdown von Xphb1 fördert dagegen die Reduktion von *twist* durch E2F1 (Abb. 5-24). Ferner zeigen die Reporteranalysen, dass die E2F1 Aktivität durch Xphb1 reprimiert wird, wobei die E2F1-Interaktionsdomäne von Xphb1 entscheidend ist. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Xphb1 in der Entwicklung der Neuralleisten für die Repression von E2F1 benötigt wird (Abb. 6-1).



**Abb. 6-1: Neues Modell des regulatorischen Gennetzwerks in der Neuralleistenentwicklung.**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Xphb1 die Expression der Spezifikatoren der Neuralplattengrenze nicht beeinflusst, sondern zu den Neuralleisten-Spezifikator gehört. Xphb1 steht in der Genkaskade unter *c-myc* und über *foxD3*, *snail2* und *twist*. Die *c-myc* Zielgene *snail1* und *AP-2* werden unabhängig von Xphb1 reguliert. Die Repression des Transkriptionsfaktors (TF) E2F1 durch Xphb1 wird für die Expression von *twist* benötigt. Schwarze Pfeile zeigen Ergebnisse dieser Arbeit und graue deuten Daten aus der Literatur an.

Das *Xenopus* Homolog *XE2F* wurde als Gen isoliert, das an der Musterung der embryonalen Körperachsen beteiligt ist. Die Aminosäuresequenz weist ~21% Identität mit dem humanen E2F1 und ~37% mit dem humanen E2F3 auf, weshalb die Bezeichnung XE2F3 verwendet wurde. XE2F3 wird für die Entwicklung von ventralen und posterioren Zellschicksalen benötigt, indem es in posterioren Regionen die Expression von *Hox* Genen und in ventralen Regionen das Homeobox Gen *Xhox3* induziert. Während der Neurulation wird *XE2F3* im Gehirn, dem Neuralrohr und den Neuralleisten exprimiert (Suzuki and Hemmati-Brivanlou, 2000). Vergleichbar mit den Versuchen mit humanem E2F1 führt die Überexpression von XE2F3 ebenfalls zur Reduktion von *twist*. Der Morpholino-vermittelte knockdown von XE2F3 führt sogar zu einer leichten Vergrößerung der *twist*-exprimierenden Region (Abb. 5-25).

XE2F3 wird außerdem ab der Midblastula-Transition für die Regulation des Zellzyklus benötigt. Die Injektion eines dominant-negativen XE2F3 Konstruktes, das aus der DNA-Bindedomäne besteht (As 95-191), also weder an Rb noch an phb1 binden kann, führt zur Blockierung des Zellzyklus und wirkt sich während der Gastrulation lethal aus (Dobrowolski et al., 1994; Tanaka et al., 2003).

Die Kontrolle des Zellzyklus durch die Interaktion von phb1 und E2F1 wurde bereits untersucht, wobei Rb meist als zusätzlicher Faktor involviert ist. In humanen Tumorzelllinien wurde gezeigt, dass phb1 die transkriptionelle Aktivität von E2F1 und die Zellproliferation inhibiert und dieser Effekt von Rb abhängig ist, da eine Deletion der Rb-Bindedomäne die Wirkung aufhebt (Wang et al., 1999a). Wang et al., konnten auch nachweisen, dass phb1 und Rb an unterschiedliche Regionen von E2F1 binden. Rb interagiert mit der Aktivierungsdomäne von E2F1 und phb1 mit dem C-terminalen Teil der „*marked box*“ Domäne. Es gibt 6 E2F Proteine, von denen E2F1-5 eine Aktivierungsdomäne besitzt und die Transkription von Ziel promotoren induziert, während E2F6 keine Aktivierungsdomäne besitzt und mit den anderen E2Fs um die Bindestellen an den Promotoren konkurriert und somit reprimiert. E2F1-3 binden alle an Rb, aber E2F4 und -5 präferieren die Bindung an p107 und p103 Proteine, die beide zur Retinoblastoma Protein Familie gehören. Phb1 kann sowohl an Rb, p107 und p103 binden, als auch die transkriptionelle Aktivität aller 5 E2Fs inhibieren, wobei die Bindung an Rb für die Repression von E2F benötigt wird (Wang et al., 1999b). Die hier durchgeführten Rekonstitutionsversuche mit den Xphb1 Mutanten weisen jedoch auf einen Rb-unabhängigen Mechanismus hin, da trotz Deletion der Rb-Bindedomäne der Verlust des *twist* Signals gerettet wird (Abb. 5-

23/24). Dies deckt sich mit der Beobachtung von Cosgrove und Philpott (2007), die zeigen konnten, dass Rb in der frühen Entwicklung von *Xenopus* keine Funktion hat, da es bis St.30 nur in der hyperphosphorylierten, inaktiven Form vorliegt. Dabei wurde jedoch nur die Wirkung von Rb auf Zellproliferation und Apoptose und auf neurale und Muskel-spezifische Marker untersucht. Der Einfluss einer Rb Überexpression auf die Expression von *twist* konnte hier nicht geklärt werden. Es tritt sowohl eine Reduktion, als auch eine Verstärkung des *twist* Signals auf, wobei jedoch beide Effekte statistisch nicht signifikant sind (Abb. 5-28).

## **6.7 Die Lokalisation von Xphb1 korreliert nicht mit seiner Funktion in den NLZ**

Beide phbs werden in verschiedenen Zellkompartimenten beschrieben. Abgesehen von der Lokalisation der hetero-oligomeren Ringkomplexe in der inneren Mitochondrienmembran, wurden sie in der Plasmamembran von B-Lymphozyten, in „*Lipid rafts*“ und im Nukleus detektiert (Mishra et al., 2006). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Lokalisation mit der Funktion korreliert.

Allerdings konnte in den hier durchgeführten Immunfärbungen nach Injektion verschiedener Xphb1 Mutanten keine Korrelation zwischen der Xphb1-Funktion und der subzellulären Lokalisation hergestellt werden. Die Funktion von Xphb1 als Repressor von E2F1 setzt eine Kernlokalisierung voraus. So sollten Mutanten, die eine deutliche Kernlokalisierung zeigen und die E2F1-Interaktionsdomäne besitzen den Verlust des *twist* Signals nach einer Xphb1 Depletion, ähnlich wie der Wildtyp aufheben können. Dies ist aber nicht der Fall, da die Mutante Xphb1 $\Delta$ TM, die beiden Anforderungen entspricht in Rekonstitutionsversuchen keine Funktion zeigt (Abb. 5-27, Tabelle 6-1). Dafür werden Xphb1 (Wt) und die Mutante Xphb1 $\Delta$ Raf-1 nicht im Kern detektiert, sind aber fähig die Aktivität von E2F1 zu reprimieren und die Expression von *twist* wieder herzustellen.

Die Lokalisation in der inneren Mitochondrienmembran wird über die N-terminale Transmembran-Domäne vermittelt. Der Import von *S. cerevisiae* phb1 in isolierte Mitochondrien wird durch die Deletion der Aminosäuren 1-29 vollständig inhibiert (Tatsuta et al., 2005). Dagegen zeigen die Xphb1 Mutanten ohne TM-Domäne,

Xphb1 $\Delta$ TM und Xphb1 $\Delta$ N-term, zum Teil weiterhin eine Lokalisation in den Mitochondrien und im Cytoplasma (Abb. 5-30).

<b>Xphb1 Mutante</b>	<b>Kern</b>	<b>Mitochondrien</b>	<b>Cytoplasma</b>	<b>Funktion</b>
Xphb1 (Wt)	-	+	+	ja
Xphb1 $\Delta$ TM	++	+	+	nein
Xphb1 $\Delta$ N-term	++	+/-	+	ja
Xphb1 $\Delta$ Raf-1	-	+/-	+/-	ja
Xphb1 $\Delta$ C-term	++	+	+	nein

**Tabelle 6-1: Zusammenfassung der Lokalisation und Funktion der Xphb1 Deletionsmutanten.** Dargestellt ist die Lokalisation (+) von Xphb1 (Wt) und den Xphb1 Mutanten im Kern, den Mitochondrien und dem Cytoplasma von cranialen NLZ (+/- : keine eindeutige Lokalisation) (siehe Abb. 5-30). Die Funktion bezieht sich auf die Wiederherstellung des *twist* Signals nach einem Xphb1 knockdown (siehe Abb. 5-21, 5-27).

In *phb1* wurde bislang keine Kern-Lokalisationssequenz identifiziert, dagegen ist eine Leucin/Isoleucin-reiche Sequenz von Aminosäure 257-270 beschrieben, die ein Kern-Export-Signal (NLS) darstellt (Rastogi et al., 2006b). Eine dominante Kernlokalisierung von *phb1* wurde sowohl in humanen Fibroblasten und Epithelzellen, als auch in verschiedenen humanen Tumorzelllinien gezeigt (Fusaro et al., 2003; Rastogi et al., 2006a+b; Wang et al., 2002a). Xphb1 ist dagegen nicht im Nukleus lokalisiert. Überraschenderweise führt die Deletion der NES auch nicht zu einer Kernlokalisierung, da die Mutante Xphb1 $\Delta$ Raf-1 nicht im Kern detektiert wird (Abb. 5-30, Tabelle 6-1). Anhand der hier durchgeführten Immunfärbungen kann nicht ausgeschlossen werden, dass Xphb1 außer im Kern und in den Mitochondrien auch in anderen subzellulären Lokalisationen vorkommt. Zur Verifizierung könnten zusätzliche Immunfärbungen mit Antikörpern gegen weitere Kompartimente, wie dem Golgi-Apparat, dem endoplasmatischen Reticulum, den Endosomen und der Plasmamembran angefertigt werden, da andere Mitglieder der Proteinfamilie mit PHB Domäne ebenfalls in diesen Strukturen detektiert wurden (Browman et al., 2007).

Die Funktion hängt also vermutlich nicht von der Lokalisation ab, sondern eher von funktionellen Domänen und der korrekten Ausbildung der Proteinstruktur. Das Fehlen

der TM-Domäne könnte in der Mutante Xphb1 $\Delta$ TM zu Defekten in der Proteinfaltung und zum Verlust der Funktion führen.

Auch die Mutante Xphb1 $\Delta$ Raf-1 ist funktional, lässt sich jedoch weder im Nukleus noch in den Mitochondrien deutlich detektieren (Abb. 5-30; Tabelle 6-1). Phb1 ist essentiell für die Aktivierung von Raf-1 im Raf/MEK/ERK Signalweg (Rajalingam et al., 2005). Dieser Mechanismus scheint aber in der Neuralleistenentwicklung keine Rolle zu spielen, da ein Fehlen der Raf-1-Domäne die Funktion von Xphb1 nicht beeinträchtigt (Abb. 5-21, Tabelle 6-1). Die Deletion der Rb-Bindedomäne in Xphb1 $\Delta$ N-term hat ebenfalls keinen Einfluss auf seine Funktionalität, was im Einklang mit der Aussage steht, dass Rb nur in einer inaktiven Form vorliegt (Cosgrove and Philpott, 2007).

Offensichtlich hängt sowohl die Lokalisation, als auch die Wirkung von Xphb1 sehr stark von dem jeweiligen Zelltyp ab. In humanen Tumorzellen agiert Xphb1 anders als in normalen Fibroblasten, obwohl in beiden Zelltypen eine Kernlokalisation vorherrscht (Rastogi et al., 2006b). Problematisch an den Experimenten in cranialen NLZ von *Xenopus* ist, dass keine abgegrenzte Lokalisation in einem Zellkompartiment gezeigt werden konnte. Die Lokalisation der Xphb1 Mutanten ist weder auf die Mitochondrien, noch auf den Nukleus beschränkt, weshalb die Funktion nicht mit der subzellulären Lokalisation in Zusammenhang gebracht werden kann.

## **6.8 Molekulare Mechanismen der phb1-vermittelten transkriptionellen Repression von E2F1**

Transkriptionsfaktoren der E2F Familie spielen eine entscheidende Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus, indem sie den Übergang von der G1- zur S-Phase steuern und haben weitere Funktionen in Prozessen wie Differenzierung und Apoptose (Adams and Kaelin, 1996; Wang et al., 2002a). Zusätzlich ist eine Funktion von E2F3 in der Musterung der embryonalen Körperachsen in *Xenopus* beschrieben (Suzuki and Hemmati-Brivanlou, 2000). In dieser Arbeit konnte eine neue, von der Zellzykluskontrolle unabhängige, Funktion von E2F1 in der Neuralleistenentwicklung nachgewiesen werden. Die Repression der transkriptionellen Aktivität von E2F1 durch Xphb1 wird dabei benötigt, um die Spezifikation der NLZ zu fördern. Betrachtet

man die Funktionalität der Xphb1 Mutanten im Rekonstitutionsexperiment, dann scheidet eine Regulation unter Hinzuziehung von Rb bzw. Raf1 und die Aktivierung der Raf/MEK/ERK Signalkaskade aus.

Es wurden bereits mehrere Mechanismen der E2F1 Repression beschrieben. In einer humanen Tumorzelllinie wurde gezeigt, dass die E2F1-Interaktionsdomäne von phb1 eine coiled coil Struktur bilden kann und für die Repression der E2F1 Aktivität ausreicht (Joshi et al., 2003). Choi et al. (2008) konnten weitere Rb-unabhängige Mechanismen der E2F1 Repression durch phb1 nachweisen. Der knockdown von phb1 führt indirekt über die Verstärkung des Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors p16 zur Repression von E2F1. Der Tumorsuppressor p16 inhibiert die Aktivität des CyclinD/cdk4 (cyclin-dependent kinase 4) Komplexes, der die Phosphorylierung und Inhibierung von Rb vermittelt. Außerdem wird E2F1 direkt durch die Bindung von phb1 und RNF2 reprimiert. Die E2F1-Interaktionsdomäne von phb1 ist dabei essentiell für die Repression von E2F1. *RNF2* kodiert für das Enzym E3 ubiquitin-protein ligase RING2 und gehört zur Polycomb Gruppe von Proteinen, die an der transkriptionellen Repression von Genen beteiligt sind. Durch den Polycomb Komplex mit RNF2 wird die Ubiquitinierung des Histon H2A vermittelt (Wang et al., 2004). Die Literaturdaten weisen daraufhin, dass an der Repression von E2F eine große Anzahl an Proteinen beteiligt ist, die an der Modifikation des Chromatins durch Histon Modifikationen teilhaben und somit epigenetische Regulationen vermitteln. Die Repression von E2F1 durch Rb und phb1 wird unter anderem durch die Rekrutierung der Korepressoren, HDAC1 und Brg1/Brm vermittelt (Wang et al., 2002b). Phb1 kann zusätzlich den Korepressor N-CoR in den E2F1 Komplex rekrutieren (Wang et al., 2002a). Deshalb ist es wahrscheinlich, dass Xphb1 in den Neuralleisten-Spezifikatoren, deren Promotoren E2F1-abhängige Elemente enthalten, die Neuordnung von Chromatin vermittelt. Brg1, die katalytische Untereinheit des SWI/SNF „*Chromatin Remodeling*“ Komplexes, wird in *Xenopus* maternal exprimiert und Transkripte akkumulieren im gesamten ZNS, den Neuralleisten und otischen Vesikeln. Brg1 wird für die Regulierung der neuronalen Differenzierung benötigt und ein knockdown führt zu einer Verbreiterung der *sox2*-exprimierenden Region, was auch die Neuralleistenregion beeinflussen könnte (Seo et al., 2005). Homologe von RNF2 und HDAC1 in *Xenopus* wurden bislang noch nicht kloniert. Es wurde jedoch zwei Mitglieder des HDAC Komplexes, xSin3 und xRBD3 beschrieben, die mit dem Transkriptionsfaktor foxN3 interagieren und



dadurch an der Entwicklung von Knorpelstrukturen und Augen beteiligt sind (Schuff et al., 2007).

Die hier erarbeiteten Ergebnisse legen eine detaillierte Untersuchung der Funktion von prohibitin1 in E2F-Transkriptionskomplexen in der Embryogenese sowie in der Tumorigenese nahe. Dabei sollte der Fokus auf die epigenetischen Aspekte der Genregulation gelegt werden.

## 7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte eine neue und unerwartete Funktion von prohibitin1 (Xphb1) als Regulator der Neuralleistengene *twist*, *snail2* und *foxD3* in *Xenopus* identifiziert und mechanistisch aufgeklärt werden.

Phb1 ist ein hoch konserviertes, in mehreren Zellkompartimenten lokalisiertes Protein, das zunächst als Inhibitor der Zellproliferation identifiziert wurde. Im Nukleus interagiert es mit Transkriptionsfaktoren wie Rb und E2F1 und kontrolliert unter anderem Prozesse wie Proliferation und Apoptose. *Xphb1* wird maternal exprimiert und Transkripte akkumulieren in der Neurula im Neuralrohr und den Neuralleisten. *Xphb1* konnte in die Gruppe der Neuralleisten-Spezifikatoren eingeordnet werden, da die Depletion von Xphb1 zum Verlust einer Subgruppe der Neuralleisten-Spezifikatoren, nämlich *twist*, *snail2* und *foxD3*, führt. Mittels epistatischer Analysen konnte Xphb1 in der Genkaskade unterhalb von *c-myc* und oberhalb von *twist*, *snail2* und *foxD3* platziert werden. Dabei wurde eine neue Aufteilung in Xphb1-abhängige und -unabhängige *c-myc* Zielgene aufgezeigt, da die Expression von *snail1* und *AP-2* zwar durch *c-myc*, aber unabhängig von Xphb1 reguliert wird. Obgleich die Expression von *snail1* und *AP-2* unbeeinflusst bleibt, führt der knockdown von Xphb1 zum Verlust von Neuralleisten Derivaten, wie Knorpel und Melanozyten. Die Wirkung von Xphb1 beruht erstaunlicherweise nicht auf der Regulation von Proliferation oder Apoptose, sondern auf Funktionen in der transkriptionellen Genregulation. Durch Rekonstitutionsversuche und Reporteranalysen mit verschiedenen Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Xphb1 und E2F1 in der Neuralleistenentwicklung benötigt wird. Xphb1 fördert durch die Repression von E2F1 die Spezifizierung und Differenzierung der cranialen Neuralleistenzellen. Ob *phb1* durch die Interaktion mit E2F1 auch in Tumoren die Regulation von *twist* und *snail2* steuert und damit indirekt den Tumorsuppressor E-Cadherin reprimiert, wird zu klären sein.

## 8 Literatur

- **Abu-Elmagd, M., Garcia-Morales, C. and Wheeler, G. N.** (2006). Frizzled7 mediates canonical Wnt signaling in neural crest induction. *Dev Biol* **298**, 285-98.
- **Acloque, H., Adams, M. S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M. and Nieto, M. A.** (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest* **119**, 1438-49.
- **Adams, P. D. and Kaelin, W. G., Jr.** (1996). The cellular effects of E2F overexpression. *Curr Top Microbiol Immunol* **208**, 79-93.
- **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.
- **Artal-Sanz, M. and Tavernarakis, N.** (2009). Prohibitin couples diapause signalling to mitochondrial metabolism during ageing in *C. elegans*. *Nature* **461**, 793-7.
- **Artal-Sanz, M., Tsang, W. Y., Willems, E. M., Grivell, L. A., Lemire, B. D., van der Spek, H. and Nijtmans, L. G.** (2003). The mitochondrial prohibitin complex is essential for embryonic viability and germline function in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* **278**, 32091-9.
- **Asamoto, M. and Cohen, S. M.** (1994). Prohibitin gene is overexpressed but not mutated in rat bladder carcinomas and cell lines. *Cancer Lett* **83**, 201-7.
- **Aybar, M. J., Nieto, M. A. and Mayor, R.** (2003). Snail precedes slug in the genetic cascade required for the specification and migration of the *Xenopus* neural crest. *Development* **130**, 483-94.
- **Back, J. W., Sanz, M. A., De Jong, L., De Koning, L. J., Nijtmans, L. G., De Koster, C. G., Grivell, L. A., Van Der Spek, H. and Muijsers, A. O.** (2002). A structure for the yeast prohibitin complex: Structure prediction and evidence from chemical crosslinking and mass spectrometry. *Protein Sci* **11**, 2471-8.
- **Baltzinger, M., Ori, M., Pasqualetti, M., Nardi, I. and Rijli, F. M.** (2005). Hoxa2 knockdown in *Xenopus* results in hyoid to mandibular homeosis. *Dev Dyn* **234**, 858-67.
- **Barrallo-Gimeno, A. and Nieto, M. A.** (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* **132**, 3151-61.
- **Basch, M. L., Garcia-Castro, M. I. and Bronner-Fraser, M.** (2004). Molecular mechanisms of neural crest induction. *Birth Defects Res C Embryo Today* **72**, 109-23.

- **Battle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J. and Garcia De Herreros, A.** (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* **2**, 84-9.
- **Bellmeyer, A., Krase, J., Lindgren, J. and LaBonne, C.** (2003). The protooncogene c-myc is an essential regulator of neural crest formation in xenopus. *Dev Cell* **4**, 827-39.
- **Berger, K. H. and Yaffe, M. P.** (1998). Prohibitin family members interact genetically with mitochondrial inheritance components in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **18**, 4043-52.
- **Birnboim, C.A. and Dooley, J.A.** (1979). Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- **Browman, D. T., Hoegg, M. B. and Robbins, S. M.** (2007). The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *Trends Cell Biol* **17**, 394-402.
- **Burns, A. J. and Douarin, N. M.** (1998). The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system. *Development* **125**, 4335-47.
- **Burstyn-Cohen, T., Stanleigh, J., Sela-Donenfeld, D. and Kalcheim, C.** (2004). Canonical Wnt activity regulates trunk neural crest delamination linking BMP/noggin signaling with G1/S transition. *Development* **131**, 5327-39.
- **Cano, A., Perez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F. and Nieto, M. A.** (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* **2**, 76-83.
- **Chen, Z. F. and Behringer, R. R.** (1995). twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes Dev* **9**, 686-99.
- **Cheung, M., Chaboissier, M. C., Mynett, A., Hirst, E., Schedl, A. and Briscoe, J.** (2005). The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination. *Dev Cell* **8**, 179-92.
- **Choi, D., Lee, S. J., Hong, S., Kim, I. H. and Kang, S.** (2008). Prohibitin interacts with RNF2 and regulates E2F1 function via dual pathways. *Oncogene* **27**, 1716-25.
- **Coates, P. J., Jamieson, D. J., Smart, K., Prescott, A. R. and Hall, P. A.** (1997). The prohibitin family of mitochondrial proteins regulate replicative lifespan. *Curr Biol* **7**, 607-10.
- **Coates, P. J., Nenutil, R., McGregor, A., Picksley, S. M., Crouch, D. H., Hall, P. A. and Wright, E. G.** (2001). Mammalian prohibitin proteins respond to mitochondrial stress and decrease during cellular senescence. *Exp Cell Res* **265**, 262-73.

- **Collazo, A., Bronner-Fraser, M. and Fraser, S. E.** (1993). Vital dye labelling of *Xenopus laevis* trunk neural crest reveals multipotency and novel pathways of migration. *Development* **118**, 363-76.
- **Cosgrove, R. A. and Philpott, A.** (2007). Cell cycling and differentiation do not require the retinoblastoma protein during early *Xenopus* development. *Dev Biol* **303**, 311-24.
- **Dang, C. V. and Semenza, G. L.** (1999). Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* **24**, 68-72.
- **De Calisto, J., Araya, C., Marchant, L., Riaz, C. F. and Mayor, R.** (2005). Essential role of non-canonical Wnt signalling in neural crest migration. *Development* **132**, 2587-97.
- **Deardorff, M. A., Tan, C., Saint-Jeannet, J. P. and Klein, P. S.** (2001). A role for frizzled 3 in neural crest development. *Development* **128**, 3655-63.
- **Dobrowolski, S. F., Stacey, D. W., Harter, M. L., Stine, J. T. and Hiebert, S. W.** (1994). An E2F dominant negative mutant blocks E1A induced cell cycle progression. *Oncogene* **9**, 2605-12.
- **Erickson, C. A., Duong, T. D. and Tosney, K. W.** (1992). Descriptive and experimental analysis of the dispersion of neural crest cells along the dorsolateral path and their entry into ectoderm in the chick embryo. *Dev Biol* **151**, 251-72.
- **Essex, L. J., Mayor, R. and Sargent, M. G.** (1993). Expression of *Xenopus* snail in mesoderm and prospective neural fold ectoderm. *Dev Dyn* **198**, 108-22.
- **Eveleth, D. D., Jr. and Marsh, J. L.** (1986). Sequence and expression of the Cc gene, a member of the dopa decarboxylase gene cluster of *Drosophila*: possible translational regulation. *Nucleic Acids Res* **14**, 6169-83.
- **Fainsod, A., Steinbeisser, H. and De Robertis, E. M.** (1994). On the function of BMP-4 in patterning the marginal zone of the *Xenopus* embryo. *EMBO J* **13**, 5015-25.
- **Foster, L. J., De Hoog, C. L. and Mann, M.** (2003). Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5813-8.
- **Fusaro, G., Dasgupta, P., Rastogi, S., Joshi, B. and Chellappan, S.** (2003). Prohibitin induces the transcriptional activity of p53 and is exported from the nucleus upon apoptotic signaling. *J Biol Chem* **278**, 47853-61.
- **Fusaro, G., Wang, S. and Chellappan, S.** (2002). Differential regulation of Rb family proteins and prohibitin during camptothecin-induced apoptosis. *Oncogene* **21**, 4539-48.
- **Gamble, S. C., Odontiadis, M., Waxman, J., Westbrook, J. A., Dunn, M. J.,**

- Wait, R., Lam, E. W. and Bevan, C. L.** (2004). Androgens target prohibitin to regulate proliferation of prostate cancer cells. *Oncogene* **23**, 2996-3004.
- **Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J. F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C. and Desjardins, M.** (2001). The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* **152**, 165-80.
  - **Glavic, A., Silva, F., Aybar, M. J., Bastidas, F. and Mayor, R.** (2004). Interplay between Notch signaling and the homeoprotein Xiro1 is required for neural crest induction in *Xenopus* embryos. *Development* **131**, 347-59.
  - **Guemar, L., de Santa Barbara, P., Vignal, E., Maurel, B., Fort, P. and Faure, S.** (2007). The small GTPase RhoV is an essential regulator of neural crest induction in *Xenopus*. *Dev Biol* **310**, 113-28.
  - **Gutkovich, Y. E., Ofir, R., Elkouby, Y. M., Dibner, C., Gefen, A., Elias, S. and Frank, D.** (2010). *Xenopus* Meis3 protein lies at a nexus downstream to Zic1 and Pax3 proteins, regulating multiple cell-fates during early nervous system development. *Dev Biol* **338**, 50-62.
  - **Harland, R. M.** (1991). In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol* **36**, 685-95.
  - **Hassler, C., Cruciat, C. M., Huang, Y. L., Kuriyama, S., Mayor, R. and Niehrs, C.** (2007). Kremen is required for neural crest induction in *Xenopus* and promotes LRP6-mediated Wnt signaling. *Development* **134**, 4255-63.
  - **He, B., Feng, Q., Mukherjee, A., Lonard, D. M., DeMayo, F. J., Katzenellenbogen, B. S., Lydon, J. P. and O'Malley, B. W.** (2008). A repressive role for prohibitin in estrogen signaling. *Mol Endocrinol* **22**, 344-60.
  - **He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W.** (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* **281**, 1509-12.
  - **Hensey, C. and Gautier, J.** (1998). Programmed cell death during *Xenopus* development: a spatio-temporal analysis. *Dev Biol* **203**, 36-48.
  - **Herold, S., Herkert, B. and Eilers, M.** (2009). Facilitating replication under stress: an oncogenic function of MYC? *Nat Rev Cancer* **9**, 441-4.
  - **His, W.** (1868). Untersuchungen über die erste Anlage des Wirbeltierleibes. Die erste Entwicklung des Hühnchens im Ei. *F.C.W. Vogel, Leipzig*.
  - **Hoffman, B. and Liebermann, D. A.** (2008). Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene* **27**, 6462-72.
  - **Hong, C. S., Park, B. Y. and Saint-Jeannet, J. P.** (2008). Fgf8a induces neural crest indirectly through the activation of Wnt8 in the paraxial mesoderm. *Development* **135**, 3903-10.

- **Hong, C. S. and Saint-Jeannet, J. P.** (2007). The activity of Pax3 and Zic1 regulates three distinct cell fates at the neural plate border. *Mol Biol Cell* **18**, 2192-202.
- **Honore, S. M., Aybar, M. J. and Mayor, R.** (2003). Sox10 is required for the early development of the prospective neural crest in *Xenopus* embryos. *Dev Biol* **260**, 79-96.
- **Huang, C. M., Foster, K. W., DeSilva, T., Zhang, J., Shi, Z., Yusuf, N., Van Kampen, K. R., Elmets, C. A. and Tang, D. C.** (2003). Comparative proteomic profiling of murine skin. *J Invest Dermatol* **121**, 51-64.
- **Joshi, B., Ko, D., Ordonez-Ercan, D. and Chellappan, S. P.** (2003). A putative coiled-coil domain of prohibitin is sufficient to repress E2F1-mediated transcription and induce apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **312**, 459-66.
- **Joshi, B., Rastogi, S., Morris, M., Carastro, L. M., DeCook, C., Seto, E. and Chellappan, S. P.** (2007). Differential regulation of human YY1 and caspase 7 promoters by prohibitin through E2F1 and p53 binding sites. *Biochem J* **401**, 155-66.
- **Jupe, E. R., Liu, X. T., Kiehlbauch, J. L., McClung, J. K. and Dell'Orco, R. T.** (1996). The 3' untranslated region of prohibitin and cellular immortalization. *Exp Cell Res* **224**, 128-35.
- **Kalluri, R. and Weinberg, R. A.** (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**, 1420-8.
- **Kee, Y. and Bronner-Fraser, M.** (2005). To proliferate or to die: role of Id3 in cell cycle progression and survival of neural crest progenitors. *Genes Dev* **19**, 744-55.
- **Kirby, M. L.** (1987). Cardiac morphogenesis--recent research advances. *Pediatr Res* **21**, 219-24.
- **Kirby, M. L. and Waldo, K. L.** (1990). Role of neural crest in congenital heart disease. *Circulation* **82**, 332-40.
- **Knecht, A. K. and Bronner-Fraser, M.** (2002). Induction of the neural crest: a multigene process. *Nat Rev Genet* **3**, 453-61.
- **Kunz, M., Herrmann, M., Wedlich, D. and Gradl, D.** (2004). Autoregulation of canonical Wnt signaling controls midbrain development. *Dev Biol* **273**, 390-401.
- **Kuriyama, S. and Mayor, R.** (2008). Molecular analysis of neural crest migration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **363**, 1349-62.
- **Kurtev, V., Margueron, R., Kroboth, K., Ogris, E., Cavailles, V. and Seiser, C.** (2004). Transcriptional regulation by the repressor of estrogen receptor

activity via recruitment of histone deacetylases. *J Biol Chem* **279**, 24834-43.

- **LaBonne, C. and Bronner-Fraser, M.** (1999). Molecular mechanisms of neural crest formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 81-112.
- **Le Douarin, N. and Teillet, M.** (1973). The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol.* **30**, 31-48.
- **Le Douarin, N. and Teillet, M.** (1974). Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neuroectodermal mesenchymal derivatives, using a biological cell marking technique. *Dev Biol* **41**, 162-84.
- **Lee, Y. H., Aoki, Y., Hong, C. S., Saint-Germain, N., Credidio, C. and Saint-Jeannet, J. P.** (2004). Early requirement of the transcriptional activator Sox9 for neural crest specification in *Xenopus*. *Dev Biol* **275**, 93-103.
- **Liem, K. F., Jr., Tremml, G. and Jessell, T. M.** (1997). A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* **91**, 127-38.
- **Light, W., Vernon, A. E., Lasorella, A., Iavarone, A. and LaBonne, C.** (2005). *Xenopus* Id3 is required downstream of Myc for the formation of multipotent neural crest progenitor cells. *Development* **132**, 1831-41.
- **Linker, C., Bronner-Fraser, M. and Mayor, R.** (2000). Relationship between gene expression domains of Xsnail, Xslug, and Xtwist and cell movement in the prospective neural crest of *Xenopus*. *Dev Biol* **224**, 215-25.
- **Liu, J. P. and Jessell, T. M.** (1998). A role for rhoB in the delamination of neural crest cells from the dorsal neural tube. *Development* **125**, 5055-67.
- **Ludwig, A., Rehberg, S. and Wegner, M.** (2004). Melanocyte-specific expression of dopachrome tautomerase is dependent on synergistic gene activation by the Sox10 and Mitf transcription factors. *FEBS Lett* **556**, 236-44.
- **Luo, T., Lee, Y. H., Saint-Jeannet, J. P. and Sargent, T. D.** (2003). Induction of neural crest in *Xenopus* by transcription factor AP2alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 532-7.
- **Luo, T., Matsuo-Takasaki, M., Thomas, M. L., Weeks, D. L. and Sargent, T. D.** (2002). Transcription factor AP-2 is an essential and direct regulator of epidermal development in *Xenopus*. *Dev Biol* **245**, 136-44.
- **Manjeshwar, S., Branam, D. E., Lerner, M. R., Brackett, D. J. and Jupe, E. R.** (2003). Tumor suppression by the prohibitin gene 3'untranslated region RNA in human breast cancer. *Cancer Res* **63**, 5251-6.
- **Mayer, T. C.** (1973). The migratory pathway of neural crest cells into the skin of mouse embryos. *Dev Biol* **34**, 39-46.
- **Mayor, R. and Aybar, M. J.** (2001). Induction and development of neural crest



in *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res* **305**, 203-9.

- **Mayor, R., Essex, L. J., Bennett, M. F. and Sargent, M. G.** (1993). Distinct elements of the *xsna* promoter are required for mesodermal and ectodermal expression. *Development* **119**, 661-71.
- **Mayor, R., Young, R. and Vargas, A.** (1999). Development of neural crest in *Xenopus*. *Curr Top Dev Biol* **43**, 85-113.
- **McClung, J. K., Danner, D. B., Stewart, D. A., Smith, J. R., Schneider, E. L., Lumpkin, C. K., Dell'Orco, R. T. and Nuell, M. J.** (1989). Isolation of a cDNA that hybrid selects antiproliferative mRNA from rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* **164**, 1316-22.
- **Meulemans, D. and Bronner-Fraser, M.** (2004). Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Dev Cell* **7**, 291-9.
- **Mishra, S., Murphy, L. C. and Murphy, L. J.** (2006). The Prohibitins: emerging roles in diverse functions. *J Cell Mol Med* **10**, 353-63.
- **Monsoro-Burq, A. H., Wang, E. and Harland, R.** (2005). *Msx1* and *Pax3* cooperate to mediate FGF8 and WNT signals during *Xenopus* neural crest induction. *Dev Cell* **8**, 167-78.
- **Morrish, F., Isern, N., Sadilek, M., Jeffrey, M. and Hockenbery, D. M.** (2009). c-Myc activates multiple metabolic networks to generate substrates for cell-cycle entry. *Oncogene* **28**, 2485-91.
- **Morrow, I. C. and Parton, R. G.** (2005). Flotillins and the PHB domain protein family: rafts, worms and anaesthetics. *Traffic* **6**, 725-40.
- **Murray, S. A. and Gridley, T.** (2006). Snail family genes are required for left-right asymmetry determination, but not neural crest formation, in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10300-4.
- **Nagatomo, K. and Hashimoto, C.** (2007). *Xenopus hairy2* functions in neural crest formation by maintaining cells in a mitotic and undifferentiated state. *Dev Dyn* **236**, 1475-83.
- **Nichane, M., de Croze, N., Ren, X., Souopgui, J., Monsoro-Burq, A. H. and Bellefroid, E. J.** (2008). Hairy2-Id3 interactions play an essential role in *Xenopus* neural crest progenitor specification. *Dev Biol* **322**, 355-67.
- **Nieto, M. A.** (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 155-66.
- **Nieuwkoop, P. D. and Faber, J.** (1967). Normtabelle von *Xenopus laevis*. Elsevier Noth-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- **Nijtmans, L. G., Artal, S. M., Grivell, L. A. and Coates, P. J.** (2002). The mitochondrial PHB complex: roles in mitochondrial respiratory complex assembly, ageing and degenerative disease. *Cell Mol Life Sci* **59**, 143-55.

- **Nijtmans, L. G., de Jong, L., Artal Sanz, M., Coates, P. J., Berden, J. A., Back, J. W., Muijsers, A. O., van der Spek, H. and Grivell, L. A.** (2000). Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *EMBO J* **19**, 2444-51.
- **Nuell, M. J., Stewart, D. A., Walker, L., Friedman, V., Wood, C. M., Owens, G. A., Smith, J. R., Schneider, E. L., Dell' Orco, R., Lumpkin, C. K. et al.** (1991). Prohibitin, an evolutionarily conserved intracellular protein that blocks DNA synthesis in normal fibroblasts and HeLa cells. *Mol Cell Biol* **11**, 1372-81.
- **Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E. and Kluding, H.** (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. 1. Zygotic loci on the 2nd chromosome. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **193**, 267-282.
- **Ohkubo, T. and Ozawa, M.** (2004). The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation. *J Cell Sci* **117**, 1675-85.
- **Osman, C., Merkwirth, C. and Langer, T.** (2009). Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes. *J Cell Sci* **122**, 3823-30.
- **Park, S. E., Xu, J., Frolova, A., Liao, L., O'Malley, B. W. and Katzenellenbogen, B. S.** (2005). Genetic deletion of the repressor of estrogen receptor activity (REA) enhances the response to estrogen in target tissues in vivo. *Mol Cell Biol* **25**, 1989-99.
- **Pasqualetti, M., Ori, M., Nardi, I. and Rijli, F. M.** (2000). Ectopic Hoxa2 induction after neural crest migration results in homeosis of jaw elements in *Xenopus*. *Development* **127**, 5367-78.
- **Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B. and De Robertis, E. M.** (1996). Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* **86**, 589-98.
- **Pomeranz, H. D., Sherman, D. L., Smalheiser, N. R., Tennyson, V. M. and Gershon, M. D.** (1991). Expression of a neurally related laminin binding protein by neural crest-derived cells that colonize the gut: relationship to the formation of enteric ganglia. *J Comp Neurol* **313**, 625-42.
- **Rajalingam, K., Wunder, C., Brinkmann, V., Churin, Y., Hekman, M., Sievers, C., Rapp, U. R. and Rudel, T.** (2005). Prohibitin is required for Ras-induced Raf-MEK-ERK activation and epithelial cell migration. *Nat Cell Biol* **7**, 837-43.
- **Rastogi, S., Joshi, B., Dasgupta, P., Morris, M., Wright, K. and Chellappan, S.** (2006a). Prohibitin facilitates cellular senescence by recruiting specific corepressors to inhibit E2F target genes. *Mol Cell Biol* **26**, 4161-71.
- **Rastogi, S., Joshi, B., Fusaro, G. and Chellappan, S.** (2006b). Camptothecin induces nuclear export of prohibitin preferentially in transformed

cells through a CRM-1-dependent mechanism. *J Biol Chem* **281**, 2951-9.

- **Saint-Jeannet, J. P., He, X., Varmus, H. E. and Dawid, I. B.** (1997). Regulation of dorsal fate in the neuraxis by Wnt-1 and Wnt-3a. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13713-8.
- **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.
- **Sasai, N., Mizuseki, K. and Sasai, Y.** (2001). Requirement of FoxD3-class signaling for neural crest determination in *Xenopus*. *Development* **128**, 2525-36.
- **Sauka-Spengler, T. and Bronner-Fraser, M.** (2008). A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 557-68.
- **Schlosser, G. and Northcutt, R. G.** (2000). Development of neurogenic placodes in *Xenopus laevis*. *J Comp Neurol* **418**, 121-46.
- **Schuff, M., Rossner, A., Wacker, S. A., Donow, C., Gessert, S. and Knochel, W.** (2007). FoxN3 is required for craniofacial and eye development of *Xenopus laevis*. *Dev Dyn* **236**, 226-39.
- **Seo, S., Richardson, G. A. and Kroll, K. L.** (2005). The SWI/SNF chromatin remodeling protein Brg1 is required for vertebrate neurogenesis and mediates transactivation of Ngn and NeuroD. *Development* **132**, 105-15.
- **Snyder, J. R., Hall, A., Ni-Komatsu, L., Khersonsky, S. M., Chang, Y. T. and Orlow, S. J.** (2005). Dissection of melanogenesis with small molecules identifies prohibitin as a regulator. *Chem Biol* **12**, 477-84.
- **Sonnenberg-Riethmacher, E., Miehe, M., Stolt, C. C., Goerich, D. E., Wegner, M. and Riethmacher, D.** (2001). Development and degeneration of dorsal root ganglia in the absence of the HMG-domain transcription factor Sox10. *Mech Dev* **109**, 253-65.
- **Southard-Smith, E. M., Kos, L. and Pavan, W. J.** (1998). Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model. *Nat Genet* **18**, 60-4.
- **Spokony, R. F., Aoki, Y., Saint-Germain, N., Magner-Fink, E. and Saint-Jeannet, J. P.** (2002). The transcription factor Sox9 is required for cranial neural crest development in *Xenopus*. *Development* **129**, 421-32.
- **Steglich, G., Neupert, W. and Langer, T.** (1999). Prohibitins regulate membrane protein degradation by the m-AAA protease in mitochondria. *Mol Cell Biol* **19**, 3435-42.
- **Steventon, B., Araya, C., Linker, C., Kuriyama, S. and Mayor, R.** (2009). Differential requirements of BMP and Wnt signalling during gastrulation and neurulation define two steps in neural crest induction. *Development* **136**, 771-9.

- **Steventon, B., Carmona-Fontaine, C. and Mayor, R.** (2005). Genetic network during neural crest induction: from cell specification to cell survival. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 647-54.
- **Suzuki, A. and Hemmati-Brivanlou, A.** (2000). Xenopus embryonic E2F is required for the formation of ventral and posterior cell fates during early embryogenesis. *Mol Cell* **5**, 217-29.
- **Tanaka, T., Ono, T., Kitamura, N. and Kato, J. Y.** (2003). Dominant negative E2F inhibits progression of the cell cycle after the midblastula transition in Xenopus. *Cell Struct Funct* **28**, 515-22.
- **Tanno, S., Fukuda, I., Saito, Y. and Ogawa, K.** (1997). Prohibitin expression is decreased in the regenerating liver but not in chemically induced hepatic tumors in rats. *Jpn J Cancer Res* **88**, 1155-64.
- **Tatsuta, T., Model, K. and Langer, T.** (2005). Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mitochondria. *Mol Biol Cell* **16**, 248-59.
- **Terashima, M., Kim, K. M., Adachi, T., Nielsen, P. J., Reth, M., Kohler, G. and Lamers, M. C.** (1994). The IgM antigen receptor of B lymphocytes is associated with prohibitin and a prohibitin-related protein. *EMBO J* **13**, 3782-92.
- **Tseng, H. T., Shah, R. and Jamrich, M.** (2004). Function and regulation of FoxF1 during Xenopus gut development. *Development* **131**, 3637-47.
- **Vander Heiden, M. G., Choy, J. S., VanderWeele, D. J., Brace, J. L., Harris, M. H., Bauer, D. E., Prange, B., Kron, S. J., Thompson, C. B. and Rudin, C. M.** (2002). Bcl-x(L) complements *Saccharomyces cerevisiae* genes that facilitate the switch from glycolytic to oxidative metabolism. *J Biol Chem* **277**, 44870-6.
- **Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R. S. and Zhang, Y.** (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* **431**, 873-8.
- **Wang, S., Fusaro, G., Padmanabhan, J. and Chellappan, S. P.** (2002a). Prohibitin co-localizes with Rb in the nucleus and recruits N-CoR and HDAC1 for transcriptional repression. *Oncogene* **21**, 8388-96.
- **Wang, S., Nath, N., Adlam, M. and Chellappan, S.** (1999b). Prohibitin, a potential tumor suppressor, interacts with RB and regulates E2F function. *Oncogene* **18**, 3501-10.
- **Wang, S., Nath, N., Fusaro, G. and Chellappan, S.** (1999a). Rb and prohibitin target distinct regions of E2F1 for repression and respond to different upstream signals. *Mol Cell Biol* **19**, 7447-60.
- **Wang, S., Zhang, B. and Faller, D. V.** (2002b). Prohibitin requires Brg-1 and Brm for the repression of E2F and cell growth. *EMBO J* **21**, 3019-28.
- **Weston, J. A.** (1963). A radioautographic analysis of the migration and

localization of trunk neural crest cells in the chick. *Dev Biol* **6**, 279-310.

- **Winter, A., Kamarainen, O. and Hofmann, A.** (2007). Molecular modeling of prohibitin domains. *Proteins* **68**, 353-62.
- **Zhang, C., Carl, T. F., Trudeau, E. D., Simmet, T. and Klymkowsky, M. W.** (2006). An NF-kappaB and slug regulatory loop active in early vertebrate mesoderm. *PLoS One* **1**, e106.
- **Zhang, C. and Klymkowsky, M. W.** (2009). Unexpected functional redundancy between Twist and Slug (Snail2) and their feedback regulation of NF-kappaB via Nodal and Cerberus. *Dev Biol* **331**, 340-9.
- **Zimmerman, L. B., De Jesus-Escobar, J. M. and Harland, R. M.** (1996). The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* **86**, 599-606.

## **9 Anhang**

### **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen Mitarbeitern des Zoologischen Instituts, Abteilung Zell- und Entwicklungsbiologie danken, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Doris Wedlich für die intensive Unterstützung und Förderung, sowie Frau Dr. Véronique Orian-Rousseau für die Übernahme des Koreferats.

## Publikationen

### Veröffentlichung

- **Schneider, M., Schambony, A., Wedlich, D. (2010).** Prohibitin1 acts as neural crest specifier in *Xenopus* development by repressing the transcription factor E2F1.

In 2. Revision bei *Development*, zur Bearbeitung geringfügiger Änderungen.

### Poster

- **Martina Schneider, Alexandra Schambony, Doris Wedlich.** Prohibitin: A novel neural crest specifier. *12<sup>th</sup> International Xenopus Conference. Leiuwen, Germany, 2008*
- **Martina Schneider, Alexandra Schambony, Doris Wedlich.** Prohibitin1 acts as neural crest specifier repressing E2F1 activity. *Seventh German-Italian Xenopus Meeting. Vigoni, Italy, 2009*

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Martina Schneider  
Geburtsdatum: 23. Dezember 1980  
Geburtsort: Hermannstadt  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

1987-1991 Elly-Heuss-Knapp Grundschule, Heilbronn  
1991-2000 Justinus-Kerner-Gymnasium, Weinsberg

### Hochschulausbildung

10/2001-07/2007 Studiengang Diplom Biologie, Karlsruher Institut für  
Technologie (KIT)  
Hauptfächer: Zoologie und Genetik  
Nebenfächer: Umwelt- und Strahlentoxikologie,  
Paläontologie  
11/2006-07/2007 Diplomarbeit: „Funktionelle Charakterisierung von  
Prohibitin während der Embryonalentwicklung.“  
Zoologisches Institut, Abteilung für Zell- und  
Entwicklungsbiologie, Karlsruher Institut für Technologie  
(KIT)

### Promotion

Seit 11/2007 Zoologisches Institut, Abteilung für Zell- und  
Entwicklungsbiologie, Karlsruher Institut für Technologie  
(KIT)  
11/2007-11/2009 gefördert durch das Landesgraduierstipendium